



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

CAROLINA INAJÁ DALLA GASPERINA BONAN

**Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições
de transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora
passalidarum* NRRL Y-27907**

Campinas

2018

CAROLINA INAJÁ DALLA GASPERINA BONAN

**Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições de
transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora passalidarum*
NRRL Y-27907**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas,
como requisito para obtenção do título
de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Aline Carvalho da Costa

Co-orientadora: Jaciane Lutz Ienczak

Este trabalho corresponde à versão
final da Dissertação de Mestrado
defendida pela aluna Carolina Inajá
Dalla Gasperina Bonan e orientada
pela Profa. Dra. Aline Carvalho da
Costa.

Campinas

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 133181/2018-9
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4060-723X>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

B64a Bonan, Carolina Inajá Dalla Gasperina, 1990-
Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições de transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 / Carolina Inajá Dalla Gasperina Bonan. – Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Coorientador: Jaciane Lutz Ienczak.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bioetanol. 2. Etanol. 3. Levedura. 4. Xilose. 5. Atividade enzimática. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Ienczak, Jaciane Lutz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of bioethanol production under different oxygen transfer conditions for yeast *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907

Palavras-chave em inglês:

Bioethanol

Ethanol

Yeast

Xylose

Enzymatic activity

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Willibaldo Schmidell Netto

Rosana Goldbeck

Data de defesa: 07-12-2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Carolina Inajá Dalla Gasperina Bonan em 07 de dezembro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos Doutores:

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa
FEQ/UNICAMP
Presidente

Dr. Willibaldo Schmidell Netto
Professor colaborador/UFSC
Membro titular

Dra. Rosana Goldbeck
FEA/UNICAMP
Membro titular

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA / Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre guiando os meus passos pelo melhor caminho e por me conceder a oportunidade para realização deste trabalho, além de colocar pessoas extraordinárias em minha vida, que me auxiliaram e fizeram toda a diferença neste período.

Aos meus amados pais, Mauro e Marli Bonan, pelo amor incondicional que, mesmo nas dificuldades, priorizaram a educação de seus filhos, por estarem sempre ao meu lado, pelo grande apoio e incentivo se mantendo presente mesmo distantes fisicamente. Aos meus irmãos, Vinícius, Maurícius, Luis Gabriel e Maria Clara, por todo amor e amparo.

Às minhas orientadoras, agradeço por terem sempre concedido tempo e atenção e por todo conhecimento passado. À minha orientadora Professora Aline Carvalho da Costa pela orientação, suporte, incentivo e amizade construída durante este período. À minha co-orientadora, supervisora e amiga Jaciane Lutz lenczak, pelo apoio, dedicação, confiança e pelas oportunidades concedidas desde minha graduação, e sempre será meu exemplo.

Ao meu namorado Luiz Eduardo Biazi, por todo amor, companheirismo, paciência, por todas as vezes que me acalmou e se preocupou com minha felicidade. Seu amparo foi fundamental no andamento deste projeto.

Às novas amizades construídas durante esta jornada, pelo companheirismo, carinho e compreensão, em especial, Suzane, Lauren, Zaira, Sarita, Simone, Maria Leticia, Jaqueline, Marcia, Viviane, Elaine, Emerson, Karen, Thiago, Amanda, Robson, André, Lunara, Fernanda, Mariana e Nayara. E também aos demais amigos do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), que, direta ou indiretamente, participaram desta jornada.

Às amigas de longa data que sempre estiveram presentes em minha vida e torcem pelo meu sucesso, principalmente as que me acompanham desde a época de escola e da graduação, Marielen, Ana Caroline, Andressa, Emanuele, Raphaela, Fernanda, Joiris, Kathiussia.

Ao professor Willibaldo Schmidell, pela conversa e auxílio prestado no último segundo. Aos colegas Carlos Alberto de Oliveira Filho e Daniel Kolling pelo compartilhamento de conhecimentos e por estarem sempre dispostos a me socorrer nos momentos de apuro. A Lauren, Suzane, Amanda, Luiz e Robson pela assistência prestada durante a realização dos experimentos e pelo dissipação dos conhecimentos adquiridos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), por disponibilizar uma excelente infraestrutura, tornando possível a realização deste projeto. Ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pela oportunidade. À FAPESP, ao CTBE e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Frente à instabilidade de microrganismos geneticamente modificados na aplicação industrial para produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas (etanol de segunda geração), a utilização de cepas nativas ganha destaque, tendo em vista que seu desenvolvimento é mais simples e mais barato. Sendo assim, leveduras naturalmente capazes de fermentar pentoses provenientes de material lignocelulósico são desejadas, destacando-se a levedura *Spathaspora passalidarum*. Esse microrganismo é classificado como *Crabtree* negativo, requerendo condições específicas de disponibilidade de oxigênio no meio de cultura para favorecer o consumo de substrato e a produção de etanol, através da re-oxidação de coenzimas que atuam na via bioquímica para a metabolização da xilose. Sabendo-se que uma das formas de se mensurar a concentração de oxigênio dissolvido no meio fermentativo é através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}), a determinação de valores ótimos de k_{LA} para este microrganismo se torna um importante aspecto a ser estudado para otimização da produção de etanol, uma vez que diferentes valores empregados fornecerão diferentes valores de potencial de oxirredução (ORP), alterando a atividade das enzimas XR (xilose redutase) e XDH (xilitol desidrogenase). Dessa forma, o presente trabalho foi desenvolvido para fornecer uma investigação detalhada e abrangente sobre a influência da disponibilidade de oxigênio na capacidade fermentativa da levedura nativa *S. passalidarum*, estabelecendo-se uma correlação com o potencial de oxirredução, em que o objetivo principal é a determinação de uma faixa de valores de k_{LA} ótima para maximização da produção de etanol. Além disso, foi realizado um estudo da atividade das enzimas XR e XDH frente às diferentes condições de oxigenação empregadas nas fermentações. Com os resultados deste trabalho, foi possível observar que a levedura *S. passalidarum* requer níveis de aeração controlados para otimizar o processo fermentativo, sendo que, em condições de anaerobiose, foi registrado baixo título ($19,75 \text{ g.L}^{-1}$) e baixa produtividade volumétrica ($0,39 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), além de elevada concentração de açúcares redutores não metabolizados ao fim de 48h de processo ($38,81 \text{ g.L}^{-1}$). Em contrapartida, em aerobiose, a rota metabólica foi completamente desviada para o crescimento celular, não sendo registrada formação de etanol. Para as

diferentes condições de microaeração, a produção de etanol foi, aproximadamente, 1,5 vezes maior quando comparada à anaerobiose, além de apresentar uma produtividade volumétrica entre 0,58 e 1,12 g.L⁻¹.h⁻¹. Ou seja, a elevação do oxigênio dissolvido está diretamente relacionada com a elevação das velocidades de consumo e de formação, acelerando o processo fermentativo. Para o maior k_{La} (45 h⁻¹), todo açúcar disponibilizado para a levedura (aproximadamente 90 g.L⁻¹) foi metabolizado em 24 h, metade do tempo requerido para um coeficiente de aeração menor (como é o caso do k_{La} 8 h⁻¹), sem causar variações significativas em rendimentos. A disponibilidade de O₂ também afetou a atividade enzimática, bem como a preferência da enzima XR por determinada coenzima. Quando somente a via fermentativa estava ativa, a XR não apresentou preferência. Entretanto conforme a via era desviada para o metabolismo oxidativo, a preferência por NADH aumentou. No caso da propagação celular (condição de aeração e via oxidativa ativa), a preferência foi por NADPH. Devido ao O₂ atuar como acceptor final de elétrons, sua presença influenciou na estabilização das faixas de potencial de oxirredução, uma vez que o caráter redutor do meio é diminuído, sendo que as maiores velocidades de formação de etanol foram registradas em faixas de potencial redox próximas a -100 mV.

Palavras-chave: *S. passalidarum*, atividade enzimática, parâmetros cinéticos respiratórios, xilose, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

ABSTRACT

Due to the instability of genetically modified microorganisms in industrial application for the production of ethanol from lignocellulosic biomasses (second-generation ethanol), the use of native strains is a potential alternative, since its development is simpler and cheaper. Thus, yeasts that are naturally capable of fermenting pentoses from lignocellulosic material are desired, which is the case of *Spathaspora passalidarum*. This microorganism is classified as a negative Crabtree yeast, requiring specific conditions of oxygen availability in the culture medium to favor substrate consumption and ethanol production, through the re-oxidation of coenzymes that act in the biochemical pathway of xylose metabolism. Since one of the ways to measure dissolved oxygen concentration in the fermentation medium is through the volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}), the determination of optimal k_{La} values for this microorganism becomes an important aspect to be studied for optimization of ethanol production, since different values will provide different values of oxidation potential (ORP), affecting the activity of the enzymes XR (xylose reductase) and XDH (xylitol dehydrogenase). Therefore, the present work was developed to provide a detailed and comprehensive investigation on the influence of oxygen availability on the fermentative capacity of the native yeast *S. passalidarum*, establishing a correlation with the oxireduction potential, with the main objective to determine a range of k_{La} values to maximize ethanol production. In addition, a study of the activity of XR and XDH in function of oxygen availability was carried out. With the results of this work, it was possible to observe that the yeast *S. passalidarum* requires controlled aeration levels to optimize the fermentation process. Under anaerobic conditions, a low ethanol titer ($19,75 \text{ g.L}^{-1}$) and a low volumetric productivity ($0.39 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) were registered as a consequence of the high concentration of non-metabolised reducing sugars after 48 h of the process (38.81 g.L^{-1}). On the other hand, in complete aerobiosis, the metabolic pathway was completely diverted to cell growth, with no formation of ethanol. For the different microaeration conditions, the ethanol production was approximately 1.5 times higher when compared to the anaerobiosis, besides presenting a volumetric productivity between 0.58 and $1.12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Thus, the increase of the dissolved oxygen is directly related to the elevation of consumption and formation

rates, accelerating the fermentative process. For the highest k_{La} (45 h^{-1}), all the available sugar (approximately 90 g.L^{-1}) was metabolized within 24 h, half of the time required for a lower aeration coefficient ($k_{La} 8 \text{ h}^{-1}$), without causing significant variations on yields. The availability of O_2 also affected the enzymatic activity, as well as the preference of XR for a certain coenzyme. When only the fermentation route was active, XR showed no preference. As the pathway was diverted to oxidative metabolism, the preference for NADH increased. In the case of cell propagation (complete aeration condition and active oxidative pathway), the preference was for NADPH. As O_2 acts as final electron acceptor, its presence influenced on the stabilization of the oxireduction potential bands, since the reducing character of the medium is decreased, and the higher rates of ethanol formation were recorded on a range of ORP values around -100 mV .

Keywords: *S. passalidarum*, enzymatic activity, respiratory kinetic parameters, xylose, volumetric oxygen transfer coefficient

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição da parede celular de biomassas lignocelulósicas (amarelo: hemicelulose; verde: celulose; marrom: lignina).....	27
Figura 2: Fluxograma da produção de etanol a partir da hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica.....	28
Figura 3: Desconstrução da biomassa lignocelulósica causada pelo pré-tratamento (amarelo: hemicelulose; verde: celulose; marrom: lignina).....	29
Figura 4: Esquema simplificado do metabolismo da xilose em leveduras.....	38
Figura 5: Sensor óptico de OD Visiferm Arc DO (Hamilton, EUA).....	45
Figura 6: Sistema utilizado para a determinação do C_s	46
Figura 7: Variação de Q_{O_2} pela concentração de Oxigênio disponível (a); perfil de Oxigênio Dissolvido (%) observado durante a execução do método de interrupção de aeração de um cultivo (b).	48
Figura 8: Esquema ilustrativo do Biorreator BioFlo® 115 3 L com 1,4 L de volume de trabalho, equipado com duas pás planas usado para determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ($k_L a$), e fermentações nas diferentes condições de aeração.....	49
Figura 9: Variação do valor de OD em função do tempo, durante a execução do método dinâmico.	51
Figura 10: Sistema para monitoramento dos gases, onde a seta vermelhas representa as mangueiras de condução de gases.	55
Figura 11: Resposta da sonda de oxigênio dissolvido em função da concentração de oxigênio a 30°C.	59
Figura 12: Determinação de C_{CRIT} de O_2 para a <i>S. passalidarum</i>	61
Figura 13: Perfil das fermentações utilizando <i>S. passalidarum</i> sob diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio: (A) anaerobiose $k_{LA} = 0 \text{ h}^{-1}$, (B) $k_{LA} = 4,9 \text{ h}^{-1}$, (C) $k_{LA} = 8 \text{ h}^{-1}$, (D) $k_{LA} = 45 \text{ h}^{-1}$. Símbolos referem-se a: (■) – Glicose; (■) – Xilose; (▲) – CDW; (●) – Etanol; (○) – Xilitol.	63
Figura 14: Perfil de velocidades específicas de consumo de substratos: (A) Glicose, (B) xilose, (C) AR, e velocidades específicas de formação de: (D) etanol, (E) xilitol para as fermentações com diferentes valores de k_{LA} , para a levedura <i>S. passalidarum</i>	67
Figura 15: Perfil de propagação de <i>S. passalidarum</i> (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático. Símbolos referem-se a: (■) – Glicose; (■) – Xilose; (▲) – CDW; (●) – Etanol; (○) – Xilitol.	71
Figura 16: Perfil de velocidades específicas de consumo de substratos e de formação de produto e subproduto durante propagação celular de <i>S. passalidarum</i> (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático. Símbolos referem-se a: (■) – Glicose; (■) – Xilose; (●) – AR; (▲) – CDW; (●) – Etanol; (○) – Xilitol.	72
Figura 17: Perfil da velocidade de consumo de oxigênio e velocidade específica de consumo de oxigênio para condição de aerobiose com <i>S. passalidarum</i> . ..	74
Figura 18: Exemplo da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio durante a execução do método dinâmico para experimentos em condição de aerobiose com <i>S. passalidarum</i> . Onde Var_1 refere-se ao tempo (s) e Var_2 a concentração de oxigênio ($\text{mg}_{O_2} \cdot \text{L}^{-1}$).	75

Figura 19: Perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio obtidos na retomada da aeração, impostas pelo controle automático, para fermentação em aerobiose com <i>S. passalidarum</i> .	76
Figura 20: $\ln(x)$ versus tempo para o cada replicata do cultivo celular (condição de aerobiose) para <i>S. passalidarum</i> . O coeficiente angular dos ajustes lineares na fase exponencial representam o valor da velocidade específica máxima de crescimento celular (pontos em vermelho).	77
Figura 21: Perfil da velocidade específica de crescimento celular (μ_x) para o cultivo celular (condição de aerobiose) para <i>S. passalidarum</i> .	78
Figura 22: Relação entre a concentração do substrato limitante e a velocidade específica de crescimento celular para determinação dos parâmetros da equação de Monod, onde cada cor representa uma replicata.	78
Figura 23: Determinação dos parâmetros da equação de Monod a partir de dados estimados, onde cada cor representa uma replicata.	79
Figura 24: Relação entre a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_x) para determinação de m_o e Y_{X/O_2} para a condição de aerobiose (propagação celular) para <i>S. passalidarum</i> .	80
Figura 25: Perfil da velocidade de formação de CO_2 (A) e velocidade específica de formação de CO_2 (B) para condição de anaerobiose e microaeração com <i>S. passalidarum</i> . Símbolos referem-se: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$.	81
Figura 26: Perfil de velocidade específica de formação de CO_2 e etanol para as fermentações utilizando <i>S. passalidarum</i> sob diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio: (A) anaerobiose $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$, (B) $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$, (C) $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$, (D) $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$. Símbolos referem-se a: (●) – Q_{CO_2} ; (●) – μ_P .	82
Figura 27: Relação entre a velocidade específica de formação de CO_2 e a produtividade volumétrica de etanol para condição de anaerobiose e microaeração com <i>S. passalidarum</i> durante o consumo da xilose. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$.	83
Figura 28: Atividade enzimática da XR para as coenzimas NADPH e NADH.	84
Figura 29: Atividade enzimática da XR para as coenzimas NADH e NADPH e velocidade específica de consumo de xilose. Símbolos refere-se a: (■) – Atividade enzimática com NADH; (■) – Atividade enzimática com NADPH; (▲) – velocidade específica de consumo de xilose.	86
Figura 30: Atividade enzimática da enzima XDH para o cofator NAD^+ .	87
Figura 31: Concentração de xilitol para as fermentações com diferentes disponibilidades de oxigênio, para a levedura <i>S. passalidarum</i> .	88
Figura 32: Fator de conversão de xilose em xilitol para as fermentações com diferentes disponibilidades de oxigênio, para a levedura <i>S. passalidarum</i> .	89
Figura 33: Perfil do potencial redox registrado para as fermentações com diferentes condições de aeração para <i>S. passalidarum</i> . Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose.	90
Figura 34: Perfil de valores de pH registrado para as fermentações com diferentes condições de aeração para <i>S. passalidarum</i> . Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose.	93

Figura 35: Perfil de pH e potencial de oxirredução para condição de aerobiose com *S. passalidarum*. Símbolos referem-se a: (●) –pH; (●) Potencial redox.... 94

Figura 36: Relação entre velocidade específica de consumo de açúcares *versus* potencial redox. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose..... 95

Figura 37: Relação entre velocidade específica de formação de produto (etanol) e subproduto (xilitol) *versus* potencial redox. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar a partir de tratamento ácido sulfúrico.....	30
Tabela 2: Medida das principais dimensões do Biorreator BioFlo® 115 3 L com 1,4 L de volume de trabalho, equipado com duas pás planas usado para determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio (k_La), e fermentações nas diferentes condições de aeração.	49
Tabela 3 - Parâmetros cinéticos e respectivas equações.	53
Tabela 4: Fator de correção determinado para cada componente pelo fabricante do fluxômetro de massa (MKS Instruments 647C).....	56
Tabela 5: Concentração de saturação (C_s), constante de Henry (H), coeficiente de correlação (R^2) e variação dos meio de fermentação em relação à água destilada a 30 °C.	60
Tabela 6: Condições empregadas para determinação do k_{La}	62
Tabela 7: Resultados obtidos durante as fermentações com <i>S. passalidarum</i> , sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio.....	65
Tabela 8: Média das velocidades específicas registradas durante o consumo de substratos e formação de produto e subproduto para as fermentações com diferentes k_{La} , para a levedura <i>S. passalidarum</i>	68
Tabela 9: Teste de Tukey realizado para os rendimentos em etanol das fermentações com diferentes valores k_{La} , para a levedura <i>S. passalidarum</i> . ..	69
Tabela 10: Teste de Tukey realizado para as produtividades volumétricas em etanol das fermentações com diferentes valores k_{La} , para a levedura <i>S. passalidarum</i>	69
Tabela 11: Dados obtidos durante propagação celular de <i>S. passalidarum</i> (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático.	72
Tabela 12: Média das velocidades específicas registradas durante o consumo de substratos e a formação de produto para propagação celular da <i>S. passalidarum</i> (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático.	73

NOMENCLATURA

Lista de símbolos

C_0	Concentração de oxigênio dissolvido para o instante inicial do método dinâmico	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$
C_{01}	Concentração de oxigênio dissolvido para o instante inicial da retomada da aeração do método dinâmico	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$
C_{crit}	Concentração Crítica de Oxigênio Dissolvido	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$
C_p	Concentração de oxigênio dissolvido determinado pelo eletrodo polarográfico	%
C_s	Concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$
H	Constante de Henry	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$
K	Constante	
kg	Quilograma	kg
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio	h^{-1}
M	Molaridade	mol/L
m_{O_2}	Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
m_s	Velocidade específica de consumo de carboidratos para manutenção celular	$\text{g}_s \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
P_g	Pressão parcial de O_2 na fase gasosa	atm
Q_{CO_2}	Velocidade específica de formação de CO_2	$\text{mg}_{\text{CO}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Q_{CO_2X}	Velocidade de formação de CO_2	$\text{mg}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Q_{O_2}	Velocidade específica de consumo de oxigênio	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Q_{O_2X}	Velocidade de consumo de oxigênio	$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Q_P	Produtividade volumétrica (etanol)	$\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
R	Constante universal dos gases	$\text{atm} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
t	Tempo	h
t_1	Tempo no momento da retomada da aeração do método dinâmico	h
V	Volume	L, mL, μL

X	Concentração celular	g.L^{-1}
X_{CO_2}	Fração molar de CO_2 no gás	
X_{O_2}	Fração molar de O_2 no gás	
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto	$\text{g}_{EtOH} \cdot \text{g}^{-1}$
Y_{X/O_2}	Fator de conversão de oxigênio em célula	$\text{g}_{cel} \cdot \text{g}_{O_2}^{-1}$
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de carboidratos em células	$\text{g}_{cel} \cdot \text{g}^{-1}$

Lista de símbolos Gregos

μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento	h^{-1}
μ_P	Velocidade específica de produção de etanol	$\text{g}_{EtOH} \cdot \text{g}_{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
μ_S	Velocidade específica de consumo de substratos	$\text{g}_S \cdot \text{g}_{cel}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
η	Rendimento	%
E	Coeficiente de enzima de absorção molar	Nm

Lista de abreviações

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
5-HMF	<i>5</i> -(hidroximetil)- <i>furfural</i>
ABS	Absorbância
AR	Açúcar redutor
ART	Açúcar redutor total
ATP	Adenosina trifosfato
CAPEX	Despesas de capital ou investimento em bens de capital
CO_2	Dióxido de carbono (Gás carbônico)
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do bioetanol
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CUG	Citosina, uracila e guanina
CDW	Massa seca celular (concentração de célula)
DTT	Ditiotreitol
E2G	Etanol de segunda geração
fc	Fator de conversão dos gases
FEQ	Faculdade de engenharia química

HDM	Hamilton device manager
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
LPM	Litros por minuto
mM	Milimolar
N ₂	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
Nm	Nanômetros (comprimento de onda)
O ₂	Oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
OGM	Organismo geneticamente modificado
ORP	Potencial de oxirredução (Oxidation Reduction Potential)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
P	Produto
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
S	Substrato
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
UNICAMP	Universidade estadual de Campinas
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
X	Concentração de célula
XDH	Xilitol desidrogenase
XR	Xilose redutase
YPX	Extrato de levedura, peptona e xilose

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
1.1	Objetivos	23
1.1.1	Objetivos específicos:.....	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1	Biomassa lignocelulósica e seu papel na produção de E2G	25
2.2	Fermentação alcoólica a partir de pentoses.....	31
2.3	<i>Spathaspora passalidarum</i> – uma levedura consumidora de xilose....	34
2.4	Efeito da aeração no metabolismo de produção de etanol a partir de pentoses em leveduras não-convencionais	36
2.5	Efeito do potencial redox no metabolismo de produção de etanol a partir de pentoses em leveduras não-convencionais	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	Microrganismos e meio de cultura.....	42
3.2	Reativação celular.....	42
3.3	Propagação	42
3.4	Fermentação	43
3.4.1	Fermentação em batelada com diferentes valores de k_{La}	43
3.4.2	Propagação em batelada (condição de aerobiose estrita).....	44
3.5	Transferência de massa.....	45
3.5.1	Determinação da concentração de saturação em O_2 (C_s).....	45
3.5.2	Determinação da Concentração Crítica de Oxigênio Dissolvido (C_{CRIT})	47
3.5.3	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})	48
3.5.4	Determinação do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_{La}) e da Velocidade Específica de Respiração (Q_{O_2}) para aerobiose (propagação)	50
3.6	Metodologia Analítica.....	52
3.7	Viabilidade Celular	53
3.8	Cálculo de Parâmetros Cinéticos	53
3.9	Monitoramento de gases de entrada e saída durante as fermentações	54
3.10	Caracterização da atividade enzimática (enzimas XR e XDH).....	57
3.10.1	Amostragem e preparação das células	57
3.10.2	Determinação de proteínas e análise enzimática	57

3.10.3	Atividade de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Determinação da concentração de saturação em O_2 (C_s)	59
4.2	Determinação da Concentração Crítica de Oxigênio Dissolvido (C_{CRIT})	61
4.3	Fermentação em batelada com diferentes valores de k_{La}	62
4.4	Propagação em batelada (condição de aerobiose)	70
4.5	Estimação de parâmetros cinéticos e de respiração	77
4.6	Caracterização da atividade enzimática (enzimas XR e XDH)	83
4.7	Potencial de oxirredução (ORP)	89
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	97
5.1	Sugestões para trabalhos futuros	99
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
	APÊNDICE A	110

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Devido à sua extensão territorial e aos seus recursos naturais, o Brasil conta com excelentes condições para o desenvolvimento da agroenergia, a qual, segundo dados do governo, é responsável por cerca de 32 % da energia ofertada no país, colocando o Brasil na liderança mundial do setor. Os biocombustíveis, obtidos a partir de biomassa, podem substituir combustíveis fósseis, sendo uma boa alternativa do ponto de vista econômico e ambiental (MAPA, 2011; MALUF, 2014).

Através da utilização do etanol de primeira geração, isto é, produzido a partir do caldo de cana-de-açúcar, há uma redução da emissão de compostos químicos, assim como o estabelecimento de um balanço energético favorável e a reciclagem do carbono presente no ciclo. Porém, usinas sucroalcooleiras geram um elevado volume de resíduos e a recuperação dos compostos presentes neste material torna-se um adicional do processo (MAPA, 2011; MALUF, 2014). O bagaço de cana-de-açúcar, classificado como biomassa lignocelulósica, é uma matéria-prima composta por açúcares mistos, os quais, a partir de tratamentos específicos, como a hidrólise, resultam em licões fermentáveis, possibilitando a obtenção de biocombustíveis (etanol de segunda geração), agregando valor ao resíduo (CADETE e ROSA, 2018; ROSSELL e ZAINAGHI, 2008).

Sendo assim, o etanol de segunda geração surge como uma importante opção na matriz energética brasileira. Além de se apresentar viável, pode ser obtido a partir da hidrólise de uma vasta gama de matérias-primas além do bagaço de cana-de-açúcar, dentre as quais destacam-se recursos florestais, como pedaços de árvores e madeiras, e descartes de lixo urbanos ou agrícolas, como resíduos de colheitas e do processamento industrial (RAMIREZ, 2010; PINTO 2010; MALUF, 2014).

O material lignocelulósico é composto, principalmente, por celulose, hemiceluloses e lignina. As frações celulósica e hemicelulósica são formadas por unidades de açúcares, majoritariamente, hexoses e pentoses, respectivamente (SILVA et al, 2012; FENGEL e WEGENER, 1989). As pentoses podem representar até 20 % do açúcar constituinte do material, sendo primordial a utilização desta fração para elevar a eficiência da produção de biocombustíveis

(PAULY et al., 2013; CADETE e ROSA, 2018). A partir da ação de microrganismos capazes metabolizar pentoses, esse carboidrato pode ser utilizado para obtenção de uma variedade de compostos, como etanol e produtos de valor agregado com diferentes aplicações industriais (CGEE, 2001; MALUF, 2004; CHATURVEDI e VERMA, 2013). Dentre esses microrganismos, as leveduras *Scheffersomyces stipitis* (antes denominada *Pichia stipitis*) e *Spathaspora passalidarum* (recentemente isolada, NGUYEN et al., 2006) possuem a capacidade natural de fermentar pentoses, demonstrando potencial para serem utilizadas na fermentação alcoólica para obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica ou como fonte de genes responsáveis pelo metabolismo da xilose para modificação genética de cepas já utilizadas industrialmente, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae* (CADETE e ROSA, 2018).

A fermentação eficiente desses carboidratos é um importante pilar para a produção em larga escala de biocombustíveis, sendo que a otimização do processo é de extrema importância para elevar a produtividade e acelerar a produção. A levedura *S. stipitis* se destaca pela superioridade de rendimentos e produtividades quando comparada a fungos e bactérias nativas capazes de utilizar xilose, porém requer condições de baixa disponibilidade de oxigênio para elevar as velocidades específicas de consumo de carboidratos e formação de etanol. Estudos que apresentaram os melhores resultados fermentativos estavam na faixa de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) entre 2,3 e 4,9 h^{-1} (MCMILLAN, 1993; SILVA et al., 2012, SANTOS et al., 2015).

A levedura *S. passalidarum*, assim como *S. stipitis*, foi isolada do intestino de besouros vivendo no interior de madeira podre, sendo que a capacidade de metabolizar os açúcares presentes em material lignocelulósico com pouca disponibilidade de oxigênio é atribuída a este fato (NGUYEN et al., 2006; GARCIA-OCHOA E GOMEZ, 2009; WOHLBACH et al., 2011). Hou (2012) realizou experimentos comparando essas leveduras e observou melhores resultados em condição de anaerobiose para *S. passalidarum*. Nesse mesmo estudo, foi observado que, em condição de maior disponibilidade de oxigênio, *S. passalidarum* consumiu a mesma quantidade de carboidratos em menos tempo, porém o excesso de oxigênio causou o desvio do metabolismo para o

crescimento celular, diminuindo os rendimentos em etanol, o que é característica de um microrganismo *Crabtree* negativo.

Outro trabalho de comparação dessas leveduras, porém, em condição de microaeração, registrou velocidades específicas mais elevadas para a produção de etanol em meio composto por xilose para *S. passalidarum*, assim como as maiores produtividades tanto para um meio contendo somente pentose quanto em uma mistura de xilose e glicose (80 e 20 % respectivamente (Su et al. 2015). Já Veras et al. (2017), avaliando o desempenho da levedura *S. passalidarum* em condições de aeração, microaeração e anaerobiose, obteve os melhores resultados relacionados à produção de etanol em um menor tempo na condição de oxigênio limitado (aeração de 0,5 L.min⁻¹ em 0,5 L de meio, sem valor de k_{La} definido).

A condição de baixa concentração de oxigênio (quando comparada à anaerobiose), além de acelerar a velocidade de consumo dos carboidratos e formação de etanol, auxilia na produção de energia (ATP) e na reoxidação das coenzimas essenciais na rota metabólica da xilose, influenciando na determinação do fluxo de carbono dentro da célula. A xilose é transportada para dentro da célula e reduzida a xilitol pela ação da enzima xilose redutase (XR), dependente das coenzimas NADH e NADPH. Em seguida, xilitol é oxidado a D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), utilizando a coenzima NAD⁺. Em ausência de oxigênio, a coenzima NADH não é suficientemente oxidada a NAD⁺, resultando em um desbalanço redox e causando a interrupção da via oxidativa da xilose. Em aerobiose, por mais que não ocorra o desequilíbrio devido ao oxigênio ser acceptor final de elétrons, o fluxo metabólico respiratório é favorecido, elevando o crescimento celular e afetando os rendimentos em etanol. Já em condição de microaeração, existe uma regeneração de coenzimas, minimizando o desequilíbrio, porém sem grandes desvios da via metabólica, melhorando o fluxo da via oxidativa da xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; HOU, 2012; CAMPOS, 2015).

Com isso, conhecer o real efeito da disponibilidade de oxigênio no metabolismo desta levedura, possibilitando, assim, a determinação da melhor faixa de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), se torna um importante pilar para a otimização da fermentação alcoólica com *S. passalidarum*, tendo em vista o potencial deste microrganismo para aplicação

industrial na produção de etanol de segunda geração. O acompanhamento do potencial de oxirredução auxilia no entendimento dos efeitos que ocorrem dentro da dorna de fermentação em baixos níveis de oxigênio, sendo uma ferramenta para compreensão do equilíbrio redox relativo à rota de assimilação da xilose, o qual pode ser relacionado às atividades das enzimas XR (xilose redutase) e XDH (xilitol desidrogenase).

1.1 Objetivos

O trabalho tem como objetivo central estudar a influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) no desempenho fermentativo da levedura *S. passalidarum*, determinando, portanto, a melhor faixa de operação para maximizar a produção de etanol.

1.1.1 Objetivos específicos:

- Realizar propagação da levedura em modo batelada, utilizando xilose e glicose comerciais como fonte de carbono, com baixa concentração celular inicial e em processo com oxigênio dissolvido mantido em 50% em relação à saturação com ar atmosférico e k_{La} variável, com o objetivo de determinar parâmetros cinéticos respiratórios da levedura;
- Realizar fermentações em modo batelada, utilizando xilose e glicose comerciais como fonte de carbono (na proporção 70% e 30%, respectivamente, totalizando 90 g.L⁻¹ de açúcar), com alta concentração celular inicial (17 g.L⁻¹), em anaerobiose, visando conhecer a cinética de X, P e S nesta condição;
- Realizar fermentações em modo batelada, utilizando xilose e glicose comerciais como fonte de carbono (na proporção 70% e 30 %, respectivamente, totalizando 90 g.L⁻¹ de açúcar), com alta concentração celular inicial (17 g.L⁻¹), empregando diferentes condições de microaerofilia (k_{La} 4,9; 8,0 e 45,0 h⁻¹), visando conhecer a cinética de X, P e S nestas condições;
- Definir parâmetros e variáveis de processo: μ_{max} (velocidade específica máxima de crescimento celular, h⁻¹), Q_{O_2X} (velocidade específica de consumo de oxigênio, mg_{O₂}.g_{cel}⁻¹.h⁻¹), Q_{O_2} (velocidade de consumo de oxigênio, mg_{O₂}.L⁻¹.h⁻¹), Q_{CO_2X} (velocidade específica de formação de CO₂,

$mg_{CO_2} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$), Q_{CO_2} (velocidade de formação de CO_2 , $mg_{CO_2} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$), m_{O_2} (velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular, $mg_{O_2} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$), μ_S (velocidade específica de consumo de carboidratos, $g_S \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$), μ_P (velocidade específica de produção de etanol, $g_{EtOH} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$), Q_P (produtividade volumétrica, $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de carboidratos em etanol, $g_{EtOH} \cdot g^{-1}$), $Y_{X/S}$ (fator de conversão de carboidratos em células, $g_{cel} \cdot g^{-1}$), Y_{X/O_2} (fator de conversão de oxigênio em células, $g_{cel} \cdot g_{O_2}^{-1}$) e rendimento (%);

- Avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio sobre a atividade enzimática na via de metabolização da xilose – enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH);
- Avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio sobre o potencial de oxirredução, e determinar a melhor faixa para favorecer a produção de etanol;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica e seu papel na produção de E2G

Como consequência do aumento da demanda energética global, resultado do crescimento populacional e da industrialização, houve uma elevação da utilização de fontes não-renováveis de energia (petróleo, carvão e gás). A fim de reduzir a dependência desses combustíveis e minimizar os efeitos ambientais causados pelo seu uso, novas políticas de apoio à pesquisa e incentivos ao uso de combustíveis renováveis têm sido criadas (IPCC, 2014; GUPTA e VERMA, 2015; UNCTAD, 2016).

O desenvolvimento da indústria de biocombustíveis mostra vantagens em relação aos combustíveis fósseis para o abastecimento sustentável, diversidade de fontes de biomassa, independência e segurança elétrica, desenvolvimento rural, redução de gases de efeito estufa, promovendo o reciclo de carbono no processo (TAI e STEPHANOPOULOS, 2012). Sendo assim, como alternativa ao petróleo, novas fontes de energia foram apontadas para redução dos impactos causados pelo setor energético, destacando-se a produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas de origem agrícola (biomassa) (MAPA, 2006; GOUVEIA et al., 2009; SILVA, 2007).

Nesse contexto, o setor sucroalcooleiro brasileiro tem importante papel no mercado nacional e internacional, devido ao elevado desempenho produtivo de etanol e à avançada tecnologia para obtenção deste biocombustível, ganhando destaque na sua utilização como combustível a partir da criação do programa Brasileiro Pró-álcool (SILVA, 2007). Na época, o programa, já classificado como o maior programa em larga escala mundial focado em energias renováveis, se tornou referência mundial, devido à substituição de 40% da gasolina utilizada como combustível. Com os incentivos gerados pelo programa, foi observado o aumento da capacidade instalada, tanto de infraestrutura de processamento (usina) e armazenamento deste material, como de plantio, tornando o país líder mundial na produção de bioetanol (BRASIL, 2006; DUSSÁN et al., 2016).

Os números para a safra de 2017/2018, na região Centro-sul do Brasil, chegam a cerca de 596 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processada, produzindo 26 bilhões de litros de bioetanol (UNICA, 2018). Como resultado da

produção de etanol de primeira geração (1G), cada tonelada de cana processada gera, em média, 250 kg de bagaço em base úmida. Sendo assim, estima-se que foram gerados, aproximadamente, 149 milhões de toneladas de bagaço em base úmida (VASCONCELOS et al., 2013). Em função do elevado volume, este material é classificado como o principal resíduo lignocelulósico produzido no Brasil (CGEE, 2001). Parte deste material (com parte da palha) é utilizado na cogeração de energia (queima em caldeira para suprir a demanda energética do processo de produção de açúcar e bioetanol da própria usina). Entretanto, a necessidade de melhorar a sustentabilidade do processo tem sido objeto de pesquisas em todo o mundo, otimizando a utilização de energia, juntamente com a adequação dos resíduos gerados em grandes volumes (DIAS et al., 2009; CNA, 2013; CGEE, 2001, STAMBUK et al., 2008).

Nesse cenário, os polissacarídeos presentes nestes materiais lignocelulósicos despertam interesse como matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração (2G), devido a sua grande disponibilidade, riqueza em açúcares e, principalmente, por não competirem com a produção e fornecimento de alimentos, visto que se trata de matéria-prima não comestível, e não requererem aumento da área de plantio para elevação do volume de bioetanol produzido (MAPA, 2006; GOUVEIA et al., 2009; SILVA, 2007).

Trabalhos reportados na literatura descrevem que a estrutura dessa fibra vegetal do bagaço da cana é majoritariamente constituída por porções de celulose (38,4 %), com uma considerável fração de hemicelulose (23,2 %), entrelaçados por lignina e outros compostos em menor quantidade (RABELO et al., 2011), como é possível observar na Figura 1.

Figura 1: Composição da parede celular de biomassas lignocelulósicas (amarelo: hemicelulose; verde: celulose; marrom: lignina).



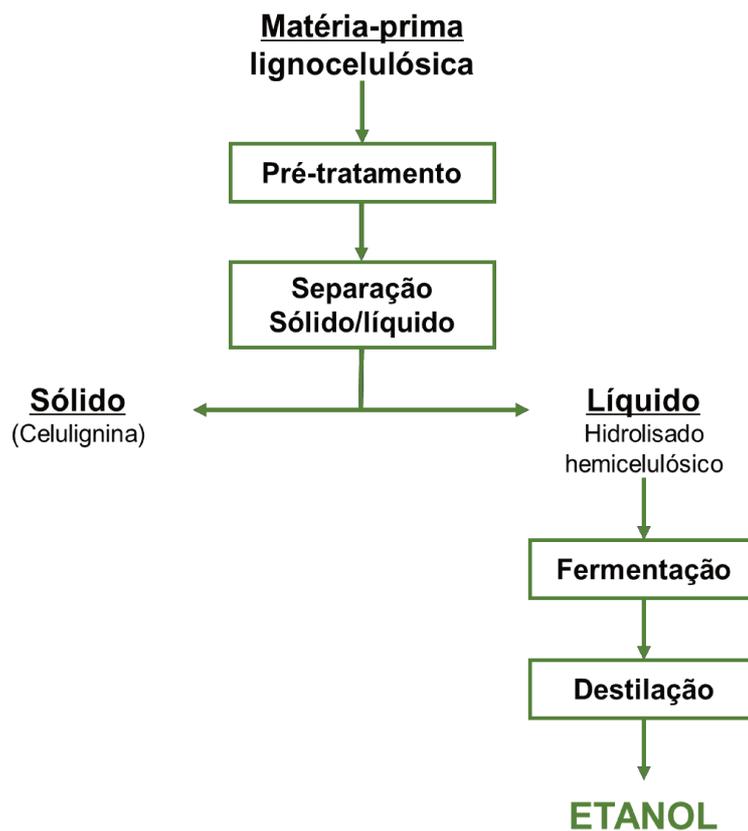
Fonte: SCISTYLE, 2018

As hemiceluloses, apesar de fazerem parte de todas as camadas da parede celular, estão mais concentradas nas camadas primária e secundária, interagindo com a celulose e conferindo maleabilidade à estrutura. Este heteropolímero é composto por unidades de açúcares tais como pentoses (açúcares de 5 carbonos, como a arabinose e xilose) e hexoses (açúcares de 6 carbonos, como a galactose, glicose e manose), e também por grupos de acetilas. Dentre esses compostos, a arabinoxilana é o principal constituinte, sendo obtido durante a desconstrução da hemicelulose através da etapa de pré-tratamento na forma de arabinose e xilose (FENGEL e WEGENER, 1989; RABELO, 2010; ROCHA et al., 2011).

Nesse contexto, para viabilizar a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, são necessárias etapas de fracionamento desta matéria-prima em açúcares monoméricos. As hemiceluloses, devido ao seu caráter amorfo e ramificado, são mais vulneráveis à hidrólise por reagentes químicos quando comparada à celulose. Sendo assim, dependendo do tipo de pré-tratamento, é possível alcançar a hidrólise quase completa da hemicelulose em monossacarídeos (majoritariamente pentoses), correspondendo à fração líquida gerada nesta etapa do processo, a qual é denominada hidrolisado hemicelulósico, como é mostrado na Figura 2 (FENGEL e WEGENER, 1989; SUN e CHENG, 2002; SILVA, 2007; CGEE, 2010; de SALES et al., 2015). Vale ressaltar que a separação da corrente de pentoses após o pré-tratamento para posterior fermentação é apenas uma das opções de processo, sendo que outras

opções englobam a não separação desta corrente com a obtenção de um caldo rico em hexoses e pentoses (fermentação simultânea) ou a utilização de outros pré-tratamentos que liberem ambos os açúcares no mesmo caldo, bem como a possibilidade de realizar a sacarificação e a fermentação simultaneamente (RABELO, 2010).

Figura 2: Fluxograma da produção de etanol a partir da hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica.



O pré-tratamento é uma etapa cujo objetivo principal é a preparação da matéria-prima, desconstruindo a estrutura da fibra vegetal. Ao mesmo tempo que causa a dissolução da hemicelulose, torna a estrutura da celulose acessível ao processo de hidrólise enzimática, etapa responsável pela obtenção do hidrolisado celulósico, uma vez que reduz o grau de cristalização das fibras de celulose e causa alteração na composição do material (HSU et al., 1980; SUN e CHENG, 2002; CGEE, 2010; RABELO, 2010). A Figura 3 mostra a desestruturação da matéria-prima lignocelulósica após a etapa de pré-tratamento, onde é possível observar o aumento da área superficial da fibra e a remoção da hemicelulose.

Figura 3: Desconstrução da biomassa lignocelulósica causada pelo pré-tratamento (amarelo: hemicelulose; verde: celulose; marrom: lignina).



Fonte: SCISTYLE, 2018

Rabelo (2010), ressalta que esta é uma das etapas mais relevantes do processo no ponto de vista econômico, devido ao custo direto associado e à capacidade de influenciar os custos referentes ao restante do processo. Sendo assim, o pré-tratamento deve apresentar um bom rendimento, funcionalidade e simplicidade operacional.

As técnicas mais utilizadas para essa finalidade podem ser divididas entre processos físicos, químicos ou biológicos, sendo possível a combinação destas (SUN e CHENG, 2002). A utilização de agentes químicos como, por exemplo, ácido diluído, tem se mostrado promissora para utilização em escala industrial por apresentar custos de operação relativamente baixos, além de ser rápida e simples, atingindo elevadas eficiências de conversão da hemicelulose em monossacarídeos (de 80 a 100%), resultando em elevada produção de xilose (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; RABELO, 2010, SANTOS et al., 2012).

A Tabela 1 descreve a composição de alguns hidrolisados hemicelulósicos obtidos pela etapa de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído. É possível observar uma proporção de açúcares média de 70-85% xilose e 15-30% de glicose.

Tabela 1: Composição de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar a partir de tratamento ácido sulfúrico.

	Rocha et al.		Zhang et al.
	(2011)		(2012)
Ácido Sulfúrico (%)	1	1	-
Ácido Acético (%)	1	1	-
Ácido Clorídrico (%)	-	-	1,2
Temperatura (°C)	190	190	130
Tempo (min)	10	10	30
Proporções Biomassa (sólido-líquido)	1,5:10	1:10	1:10
Glicose (g.L⁻¹)	3,67	3,09	1,00
Xilose (g.L⁻¹)	9,04	9,33	5,00
Ácido Acético (g.L⁻¹)	2,21	2,89	4,60
Furfural (g.L⁻¹)	0,05	0,10	5,60
5-HMF (g.L⁻¹)	0,01	0,02	0,30

A desvantagem desse tipo de pré-tratamento é que, além da liberação de açúcares, outros compostos são gerados, como é possível observar na Tabela 1. Estes compostos são classificados como compostos inibitórios, pois são prejudiciais ao metabolismo celular (PALMQVIST e HAHN-HAAGERDAL; 2000; TAHEZARDEH e KARIMI, 2011). Podem ser divididos em grupos de ácidos orgânicos, compostos furânicos e fenólicos. O ácido acético se enquadra no grupo dos ácidos orgânicos e é gerado durante a desestruturação do acetil da molécula de hemicelulose (FENGEL e WEGENER, 1989; ALMEIDA et al., 2007). Dentre os inibidores, é o que mais prejudica o metabolismo das leveduras, seguido do furfural. Concentrações desse ácido acima de 2,5 g.L⁻¹ pode afetar fortemente o metabolismo da maioria das leveduras (DU PREEZ, 1994). Segundo Soares et al. (2018), uma concentração de ácido de 1,5 g.L⁻¹ inibiu o consumo de 40 % do açúcar e a produção de etanol caiu 20 % em relação ao controle para a fermentações com a levedura *S. passalidarum* NRRL Y-27907, chegando à conclusão de que, para que as fermentações com essa levedura tenham um desempenho satisfatório, os valores máximos de inibidores devem ser de até 0,5 g.L⁻¹ de ácido acético, 1,0 g.L⁻¹ de furfural e 3,0 g.L⁻¹ de 5-HMF.

Morales et al. (2017), observou uma queda de quase 90% na produtividade volumétrica de etanol pela *S. passalidarum* quando adicionada uma concentração de 4,5 g.L⁻¹ de ácido acético em meio contendo glicose. Sendo assim, é necessário levar em consideração a complexidade do meio na seleção de microrganismos capazes de metabolizar os carboidratos presentes do hidrolisado hemicelulósico.

2.2 Fermentação alcoólica a partir de pentoses

Lima (2002), refere-se à fermentação alcoólica como um processo biológico que ocorre por meio da ação de microrganismos sobre os açúcares contidos numa solução. Trata-se do processo responsável pela transformação de açúcares em álcool, gás carbônico e energia para o crescimento e a manutenção das atividades metabólicas, como mostra a Equação I, a qual mostra a conversão da glicose em etanol.



Estequiometricamente, a cada kg de glicose metabolizada é possível produzir 0,51 kg de etanol e 0,49 kg de dióxido de carbono, admitindo-se o máximo rendimento teórico.

No caso da xilose (Equação II), cada 3 moles deste açúcar possibilita a obtenção teórica de 5 moles de etanol e 5 moles de CO₂. Mas, na prática, assim como na conversão de glicose, esse rendimento estequiométrico não é alcançado em virtude de que parte deste substrato é utilizado pelo microrganismo para o seu crescimento e manutenção celular, formando outros subprodutos (OLIVEIRA, 2010).



Segundo Schmidell (2001), o sucesso de um processo fermentativo depende de quatro pilares: microrganismo, meio de cultura, condução deste processo e recuperação do produto. Estes pontos básicos interagem entre si e a definição destas variáveis deve ser feita de modo conjunto, levando em conta os aspectos econômicos e biológicos. Diversos fatores podem influenciar no processo de fermentação e alterar a eficiência da conversão de açúcar em

etanol, sendo eles: os físicos, como a temperatura e a pressão osmótica; os químicos que envolvem o pH, a oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, além da presença de inibidores; os agentes microbiológicos dependem da espécie utilizada, linhagem e concentração de levedura e a possível contaminação bacteriana (PIMENTA, 2010). Neste contexto, o aumento da concentração celular tem sido utilizado para promover a melhora de processo, estratégia que vem sendo aplicada nas usinas de primeira geração. Estudos já reportaram a elevação da produtividade volumétrica (BRETHAUER e WYMAN, 2010; SANTOS et al., 2016), aumento das velocidades de consumo de substrato e de produção de etanol e, conseqüentemente, a aceleração do processo fermentativo (AGBOGBO et al., 2007) através da utilização de alta densidade celular, embora mais xilitol tenha sido excretado ao meio.

Diversos microrganismos têm a capacidade de converter carboidratos em etanol, como bactérias, fungos e leveduras. No Brasil, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes linhagens, como Pe-2, CAT-1 e BG-1 (BASSO et al., 2008), ainda é o microrganismo mais utilizado em escala industrial para fermentação de uma ampla variedade de hexoses, como a glicose e a frutose provenientes do melaço de cana-de-açúcar, tendo em vista seu bom rendimento de conversão destes açúcares a etanol (1G) (MILLATI et al., 2004). Vale ressaltar que essas linhagens de leveduras acumularam características genéticas próprias ao longo das safras, segundo um trabalho publicado pela Basso e colaboradores (2008). Nesse contexto, a linhagem que começa um processo não é a mesma que chega ao final, devido às condições de elevada temperatura e crescentes concentrações de etanol no meio, onde somente as mais robustas são capazes de sobreviver (FIORAVANTI, 2009). Uma pesquisa focada em analisar a linhagem Pe-2 observou que, em comparação com a levedura *S. cerevisiae* S288c, foi registrada a mesma quantidade de genes e cromossomos. Porém, a Pe-2 possuía 16 genes diferentes dos registrados na linhagem de referência, sendo esses genes responsáveis pela resistência da levedura no interior da dorna de fermentação. Sendo assim, concluiu-se que foi durante a aplicação e os constantes ciclos que leveduras nativas adquiriram resistência e se tornaram os microrganismos mais importantes para a produção de etanol brasileiro.

No caso dessa levedura, ocorrem dois efeitos importantes relacionados ao oxigênio e à fonte de carbono, denominados Efeito *Crabtree* e Efeito *Pasteur*. *S. cerevisiae* é considerada uma levedura *Crabtree* positiva, pois, em altas concentrações de substrato e na presença de oxigênio, seu metabolismo oxidativo sofre repressão (redução da taxa de respiração), sendo desviado para a rota fermentativa. Esse desvio ocorre devido à repressão catabólica causada pela presença de glicose, diminuindo a velocidade específica de consumo de O₂. Nesse caso, quando o objetivo for a produção de etanol, a fonte de carbono deve estar em altas concentrações. Já em uma baixa concentração de glicose, a quantidade de oxigênio disponível influencia na via de metabolização da glicose, denominado *Efeito Pasteur*. Nessa condição, em aerobiose, há uma diminuição no fluxo metabólico na via glicolítica, causando um desvio do metabolismo fermentativo para o metabolismo respiratório, prevalecendo a produção de biomassa em detrimento da produção de etanol (CRABTREE, 1929; PASTEUR, 1981; BARNETT e ENTIAN; 2005).

Entretanto, este microrganismo é incapaz de fermentar pentoses provenientes do pré-tratamento da fração hemicelulósica, como a xilose, (SILVA, 2007; SU et al., 2015), a não ser que seja geneticamente transformada para expressar enzimas competentes (KUYPER et al., 2005; SANCHEZ et al., 2010; FUJII et al., 2011; MA et al., 2012; KIM et al., 2013). Embora tenha uma eficiência aceitável, a utilização de microrganismos geneticamente modificados (OGM) pode se tornar inviável em escala industrial, devido a sua instabilidade e por requererem meios de cultura complexos, encarecendo o processo em larga escala (SILVA, 2007; SCHMIDELL, 2001; LI et al., 2015). Além disso, algumas modificações genéticas, principalmente as que incluem genes heterólogos, requerem contenção, ou seja, são necessárias condições que não permitam o escape ou a liberação do microrganismo para o meio ambiente, sendo que esse processo requer maiores cuidados de operações como plantas que operem com dornas fechadas e a descontaminação de todo material gerado no processo. Esses cuidados adicionais acaretam num maior custo de operação e de projeto de instalação (BRASIL, 2018; BRASIL, 2006).

Nesse contexto, a fermentação industrial com cepas nativas é mais simples e mais barata do que a fermentação com cepas modificadas, além de que linhagens nativas podem adquirir evoluções durante sua utilização, tornando-

se mais resistentes e com melhores desempenhos, assim como foi observado para as linhagens de *S. cerevisiae* (Pe-2 e CAT) utilizadas hoje nas usinas brasileiras de primeira geração. Sendo assim, leveduras naturalmente capazes de fermentar pentoses ganham destaque.

2.3 *Spathaspora passalidarum* – uma levedura consumidora de xilose

Dentre as leveduras naturalmente capazes de converter xilose em etanol, estão *S. stipitis*, cuja utilização para produção de bioetanol é amplamente explorada desde a década de 80 (FARIAS et al., 2014; SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2012; NAKANISHI et al., 2017) e *Spathaspora passalidarum*, a qual foi mais recentemente isolada (NGUYEN, 2006; HOU, 2012; LONG et al., 2012). Ambas são encontradas no intestino de besouros (larvas e adultos). Suas evoluções associadas a besouros vivendo no interior de madeira podre são, provavelmente, responsáveis por sua capacidade de metabolizar uma ampla faixa de açúcares presentes em materiais lignocelulósicos e de crescerem em ambientes com condições limitadas de oxigênio, condição semelhante do intestino (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009; NGUYEN et al., 2006; SLININGER et al., 2015).

O gênero *Spathaspora* possui 22 espécies, das quais 3 possuem metabolismo preferencialmente voltado para a produção de etanol a partir de xilose, enquanto as demais são consideradas produtoras de xilitol (CADETE e ROSA, 2018). A levedura *S. passalidarum* é integrante do pequeno grupo de leveduras selvagens capazes de assimilar e fermentar a xilose. Ensaios realizados por Campos (2015) comparando o desempenho fermentativo desta levedura com *S. arborariae* e *S. stipitis* em meio contendo 10% de xilose resultaram em maior rendimento em menor tempo para *S. passalidarum* ($Y_{P/S}$ de $0,42 \text{ g g}^{-1}$ em 40 h, com produtividade de $0,94 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$), destacando-se como a melhor espécie para a produção de etanol, com altos rendimentos e produtividades sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio (CADETE e ROSA, 2018).

A utilização de microrganismos eficientes para conversão de carboidratos obtidos da biomassa lignocelulósica é fundamental para o sucesso de um processo fermentativo e viabilização da implementação da tecnologia. Como já mencionado, o hidrolisado hemicelulósico obtido por tratamento ácido, além de

xilose, é composto por, aproximadamente, 30% de glicose e porções menores de celubiose (SANTOS et al., 2015; ROCHA et al., 2011). Nesse contexto, deve-se levar em conta a necessidade da utilização de microrganismos capazes de metabolizar uma ampla gama de açúcares. Para algumas leveduras, a presença de hexoses pode reprimir a metabolização das pentoses. Entretanto, estudos realizados com a mistura desses açúcares reportaram a capacidade da *S. passalidarum* de consumir simultaneamente açúcares em processos microaerófilos (SU et al., 2015) e aeróbicos (HOU, 2012), favorecendo a co-fermentação e destacando essa levedura com uma boa candidata para a utilização industrial na produção de etanol 2G (LONG et al., 2012; CADETE e ROSA, 2018).

Estudos reportados na literatura enfatizam a comparação de *S. passalidarum* e *S. stipitis* (amplamente investigada), sendo que destacam a superioridade nos resultados obtidos pela *S. passalidarum* sob mesmas condições de fermentação, tornando essa levedura mais promissora. Nakanishi et al. (2017) compararam o desempenho de ambas as leveduras em hidrolisado hemicelulósico obtido de pré-tratamento alcalino seguido de hidrólise da cana-de-açúcar (meio composto por aproximadamente 75% glicose e 25% xilose), em que foi adotada a estratégia de batelada alimentada com alta densidade celular e reciclo de células. A cada reciclo, observou-se elevação da produtividade volumétrica em etanol, sendo o maior ganho e o maior título associado a *S. passalidarum*. Para a levedura *S. stipitis*, a produtividade aumentou de 0,35 para 0,38 g.L⁻¹.h⁻¹ (primeira e terceira bateladas), sendo 15 g.L⁻¹ a maior concentração de etanol, enquanto que, para *S. passalidarum*, a produtividade foi de 0,38 a 0,81 g.L⁻¹.h⁻¹ (primeira e quarta bateladas) e a concentração máxima de etanol foi de 21 g.L⁻¹.

Su et al. (2014) e Hou (2012) também compararam a cinética para essas duas leveduras em diferentes condições e meios, e, em ambos os trabalhos, *S. passalidarum* mostrou ser uma levedura nativa fermentadora de xilose superior. No trabalho de Hou (2012), tanto em anaerobiose como em aerobiose, em meio contendo mistura de glicose e xilose, a produção de etanol foi mais eficiente para a *S. passalidarum* (valores acima de 25 g.L⁻¹) do que para *S. stipitis* (abaixo de 15 g.L⁻¹) no tempo de completa exaustão de açúcar. Entretanto, para *S. passalidarum*, em anaerobiose, esse consumo foi observado após 90 h,

enquanto que na presença de oxigênio esse tempo reduziu para aproximadamente 20 h.

Em outro trabalho, Veras et al. (2017), utilizando apenas xilose como fonte de carbono, obteve fator de conversão de xilose em células 2,5 vezes maior para a aerobiose do que para a condição de oxigênio limitado, ocasionando uma queda no rendimento em etanol em torno de 60%. Isso pode ser explicado, pois, segundo du Preez (1994), a disponibilidade de oxigênio determina a divisão do fluxo de carbono entre crescimento e formação de produto, interferindo no rendimento fermentativo. Sendo assim, conhecer a influência da disponibilidade de oxigênio se torna importante para otimização do processo.

2.4 Efeito da aeração no metabolismo de produção de etanol a partir de pentoses em leveduras não-convencionais

Sabendo que, para leveduras *Crabtree* negativas, a presença de elevada concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura reflete em desvio do metabolismo para a via oxidativa, favorecendo o crescimento celular e refletindo em baixos rendimentos em etanol, diversos estudos têm avaliado a relação entre aeração e fermentação de pentoses para estas leveduras (SREENATH et al., 1986; SKOOG e HAHN-HAGERDAL, 1990; DU PREEZ, 1994; HOU, 2012).

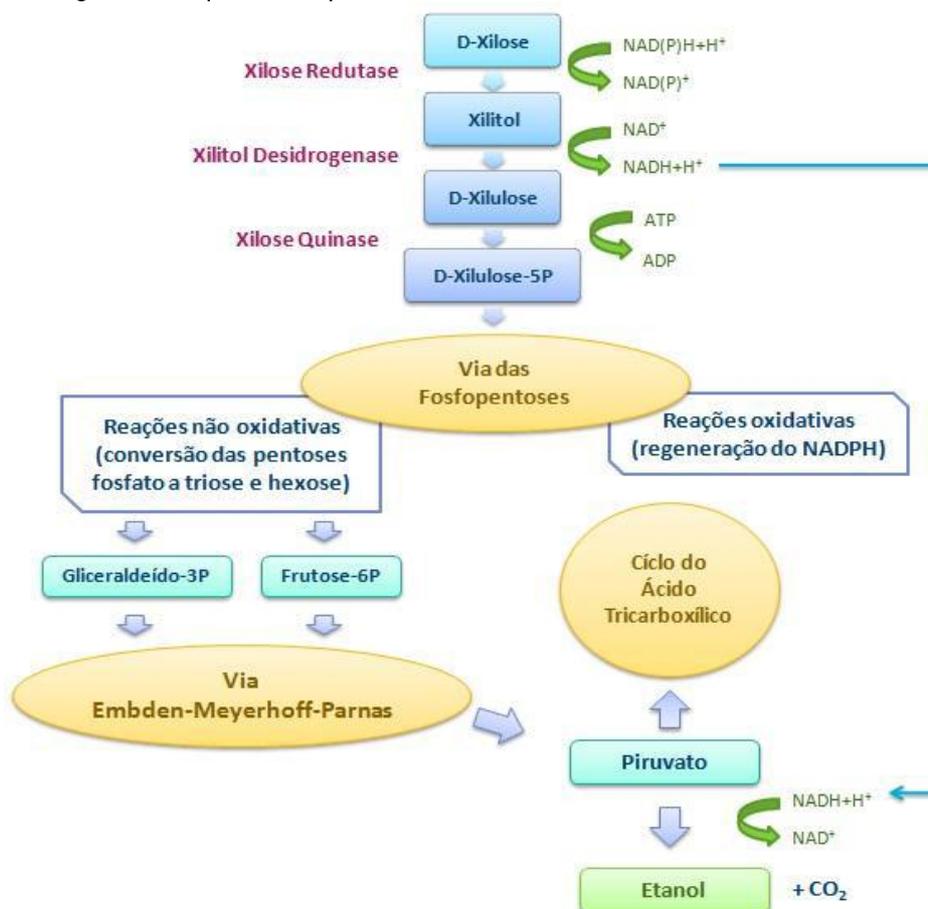
Segundo Du-Preez (1994), a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no meio é de extrema importância para favorecer a manutenção das atividades respiratórias de um conjunto de células envolvidas em um sistema fermentativo. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) descreve as condições de fornecimento do oxigênio de um processo e está relacionado a diversos fatores, entre eles a velocidade de agitação, o fluxo de ar, a geometria do reator, as propriedades do meio (como densidade e viscosidade), além de pressão e temperatura de operação. Este coeficiente descreve muito bem a oxigenação de um sistema fermentativo e sua definição possibilita a comparação de processos com diferentes características.

Neste contexto, já é conhecido que para *S. stipitis* a produção de etanol a partir de xilose é maximizada sob um k_{La} de $4,9 \text{ h}^{-1}$, ou seja, esta levedura necessita de condições monitoradas de microaerofilia para otimizar a produtividade (SILVA et al., 2012). Também foi observado que linhagens de *S.*

cerevisiae geneticamente modificadas para o consumo de xilose (com genes para expressar as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *S. stipitis*) também necessitam de condição de microaerofilia (JIN et al., 2004). Para a levedura *S. passalidarum*, entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura que buscam determinar a melhor faixa de k_{La} para maximização da produção de etanol.

Na maioria das leveduras consumidoras de xilose, a primeira etapa de metabolização é a redução deste açúcar a xilitol através da enzima xilose redutase (XR), a qual tem especificidade pelas coenzimas NADPH ou NADH. Em seguida, xilitol é oxidado a D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), a qual tem especificidade pela coenzimas NAD^+ (Figura 4). A fosforização até D-xilulose-5-fosfato acontece pela ação catalítica da enzima xilulose quitanase, ocorrendo consumo de ATP, sendo então metabolizado na via das fosfopentoses, originando os metabólitos frutose-6P e gliceraldeído-3P. Na glicólise (via Embden-Meyerhof-Parnas), estes são convertidos a piruvato, que, em condições de anaerobiose ou de baixa oxigenação, originam o etanol pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase, promovendo a reoxidação de NADH. Em condições de aerobiose, o piruvato é oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) na cadeia respiratória (SKOOG e HAHN-HAGERDAL, 1990; HAHN-HAGERDAL et al., 2007; FUGITA, 2010).

Figura 4: Esquema simplificado do metabolismo da xilose em leveduras.



Fonte: AGBOGBO e COWARD-KELLY (2008)

Durante o processo fermentativo por estas leveduras não-convencionais, a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura é um fator crítico para que o microrganismo prossiga com a via de metabolismo desejado, produzindo os produtos de fermentação de interesse ou biomassa celular, visto que a presença (ou não) de oxigênio está associada à reoxidação de coenzimas necessárias na via fermentativa de produção de etanol (DU PREEZ, 1994; SU et al., 2015; THANI et al., 2016). Segundo Oliveira (2010), as enzimas XR e XDH são catalisadores-chave no metabolismo da xilose, as quais são extremamente dependentes de coenzimas cujas regenerações estão relacionadas à respiração celular – enquanto a regeneração de NADH acontece no ciclo das pentoses fosfato, o NAD^+ é obtido durante a respiração celular com o oxigênio como receptor final de elétrons (LAPLACE et al., 1991; MUSSATTO e ROBERTO, 2003; OLIVEIRA, 2010).

Através de sequenciamento do genoma da levedura *S. passalidarum* foi constatada a presença de dois genes codificadores de XR (XYL1.1 e XYL1.2),

sendo que XYL1.2 tem maior expressão durante a metabolização da xilose em condição de limitação de oxigênio e tem preferência por NADH, enquanto XYL1.1 é dependente de NADPH (WOHLBACH et al., 2011; CADETE et al., 2016). Essa preferência da enzima XR pela coenzima NADH também é reportada por Hou (2011). Sabendo que a atividade da enzima XDH é dependente de NAD⁺, a demanda deste cofator é suprida pela reoxidação de NADH pela enzima XR, sendo que o equilíbrio dessas coenzimas torna a via menos dependente da disponibilidade de oxigênio para a levedura *S. passalidarum*. Entretanto, caso esse equilíbrio não seja eficiente e quantidades insuficientes de NAD⁺ forem regeneradas, a via metabólica é bloqueada e elevadas concentrações do subproduto xilitol são excretadas ao meio. Nesse caso, a presença de limitadas concentrações de oxigênio pode auxiliar na regeneração de NAD⁺, evitando a interrupção da via metabólica da xilose (SKOOG e HAHN-HÄGERDAL, 1990; HOU, 2011).

Estudos realizados por Du Preez (1994) e Taniguchi (1997) com a levedura *Pichia stipitis* CBS 5773 (*S. stipitis*) sob condições anaeróbicas observaram que uma grande fração da xilose é convertida para xilitol, não produzindo valores significativos de etanol, resultado do desequilíbrio redox e da baixa concentração de NAD⁺ (responsável pela oxidação deste subproduto a xilulose), reflexo da falta de oxigênio para auxiliar na regeneração das coenzimas.

Portanto, o nível de oxigênio se torna um importante variável e deve ser otimizado para elevar a produção de etanol em detrimento do crescimento celular, sem causar impactos negativos na viabilidade e na capacidade produtora das células, bem como auxiliar na regeneração das coenzimas, impedindo o desequilíbrio redox (LAPLACE et al., 1991; MUSSATTO e ROBERTO, 2003; OLIVEIRA, 2010).

2.5 Efeito do potencial redox no metabolismo de produção de etanol a partir de pentoses em leveduras não-convencionais

Conforme previamente descrito, para leveduras *Crabtree* negativas, elevada aeração pode resultar em baixo rendimento em etanol em virtude do elevado crescimento celular proporcionado (NIGAM, 2001). Por outro lado, condições de anaerobiose ou baixo fornecimento de oxigênio podem acarretar

insuficiente oxidação das coenzimas reduzidas, resultando acúmulo de subprodutos, além de refletir no lento consumo de xilose (LAPLACE et al., 1991; MUSSATTO e ROBERTO, 2003).

De acordo com Liu et al. (2013), o potencial de oxirredução reflete a capacidade de um composto para adquirir elétrons, sendo que dois compostos são necessários para uma reação de oxidação-redução: o componente redutor doa elétrons para o agente oxidante. Sendo assim, o potencial de oxirredução (ORP) medido no meio fermentativo é uma indicação do metabolismo intracelular, pois reflete a transferência global de elétrons e o equilíbrio redox envolvidos. Dessa forma, trata-se de uma boa propriedade para definir o teor de oxigênio no meio de cultura, principalmente quando sua faixa de concentração está abaixo de limites detectados por sondas de oxigênio dissolvido (OD), uma vez que o oxigênio é um importante receptor de elétrons no sistema (KJAERGAAR et al., 1977). Du Preez et al. (1988) afirmam que o potencial de oxirredução é uma variável complexa e está associado ao efeito combinado de algumas outras variáveis de processo, como oxigênio livre e hidrogênio, pH, temperatura e presença de compostos que atuam como agentes oxidantes. Gases como oxigênio, hidrogênio e monóxido de carbono podem ser injetados em sistemas de fermentação para controlar o ORP (LIU et al., 2013) e fornecer a melhor condição de operação para a produção de etanol. Sendo assim, diferentes valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) fornecerão diferentes valores de ORP, impactando na atividade enzimática.

Levando em consideração esses aspectos e o potencial para aplicação industrial do microrganismo *S. passalidarum* na produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos ricos em pentoses, o presente trabalho foi desenvolvido para fornecer uma investigação detalhada e abrangente sobre a influência da disponibilidade de oxigênio na capacidade fermentativa dessa levedura.

Na literatura, são encontrados alguns trabalhos que estudam o efeito da aeração sobre o metabolismo de leveduras consumidoras de xilose, como no caso de *S. stipitis* (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016; VERAS et al., 2017). Entretanto, por ter sido isolada recentemente, há poucos estudos do processo fermentativo envolvendo *S. passalidarum*, sendo que, conforme previamente mencionado, não há um estudo detalhado para determinação da condição ótima

de oxigenação e do melhor valor de k_{LA} para essa levedura. Considerando seu potencial de conversão de xilose em bioetanol, uma análise mais detalhada para se conhecer o real efeito da concentração de oxigênio na metabolização da xilose se faz necessária, possibilitando a determinação da melhor condição de operação para produção de etanol. Visto que é reportado na literatura que essa levedura é capaz de realizar fermentação de pentoses em condições estritamente anaeróbicas (HOU, 2012), uma condição de anaerobiose (k_{LA} zero) também será avaliada e comparada com as condições de microaerofilia para estudo do metabolismo celular.

Em um trabalho recentemente publicado (VERAS et al., 2017), a performance de *S. passalidarum* é avaliada frente a diferentes condições de disponibilidade de oxigênio (anaerobiose, aerobiose e microaerofilia). Entretanto, não há uma correlação precisa das condições utilizadas em termos de valores de k_{LA} ou potencial de oxirredução relacionados a atividade enzimática durante as diferentes condições empregadas. Além disso, foram utilizadas baixas concentrações iniciais de biomassa celular e substrato. No caso do presente trabalho, as fermentações serão executadas utilizando substrato sintético composto por altas concentrações de xilose e glicose, nas proporções de 70 e 30% (v.v⁻¹), respectivamente, com o objetivo de simular uma concentração média presente em hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir do pré-tratamento ácido da cana-de-açúcar. Como mencionado anteriormente, o aumento da concentração celular já foi reportado como uma estratégia operacional para elevar a produtividade volumétrica de etanol (Brethauer e Wyman, 2010), além de favorecer a elevação das velocidades de consumo e de produção (AGBOGBO et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e meio de cultura

O microrganismo utilizado foi a levedura nativa não-convencional *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. A cepa foi mantida em estoque em meio líquido YPX e glicerol (50%) a -80 °C.

3.2 Reativação celular

Com o intuito de realizar a reativação celular a partir do meio de conservação, 2 mL da cepa em estoque foram transferidos para meio YPX contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura (10), peptona (20) e xilose (20). As células foram mantidas em incubador rotatório durante 24 h, a 30 °C e 200 rpm. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 11970 xg por 20 min e ressuspensas em água estéril. A suspensão de leveduras foi transferida para o meio do inóculo, contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura (5), peptona (5), ureia (2,3), KH₂PO₄ (2), MgSO₄.7H₂O (0,3), xilose (12) e glicose (1,32). Os frascos de inóculo foram mantidos em incubador rotatório por 24 h, a 30 °C e 200 rpm (SILVA et al., 2012). Após 24 horas, o volume de inóculo foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e as células ressuspensas em água estéril totalizando um volume de 400 mL (corresponde a 10% do volume de propagação descrito no item 3.3), as quais foram encaminhadas para a etapa de propagação.

3.3 Propagação

As células obtidas no item 3.2 foram transferidas para biorreatores de BioFlo® 115 7 L (New Brunswick Scientific Co.) com 4 L de volume de trabalho. O meio de crescimento foi composto por (g.L⁻¹): xarope de cana-de-açúcar (açúcares redutores totais - ART 30), KH₂PO₄ (2) e ureia (5) (SANTOS et al., 2016). Após tempo adequado para o consumo total de ART, foi realizado um pulso composto por (g.L⁻¹): KH₂PO₄ (2) e ureia (5). Além disso, foi estabelecida uma alimentação contínua de xarope de cana-de-açúcar com vazão de 3 g_{ART}.L⁻¹.h⁻¹ a fim de se manter o crescimento celular linear (SANTOS et al., 2015). A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida entre 40 e 50% da saturação em relação ao ar atmosférico para se evitar a limitação de oxigênio.

Após o tempo de processo (24 h), a alimentação foi interrompida e o caldo fermentado foi centrifugado de maneira estéril a 11970 xg por 20 min. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em um volume mínimo de água estéril. O creme de leveduras obtido foi armazenado a 4 °C e serviu para a etapa de fermentações, sendo estocado por no máximo 15 dias. O intuito desta etapa foi o de produzir leveduras para as fermentações subsequentes. Para este trabalho, foi necessário realizar duas bateladas de propagação com um intervalo de 15 dias para que o tempo do creme de levedura em armazenamento não ultrapasse o limite de dias pré-definido.

3.4 Fermentação

3.4.1 Fermentação em batelada com diferentes valores de k_{LA}

Para investigar a produção de etanol por *S. passalidarum*, inicialmente, fermentações em modo batelada foram realizadas em duplicata em diferentes valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, determinado a partir da metodologia descrita no item 3.5.3. Os valores de k_{LA} foram mantidos em:

- 0 h⁻¹ (anaerobiose estabelecida pelo borbulhamento de nitrogênio durante 30 min antes da inoculação, a 150 rpm)
- 4,9 h⁻¹;
- 8 h⁻¹;
- 45 h⁻¹;

A condição de anaerobiose foi realizada para tornar possível a comparação com demais trabalhos encontrados na literatura para este microrganismo (HOU, 2012; SU et al., 2014), assim como para outras leveduras. Os valores de k_{LA} de 4,9 e 8,0 h⁻¹ foram escolhidos, pois são os melhores coeficientes reportados na literatura para a levedura *S. stipitis* em meio sintético e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2016), sendo que *S. passalidarum* e *S. stipitis* são leveduras com metabolismos de conversão de etanol similares. Já o k_{LA} de 45 h⁻¹ foi investigado para proporcionar um maior crescimento celular sem atingir condições de extrema aeração.

Os ensaios foram realizados em bioreatores BioFlo® 115 3 L (New Brunswick Scientific Co.) com 1,4 L de volume de trabalho, contendo o inóculo obtido através do protocolo de propagação (item 3.3). O meio de cultura foi composto por (g.L⁻¹): glicose (27), xilose (63), extrato de levedura (3), MgSO₄.7H₂O (1) e ureia (2,3) (de acordo com SANTOS et al., 2016). As fermentações foram monitoradas através do controle de temperatura, oxigênio dissolvido, agitação, fluxo mássico de gás de entrada e saída, e monitorados o pH e potencial de oxirredução através de sondas.

O meio foi transferido para o biorreator de maneira estéril, o qual foi inoculado com uma concentração celular de 17,23 g.L⁻¹ (± 0,43). A temperatura foi mantida em 30 °C. As fermentações tiveram duração de 48 h, com amostragens no ponto inicial e a cada 4 h. A agitação e a aeração foram estabelecidas a fim de se atingir os valores de k_{La} mencionando, para isso foi utilizada a metodologia descrita no item 3.5.3.

O monitoramento das vazões de gases de entrada e saída dos fermentadores foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.9.

3.4.2 Propagação em batelada (condição de aerobiose estrita)

Adicionalmente, uma condição de aerobiose foi realizada mantendo-se o oxigênio dissolvido entre 40 e 50% em relação à saturação com ar atmosférico, onde a agitação e aeração foram alterados automaticamente, variando de 200 a 900 rpm e 0,1 a 2 Lpm, respectivamente. Esse experimento teve como objetivo a obtenção de dados de respirometria para a levedura.

Da mesma forma, os ensaios foram realizados em bioreatores BioFlo® 115 3 L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) com 1,4 L de volume de trabalho, contendo o inóculo obtido no item 3.2. Especificamente nesses ensaios, para favorecer o crescimento celular, o biorreator foi inoculado com uma baixa concentração de células e de açúcares redutores (AR), isto é, aproximadamente 1,5 e 30 g.L⁻¹, respectivamente. O meio de cultura foi composto por (g.L⁻¹): glicose (9), xilose (21), extrato de levedura (3), MgSO₄.7H₂O (1) e ureia (2,3), o qual foi transferido para o biorreator de maneira estéril. A temperatura foi mantida em 30 °C. O cultivo teve duração de aproximadamente 10 h (exaustão da fonte de carbono), com amostragens no ponto inicial e a cada 2 h. A realização do método dinâmico, descrito no

item 3.5.4, aconteceu no mesmo intervalo das amostragens para obtenção dos parâmetros cinéticos respiratórios, como por exemplo, a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}).

3.5 Transferência de massa

As metodologias referentes à transferência de massa, que engloba a transferência do oxigênio da fase gasosa para a líquida, são apresentadas a seguir.

A sonda utilizada para monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido foi um sensor óptico de OD Visiferm Arc DO (Hamilton, EUA), em que a medição é realizada por luminescência (Figura 5).

Figura 5: Sensor óptico de OD Visiferm Arc DO (Hamilton, EUA)

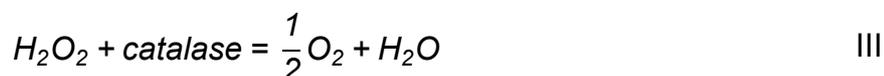


3.5.1 Determinação da concentração de saturação em O_2 (C_s)

A determinação da concentração de saturação de oxigênio (C_s) nos meios (meio fermentativo - descrito no item 3.4.1 - e meio utilizado na propagação - condição de aerobiose, descrito no item 3.4.2]) foi realizada pelo método proposto por Käppeli e Fiechter (1981) adaptado às condições de laboratório por Rossi (2006). O método é baseado na Lei de Henry, a qual descreve a solubilidade de um gás em um líquido através da relação da concentração de oxigênio dissolvido no equilíbrio em função da pressão parcial (Equação 1), onde H ($mg_{O_2} \cdot L^{-1} \cdot atm^{-1}$) representa a constante de Henry e p_g (atm) está relacionado à pressão parcial de O_2 na fase gasosa.

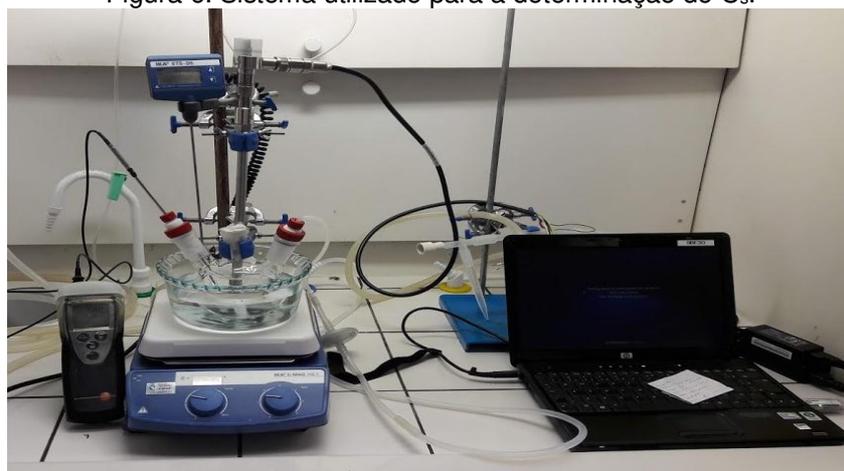
$$C_s = H \cdot p_g \quad (1)$$

A metodologia consiste na medição da porcentagem de saturação correspondente à adição de uma quantidade definida de oxigênio, descrita pela estequiometria apresentada pela Equação III.



A determinação da concentração de saturação foi realizada em balão de vidro de três bocas de fundo redondo com capacidade de 0,25 L (Figura 6), contendo 250 mL de meio de cultura. Foram realizados experimentos com água, o meio de cultura utilizado neste trabalho para as fermentações (90 g.L^{-1} de AR) e o meio de cultivo celular (condição de aerobiose; 30 g.L^{-1} de AR). Em uma das saídas foi introduzido um sensor de oxigênio dissolvido (sensor óptico de OD Visiferm Arc DO [Hamilton, EUA]), previamente calibrado para cada meio experimental, na segunda foi instalado a entrada de gás nitrogênio (N_2), e na terceira adicionado um termômetro (Testo 720 e sonda NPT 1000) e por onde aconteceu a adição de reagentes. A temperatura do processo foi mantida em $30 \text{ }^\circ\text{C}$ através de uma chapa de aquecimento com agitador magnético (C-MAG HS 7, IKA), uma baixa agitação foi empregada a fim de garantir a homogeneidade do líquido.

Figura 6: Sistema utilizado para a determinação do C_s .



A primeira etapa foi a remoção do oxigênio dissolvido presente no meio de cultura através da injeção de nitrogênio gasoso. Ao se atingir valor de corrente zero fornecido pelo sensor de OD, a injeção foi transferida para o *head space* do balão a fim de se evitar qualquer transferência de oxigênio do gás para o líquido. Em seguida, foi adicionado um volume em excesso de enzima catalase ($200 \mu\text{L}$, C30, Sigma-Aldrich, EUA), seguido da adição de diferentes volumes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , padrão analítico, Synth, Brasil) previamente padronizado com permanganato de potássio (KMnO_4 , Vetec, Brasil), contendo oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, padrão analítico, puro, Sigma-Aldrich, EUA) como padrão primário. Durante esta etapa, o oxigênio contido na solução de H_2O_2 foi liberado

pela ação da enzima catalase e detectado pela sonda de OD. O procedimento foi repetido para diferentes volumes de H_2O_2 (15, 30, 45, 60, 90, 100 μL), sendo que, baseado na reação estequiométrica apresentada na Equação III, foi possível determinar a concentração de saturação de oxigênio ($\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$) para cada volume usado. Na sequência, foi estabelecida uma relação linear entre o valor fornecido pela sonda após a reação do H_2O_2 com a enzima catalase e a concentração conhecida de oxigênio dissolvido na saturação para cada volume de H_2O_2 testado. Assim, com a equação da reta, foi possível determinar a concentração de saturação O_2 no líquido.

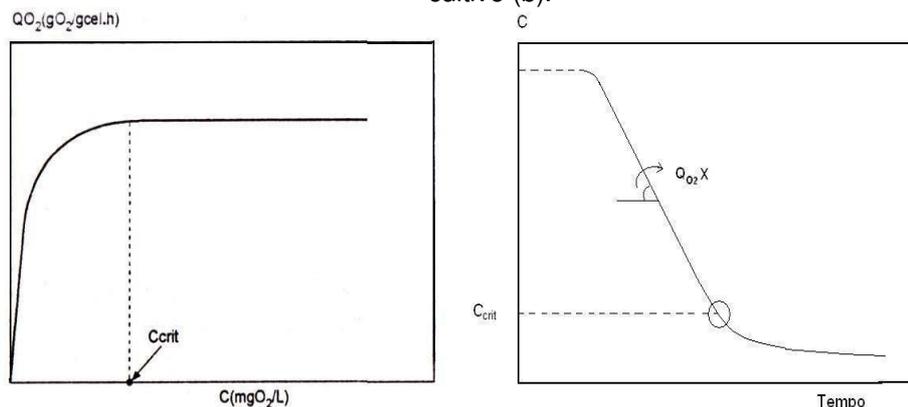
3.5.2 Determinação da Concentração Crítica de Oxigênio Dissolvido (C_{CRIT})

A concentração crítica de OD varia de microrganismo para microrganismo e diz respeito à quantidade mínima de oxigênio requerida pela célula para que não sejam causados danos ao seu metabolismo. Acima deste valor crítico, a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) é constante e máxima, como mostra a Figura 7. Abaixo desse valor, essa velocidade passa a ser limitada, afetando principalmente o crescimento celular. Sendo assim, se o objetivo for manter essa velocidade específica elevada, é necessário condicionar o sistema para que a concentração de oxigênio dissolvido fique acima do valor crítico (SCHMIDELL, 2001; ROSSI, 2006).

Para determinar o C_{crit} da levedura *S. passalidarum*, foi realizada a interrupção da aeração durante o cultivo descrito no item 3.4.2, registrando-se a queda gradual e constante da concentração de OD pela sonda, resultado do consumo do oxigênio dissolvido pela célula. Vale ressaltar que, neste momento, a transferência de oxigênio para o líquido é nula e considera-se que a massa celular é constante nesse curto intervalo de tempo (Schmidell, 2001).

Plotando-se o gráfico de concentração registrada pela sonda em função do tempo é possível observar que, até um determinado valor, a velocidade de respiração é constante. Porém, a partir de certa concentração de OD, a inclinação da reta é alterada (deixa de ser constante), ou seja, a velocidade de respiração sofreu redução devido à insuficiência de oxigênio. Este ponto, então, é definido como C_{crit} , como pode ser observado na Figura 7b.

Figura 7: Variação de Q_{O_2} pela concentração de Oxigênio disponível (a); perfil de Oxigênio Dissolvido (%) observado durante a execução do método de interrupção de aeração de um cultivo (b).



Fonte: ROSSI, 2006

3.5.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

Para a determinação do $k_L a$, a transferência de oxigênio para o meio de cultura sem inoculação de microrganismo foi medida a partir de um eletrodo polarográfico, de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2012). O método foi baseado na injeção de gás nitrogênio em água com o intuito de expulsar o oxigênio dissolvido presente no meio. Em seguida, foram impostas diferentes condições de agitação e fluxo de ar comprimido ao meio, promovendo o aumento da concentração de oxigênio dissolvido, a qual foi monitorada.

Os valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$ [h^{-1}]) foram calculados pela equação de transferência de oxigênio (Equação 2), em que o valor do $k_L a$ é dado pelo coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear da curva resultante da Equação 4, obtida pela integração da Equação 3. Nesse caso, C refere-se à concentração de oxigênio dissolvido no meio no tempo t , registrada por meio de um eletrodo ($mg_{O_2} \cdot L^{-1}$) e C_s refere-se à concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio ($mg_{O_2} \cdot L^{-1}$).

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad (2)$$

Separando as variáveis: (3)

$$\frac{dC}{(C_s - C)} = k_L a \cdot dt$$

Integrando- se a Equação 3:

$$-k_L a \cdot t = \ln \left(1 - \frac{C}{C_s} \right) \quad (4)$$

A determinação do $k_{L,a}$, bem como as fermentações foram realizadas em biorreator de 3 L, com volume de trabalho de 1,4 L, e para tornar possível a reprodutividade destes experimentos foram medidas as principais dimensões do biorreator assim como apresentada a disposição das peças utilizadas para equipar o processo, sendo que nesses experimentos foram utilizados dois impelidores de pás planas para agitar o meio. A figura 8, apresenta um esquema ilustrativo das dimensões utilizadas para os experimentos e a tabela 2 as medidas.

Figura 8: Esquema ilustrativo do Biorreator BioFlo® 115 3 L com 1,4 L de volume de trabalho, equipado com duas pás planas usado para determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$), e fermentações nas diferentes condições de aeração.

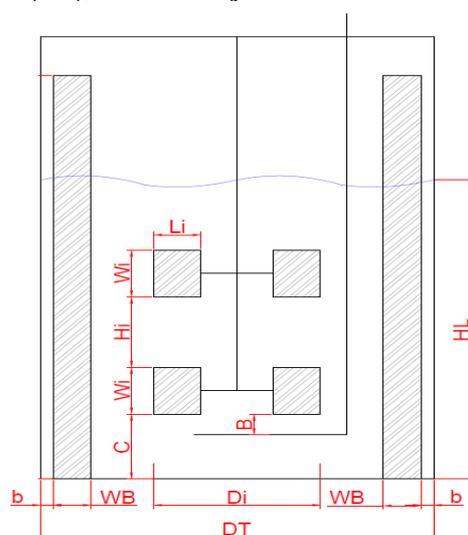


Tabela 2: Medida das principais dimensões do Biorreator BioFlo® 115 3 L com 1,4 L de volume de trabalho, equipado com duas pás planas usado para determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ($k_{L,a}$), e fermentações nas diferentes condições de aeração.

Medida	Descrição	Medida (mm)
L_i	Comprimento da pá da turbina	15
H_i	Distância entre os impelidores	27
W_i	Altura da pá da turbina	18
C	Distância impelidor ao fundo do reator	25
B	Distância entre impelidor e o dispersor de ar	8
H_L	Altura da coluna de líquido	115
b	Distância entre a chicana e a parede do tanque	4
W_B	Largura da chicana	12
D_i	Diâmetro do impelidor	53
D_T	Diâmetro do tanque	125

A condição de anaerobiose (k_{La} zero) foi estabelecida sem injeção de ar comprimido e empregando-se uma agitação de 150 rpm, de modo a se manter a homogeneidade do meio durante a fermentação. Vale ressaltar que, antes da inoculação da levedura, o meio foi borbulhado com nitrogênio durante 30 min para gerar a condição de anaerobiose.

Os valores de k_{La} para aerobiose (propagação), ou seja, em condição transiente (%OD entre 40-50%) foram determinados pelo método dinâmico (HUMPHREY e TAGUCHI, 1966), descrito no item 3.5.4.

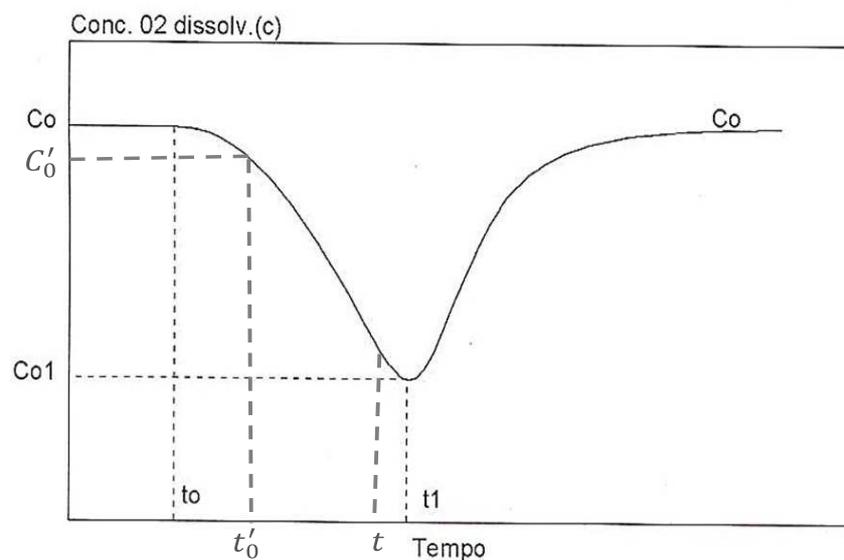
3.5.4 Determinação do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_{La}) e da Velocidade Específica de Respiração (Q_{O_2}) para aerobiose (propagação)

Para a condição de aerobiose (cultivo mantendo OD entre 40-50%), foi utilizado o método dinâmico (HUMPHREY e TAGUCHI, 1966) para a determinação do k_{La} (variável no sistema) e da velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}), a partir da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (Equação 5), onde a diferença entre a quantidade de oxigênio dissolvido no meio [$k_{La}(C_s - C)$] e a velocidade de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$) é igual à variação da concentração de oxigênio dissolvido.

$$\frac{dC}{dt} = k_{La}(C_s - C) - Q_{O_2}X \quad (5)$$

A determinação dos valores foi realizada a partir de dados experimentais obtidos durante uma curta interrupção da aeração durante o cultivo celular, seguida da retomada da injeção de ar. A Figura 9 mostra o perfil esperado durante a execução do método dinâmico.

Figura 9: Variação do valor de OD em função do tempo, durante a execução do método dinâmico.



Fonte: SCHMIDELL, 2001

Assim, quando a injeção de ar é desligada (t_0), o oxigênio dissolvido é consumido pela célula, sendo que a diminuição (linear) do valor de OD é registrada pela sonda (Figura 9 – entre t'_0 e t). Esse valor deve ser monitorado e mantido acima do valor de C_{crit} do microrganismo. Neste momento a transferência de oxigênio para o líquido é nula (Equação 6).

$$k_L a(C_s - C) = 0 \quad (6)$$

Assim, substituindo a Equação 6 na Equação 5, é possível obter o valor da velocidade de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$), o qual foi obtido através do coeficiente angular da reta, como descreve a Equação 7.

$$\frac{dC}{dt} = - Q_{O_2}X \quad (7)$$

Para se obter a velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}), deve-se dividir o valor de $Q_{O_2}X$ pela concentração de biomassa (X) naquele determinado instante do processo.

Integrando a Equação 7 entre o tempo $t_0 = 0$ e o tempo t e admitindo-se que C no momento em que a aeração é cessada é igual a C_0 , obtém-se a Equação 8.

$$C = C'_0 - Q_{O_2}X(t - t'_0) \quad (8)$$

A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) foi realizada através da retomada da aeração no meio de cultura, onde as condições de agitação e aeração foram impostas pelo controle automático do bioreator, ação que causa o aumento da concentração de oxigênio dissolvido no líquido (Figura 9 – a partir de t_1). A concentração de oxigênio aumenta até a atingir o valor registrado pela sonda inicialmente (C_0) no tempo inicial (t_0). Admite-se que, neste curto espaço de tempo, a velocidade de consumo de oxigênio pelo microrganismo ($Q_{O_2}X$) é constante e que a concentração (C) atinge o valor registrado no tempo que antecede a interrupção da aeração (t_0). Então, a partir do gráfico de concentração de OD por tempo ($t-t_1$, onde t_1 é o instante onde a aeração foi retomada) (Equação 9) e a partir do ajuste de regressão não linear dos dados de aeração e agitação, os valores de k_{La} foram obtidos.

$$C = C_0 - (C_0 - C_{O1}) \cdot e^{-k_{La}(t - t_1)} \quad (9)$$

3.6 Metodologia Analítica

A concentração de levedura e metabólitos, pH e potencial de oxirredução foram monitoradas no momento inicial e a cada 4 h, até o término do experimento. Atividades enzimáticas foram analisadas ao final do processo (48 h) ou no ponto de exaustão do açúcar (para os experimentos onde o AR foi completamente consumido antes de 48 h, ou seja, condição de aerobiose e k_{La} 45 h⁻¹). Além disso, vazão e composição dos gases de exaustão foram monitorados por espectrômetro de massa (Hider HPR20, Inglaterra).

Concentrações de levedura foram medidas por análises gravimétricas em triplicata, onde 1,5 mL de cada amostra foram submetidos a centrifugação (14000 rpm por 5 min), ressuspensas duas vezes em água destilada e encaminhadas a uma estufa de biomassa a 80 °C.

Carboidratos, ácidos orgânicos e alcoóis foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, CA, EUA). Amostras foram filtradas através de um filtro de PVDF Millex 22 µm, e o filtrado foi injetado no sistema HPLC. Compostos foram separados com Aminex HPX 87H (300 7,8 mm, BIO-RAD, Hercules, CA) a 35 °C usando H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma taxa de 0,6 mL.min⁻¹.

3.7 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi realizada através de microscopia óptica com lente objetiva de 40X (Eclipse, Nikon, Japão), considerando células viáveis e não-viáveis. A contagem foi efetuada por câmara de Neubauer e azul de metileno foi usado para diferenciar células vivas das mortas.

3.8 Cálculo de Parâmetros Cinéticos

O desempenho da levedura *S. passalidarum* foi avaliado através do cálculo de parâmetros cinéticos das fermentações realizadas por meio do uso do *software* Microsoft Excel 2016. Os parâmetros cinéticos e as respectivas equações estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos e respectivas equações.

Parâmetros e variáveis	Equação	Unidade	N.º da equação
Velocidades específicas de crescimento celular	$\mu_X = \frac{1}{X} \left(\frac{dX}{dt} \right)$	h^{-1}	(10)
Velocidades específicas máximas de crescimento celular e constante de Saturação - equação de MONOD *	$\mu_X = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S}$	h^{-1}	(11)
Velocidades específicas de consumo de substrato	$\mu_S = \frac{1}{X} \left(- \frac{dS}{dt} \right)$	$g_S \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$	(12)
Velocidades específicas de formação de produto	$\mu_P = \frac{1}{X} \left(\frac{dP}{dt} \right)$	$g_{EtOH} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$	(13)
Fatores de conversão de substrato em produto	$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)}$	$g_{EtOH} \cdot g^{-1}$	(14)
Fatores de conversão de substrato em biomassa celular	$Y_{X/S} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)}$	$g_{cel} \cdot g^{-1}$	(15)
Fatores de conversão de oxigênio em biomassa celular e coeficiente de manutenção - equação de PIRT (1975)	$Q_{O_2} = m_O + \frac{1}{Y_{X/O_2}} \mu$	$g_{cel} \cdot g_{O_2}^{-1}$ e $mg_{O_2} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$	(16)
Rendimento em etanol**	$\eta_E = \frac{\left(\frac{P - P_0}{S_0} \right)}{0,511} * 100$	%	(17)
Produtividade volumétrica em etanol	$Q_P = \left(\frac{P - P_0}{t - t_0} \right)$	$g_{EtOH} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$	(18)

*A velocidade específica máxima de crescimento da biomassa residual (μ_{max}), observada na fase exponencial de crescimento, foi obtida a partir do coeficiente angular do ajuste linear dos dados de $\ln(X)$ versus tempo. **O rendimento foi calculado considerando todo o açúcar alimentado no reator no início da fermentação

De acordo com a equação de Monod (Equação 11), a velocidade específica de crescimento está relacionada com a concentração de nutrientes limitantes no meio de cultivo. Sendo assim, considerando que as fontes de carbono sejam o reagente limitante, conhecendo-se o perfil da velocidade específica de crescimento da biomassa (μ_x) e aplicando a linearização de Lineweaver-Burk (Equação 19), é possível plotar gráficos do inverso da velocidade pelo inverso da concentração de substrato, através dos quais é possível obter os valores de μ_{max} e K_s .

$$\frac{1}{\mu_x} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (19)$$

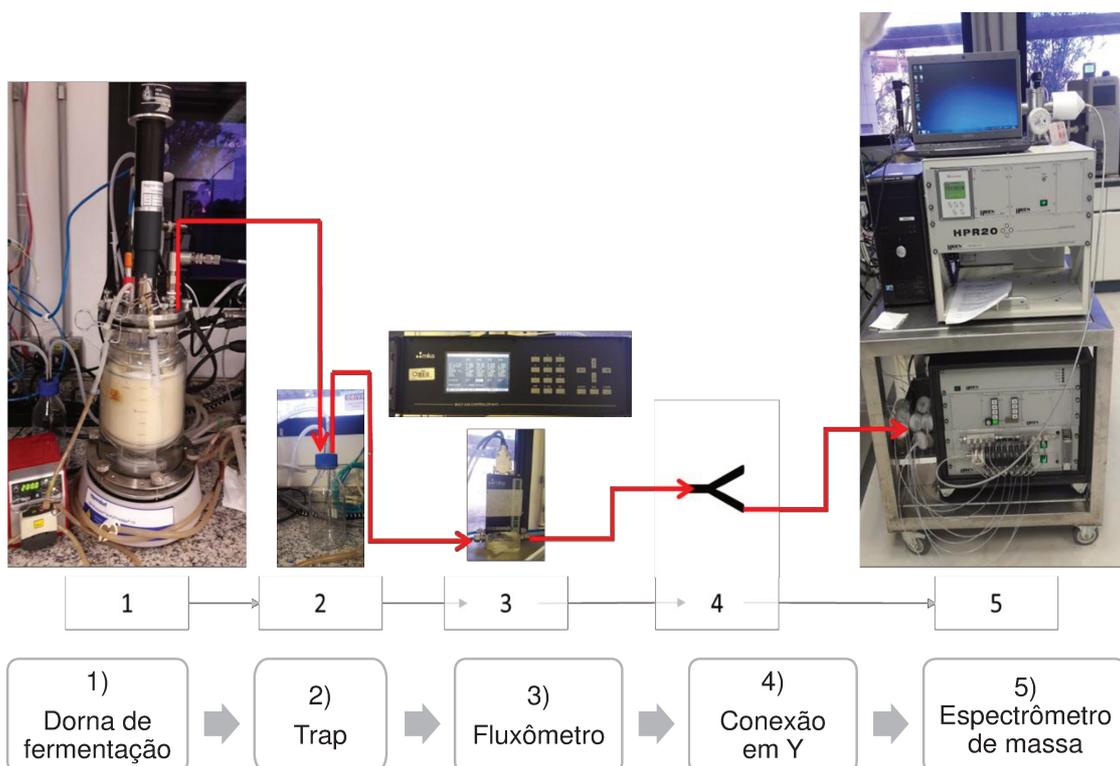
Nesse caso, μ_{max} é representado pelo inverso do coeficiente linear e K_s é igual ao valor de μ_{max} multiplicado pelo coeficiente angular dessa reta.

Devido a pouca quantidade de amostras retiradas durante o experimento, resultando em poucos pontos para geração da reta, foi necessário estimar dados a partir dos dados experimentais, com o objetivo de elevar a confiabilidade dos resultados. Para isso, a partir de um ajuste polinomial das curvas experimentais de concentração celular e de substrato consumido, a estimação desses valores foi realizada a cada 1 h de experimento. Com esses dados, foi possível gerar um novo gráfico de $1/\mu_x$ versus $1/S$, obtendo-se novos valores de μ_{max} e K_s .

3.9 Monitoramento de gases de entrada e saída durante as fermentações

O monitoramento das vazões de gases de entrada e saída dos fermentadores foi realizado por fluxômetro de massa (MKS Instruments 647C) e as composições foram analisadas por espectrometria de massas (HPR-20 QIC Gas Analysis System, Hiden Analytical, Inglaterra) com intervalos de aproximadamente 5 minutos, com o objetivo de quantificar a produção de dióxido de carbono. O esquema utilizado para este monitoramento será apresentado na figura 10.

Figura 10: Sistema para monitoramento dos gases, onde a seta vermelhas representa as mangueiras de condução de gases.



Durante a etapa de fermentação (etapa 1) em condições de microaeração e anaerobiose, a vazão do gás de entrada é conhecida (microaeração) e sua composição é monitorada por espectrômetro durante todo o tempo de fermentação para comparação com os gases de exaustão. Os gases de exaustão, compostos pelo gás de entrada que não foi consumido na fermentação mais os gases excretados pela célula (gás carbônico) ou arrastados por essa corrente (vapor d'água e etanol), deixam a dorna de fermentação pelo condensador. Os gases seguem para um "trap" (etapa 2), para evitar que água chegue às garrafas do fluxômetro (umidade pode danificar o equipamento) e, em seguida, para o fluxômetro (etapa 3), onde foram medidas as vazões dos gases de exaustão para cada fermentação.

Na saída do fluxômetro, foi instalado um conector na forma de Y (etapa 4), dividindo o fluxo de gás - parte bombeado para o analisador de gases (volume necessário para a análise) e o excesso liberado ao meio ambiente. É importante utilizar esse sistema para evitar pressurização das dornas, uma vez que o sistema de análise por espectrometria de massas fecha a linha quando não estiver bombeando a amostra. Sendo assim, o gás que sai do condensador e é

medido no fluxômetro não teria outro caminho a percorrer, pressurizando a linha e a dorna de fermentação.

No espectrômetro de massas (etapa 5), foi analisada a composição do gás em % (nitrogênio, oxigênio, CO₂, etanol e água).

Sendo assim, conhecendo-se, a vazão e a composição dos gases de exaustão é possível determinar a vazão de CO₂ produzida durante a fermentação.

Conhecendo-se a vazão volumétrica total dos gases de exaustão (F_t [cm³.min⁻¹]) determinada pelo fluxômetro, o fator de conversão de cada gás disponibilizado pelo equipamento (f_c [apresentado na Tabela 4]) e a fração de cada componente neste gás determinada pelo espectrômetro ($X_{componente}$), é possível determinar a vazão de cada gás que deixa o processo ($Q_{componente}$) em cada ponto de amostragem, conforme a Equação 20.

$$F_{componente} = F_t \cdot X_{componente} \cdot f_c \quad (20)$$

Tabela 4: Fator de correção determinado para cada componente pelo fabricante do fluxômetro de massa (MKS Instruments 647C).

	Nitrogênio (N₂)	Oxigênio (O₂)	Dióxido de carbono (CO₂)	Etanol (C₂H₆O)	Água (H₂O)
Fator de correção	1	1	0,7	0,39	1

As velocidades de formação de CO₂ foram obtidas a partir da diferença entre o gás de exaustão e de entrada em cada ponto de amostragem. Sendo assim, conhecendo-se a vazão (F_{CO_2} [cm³.min⁻¹]) e levando em consideração a densidade (ρ_{CO_2} [g/cm³]), é possível conhecer a vazão mássica de gás carbônico produzida (\dot{m} [g.min⁻¹]). Considerando o volume do reator naquele instante (L), obtém-se a velocidade de formação instantânea (Q_{CO_2X} [g.L⁻¹.h⁻¹]). Como a massa celular é conhecida a cada instante, foi possível determinar a velocidade específica de formação de CO₂ (Q_{CO_2} [mg_{CO_2}.g_{cel}⁻¹.h⁻¹]) para os experimentos em anaerobiose e microaeração.

Devido ao baixo consumo de O₂ e a possível interferência no analisador de gases para este componente, não foi possível a determinação do consumo deste componente.

3.10 Caracterização da atividade enzimática (enzimas XR e XDH)

A determinação da atividade enzimática foi realizada segundo metodologia elaborada e descrita por Tramontina et al. (*trabalho em submissão*).

3.10.1 Amostragem e preparação das células

Para comparar a atividade de enzimas que atuam na via de assimilação da xilose em *S. passalidarum*, foram coletadas amostras nos tempos iniciais e finais para as fermentações com diferentes condições de aeração. As células foram submetidas à centrifugação a 2348 xg durante 5 min a 4 °C e lavadas com água destilada gelada e estéril, conforme descrito por Santos et al. (2016). A fim de se obter o extrato bruto celular, a mistura foi ressuspensa com solução tampão (KH₂PO₄, 100 mM; MgCl₂, 2 mM e dithiothreitol (DTT , 0,5 mM - agente redutor que auxilia na lise da membrana). Em seguida, dirigidas para agitação em vórtex com esferas de vidro durante 30 min. A fração líquida foi separada e submetida a centrifugação durante 60 minutos a 4 °C e 2348 xg. Após esse tempo, o sobrenadante (extrato bruto) foi separado em tubos Eppendorfs™ de 2 mL limpos e preservado em gelo para quantificação da proteína e ensaios enzimáticos. Foram realizadas três repetições para cada condição.

3.10.2 Determinação de proteínas e análise enzimática

A fim de comparar o perfil enzimático nos diferentes extratos de células brutas, a concentração de proteína em cada amostra foi determinada pelo método de corante Bradford (BRADFORD, 1976). O kit de ensaio de proteína foi adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente, foi estabelecida uma faixa de concentração linear utilizando BSA (albumina de soro bovino) como proteína padrão. Assim, foram misturados 80 µL de amostra diluída adequadamente com 80 µL de reagente de corante Bradford em ensaios de microplacas. Após cinco minutos de incubação (escuro, 23,5 °C), as amostras foram medidas a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração total de proteína no sobrenadante da cultura foi medida em triplicata. Após essa análise, foi adicionado imediatamente o coquetel comercial inibidor de protease (Bio-Rad, EUA) no extrato para evitar a degradação indesejada das proteínas.

3.10.3 Atividade de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)

As atividades das enzimas XR e XDH foram medidas como relatado em Santos et al. (2016). Os ensaios foram realizados em poços de microplacas (volume final de 200 μL), contendo tampão de fosfato pH 7,0 (50 mM para atividades de XR) e tampão de Tris pH 8,5 (50 mM para atividade de XDH), uma quantidade apropriada de sobrenadante de lisado de células (10 a 40 μL , dependendo da concentração de proteínas obtida a partir do método de corante Bradford, 1976) e 20 μL de substrato em uma concentração de 1M (xilose para XR e xilitol para realizar a atividade XDH). Assim, imediatamente após a análise da absorbância da amostra “branco”, as coenzimas foram adicionados especificamente para cada propósito: NADPH ou NADH (2 mM) foi adicionado para ensaios de XR e NAD^+ (2 mM) para avaliação de XDH. As moléculas NADPH/ NAD^+ foram utilizadas neste estudo para determinar as reações enzimáticas de oxidação/redução. Durante as reações, NADPH e NADH, que absorvem luz a 340 nm, foram oxidadas para NADP^+ e NAD^+ , respectivamente, correspondente à atividade de XR (seguido de detecção de diminuição de absorbância), ou NAD^+ foi reduzido para NADH, correspondente à atividade de XDH (seguido de detecção de aumento de absorção).

As reações foram monitoradas a 25 °C durante 10 minutos (com medições a cada 30 s), a 340 nm, utilizando o leitor de placas Infinite[®] M200 da Tecan Trading AG (Tecan Trading AG, Suíça). O coeficiente de absorvidade molar da enzima utilizado (ϵ) é, a 340 nm, $6,22 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, o qual foi usado para determinar e calcular a atividade enzimática específica ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de lisado) (HECTOR et al., 2013). Os resultados das atividades específicas relatados neste estudo são proporcionais à quantidade de lisado adicionada na amostra de diluição, utilizando a inclinação inicial ($\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}$), o coeficiente de absorvidade molar da enzima, o volume de ensaio e lisado e os dados de concentração de proteína obtidos pelo método de corante Bradford (Bradford, 1976). Todas as reações foram realizadas em triplicata e o “branco” consistiu na mesma reação na ausência dos substratos ou do extrato bruto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação da concentração de saturação em O_2 (C_s)

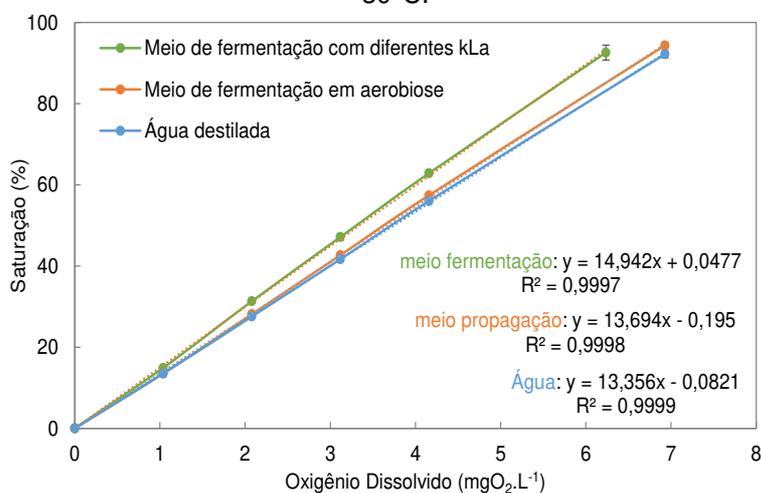
Para determinação da concentração de saturação, foi necessário realizar a padronização da solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 1M) através de titulação com solução de permanganato de potássio ($KMnO_4$ 0,02M) previamente padronizado com a solução de oxalato de sódio como padrão primário ($Na_2C_2O_4$ 0,05M). Para a preparação dos reagentes, foi utilizada a metodologia descrita por Morita (2007).

Através da titulação, foram obtidas as molaridades reais de $KMnO_4$ e H_2O_2 (0,0203M e 1,0826M, respectivamente). Com esses valores, foi possível saber, de forma exata, a molaridade adicionada ao balão de reação através da adição de diferentes volumes de H_2O_2 , e, pela Equação III, conhecer a quantidade de oxigênio que foi liberado no meio através da ação da enzima catalase.

A determinação de C_s foi previamente realizada em água destilada para validação do método, e, em seguida, repetida para os meios fermentativos descritos nos itens 3.4.1 (fermentações com diferentes valores de $k_L a$ 90 $g.L^{-1}$ de AR) e 3.4.2 (condição de aerobiose – 30 $g.L^{-1}$ de AR). Os volumes adicionados de H_2O_2 variaram de 15 até 100 μL e foram realizadas em triplicata.

A Figura 11 apresenta a solubilidade obtida para os diferentes meios, sendo que há uma relação linear entre o valor medido pela sonda de OD (%) e a concentração de oxigênio ($mg_{O_2}.L^{-1}$), o qual foi calculado a partir da estequiometria da Equação III com o volume conhecido de H_2O_2 (padronizado) adicionado ao meio.

Figura 11: Resposta da sonda de oxigênio dissolvido em função da concentração de oxigênio a 30°C.



É possível observar na Figura 11 que o meio de propagação (condição de aerobiose) não apresentou grande variação de saturação de oxigênio quando comparado à água destilada. Já o meio utilizado para as fermentações com diferentes valores de k_{LA} apresentou uma variação maior. Extrapolando as equações das retas obtidas, é possível determinar a concentração de saturação de cada meio (C_s), ou seja, o valor de OD quando a saturação atinge 100%, as quais são apresentados na Tabela 5, assim como a variação em relação a água destilada e a constante de Henry na temperatura de 30 °C.

Tabela 5: Concentração de saturação (C_s), constante de Henry (H), coeficiente de correlação (R^2) e variação dos meios de fermentação em relação à água destilada a 30 °C.

Parâmetros	Água destilada	Meio de propagação (Aerobiose)	Meio de fermentação (Diferentes k_{LA})
C_s (mg_{O2}.L⁻¹)	7,493	7,317	6,698
H (mg_{O2}.L⁻¹.atm⁻¹)*	35,852	35,010	32,048
R^2	0,9999	0,9998	0,9997
Varição (%)**	-	-2,36	-10,73

*Pressão parcial O₂: 0,209 atm (Schmidell, 2001); **Em relação a água destilada na mesma condição

Segundo dados de literatura (SCHMIDELL, 2001), a solubilidade de O₂ em água destilada a 30 °C é de 7,55 mg_{O2}.L⁻¹, ou seja, muito próxima do valor obtido experimentalmente (7,49 mg_{O2}.L⁻¹), validando o método de determinação de C_s .

Segundo Käppeli e Fiechter (1981), a solubilidade do oxigênio da fase gasosa para a líquida é moderada pela resistência de transferência de massa da fase líquida. Sendo assim, a adição de substratos e sais na água causa uma variação na constante de Henry e, conseqüentemente, na concentração de saturação desse meio para um dado valor de pressão parcial de oxigênio no gás (SCHMIDELL, 2001). É por esse motivo que, para o meio de propagação (aerobiose), o qual possui menos açúcar dissolvido (30 g.L⁻¹), a variação em comparação com a água foi menor do que o para meio com 3x a concentração de açúcar.

Na literatura, é reportado que, para um meio fermentativo, o valor de C_s pode ser de 5 a 15% menor do que para a água destilada na mesma temperatura. No presente trabalho, a diferença está na faixa de 2,36 a 10,73%.

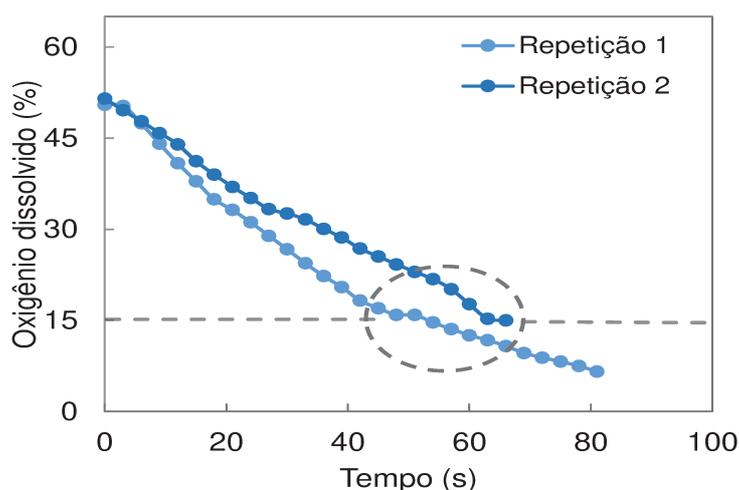
Vendrusco (2009) obteve uma redução de 12% para o meio utilizado no crescimento de *Monascus ruber*, composto por 20 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de glicina e mais adição de sais. Rossi (2006) observou a redução de 8% no meio de Pridham-Gottlieb (modificado) para fungos ectomicorrízicos.

Sendo assim, é necessário levar em consideração essa queda na solubilidade para cada meio. A não correção desses valores pode acarretar em erro na determinação dos parâmetros relacionados à transferência e consumo de oxigênio (VENDRUSCO, 2009; SCHMIDELL, 2001).

4.2 Determinação da Concentração Crítica de Oxigênio Dissolvido (C_{CRIT})

A Figura 12 apresenta as curvas de concentração de O₂ pelo tempo, durante interrupção da aeração na aplicação do método dinâmico, com o objetivo de se determinar a concentração crítica de oxigênio da levedura *S. passalidarum*, conforme descrito no item 3.5.2.

Figura 12: Determinação de C_{CRIT} de O₂ para a *S. passalidarum*.



É possível observar que, durante a interrupção da aeração, os valores de OD (registrado pela sonda) decaem praticamente como uma reta, mudando a inclinação ao atingir 15 % de saturação. Isso acontece quando a célula altera sua velocidade máxima específica de respiração, resultado da falta de oxigênio. Sendo assim, quando se deseja propagar *S. passalidarum* e manter a máxima velocidade de crescimento, a concentração de oxigênio deve ser mantida sempre acima de 15% de saturação do meio, mantendo a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) constante e máxima, promovendo o crescimento celular.

4.3 Fermentação em batelada com diferentes valores de k_{La}

Para determinação da melhor condição de transferência de oxigênio para a levedura *S. passalidarum* na produção de etanol, foram realizadas fermentações empregando diferentes condições operacionais de agitação e injeção de ar comprimido, com o objetivo de variar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). As condições fixadas para cada k_{La} foram determinados a partir da metodologia descrita no item 3.5.3.

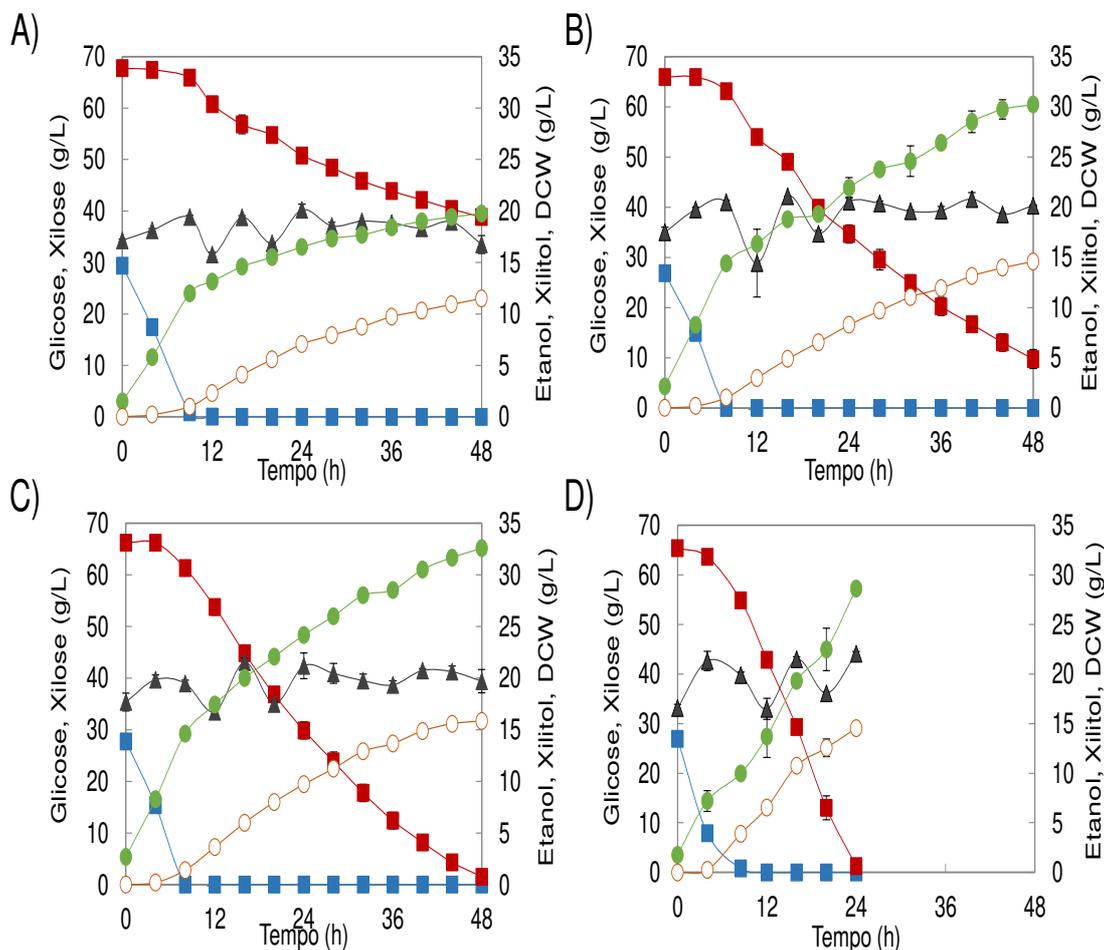
A condição de anaerobiose (k_{La} zero) foi estabelecida sem a injeção de oxigênio, mantendo-se uma agitação de 150 rpm durante a fermentação para manter a homogeneização do meio. As condições estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Condições empregadas para determinação do k_{La} .

k_{La} (h^{-1})	Agitação (rpm)	Aeração (Lpm)
Anaerobiose	150	0
4,9	150	0,1
8	170	0,2
45	255	0,9

Os experimentos foram realizados em biorreatores contendo 1,4 L de meio, composto por mistura de xilose e glicose na proporção de 70 e 30%, respectivamente, com o objetivo de simular um hidrolisado hemicelulósico obtido através de tratamento ácido do bagaço da cana-de-açúcar. A formação de produto e subprodutos, o consumo de substratos e a concentração celular foram monitorados ao longo de 48 h de fermentação para as condições de microaerofilia e anaerobiose, sendo os resultados apresentados na Figura 13. Vale destacar que o presente trabalho estabeleceu o tempo de fermentação de 48 h como padrão para comparação entre os dados e em todos os experimentos a viabilidade celular se manteve acima de 95%.

Figura 13: Perfil das fermentações utilizando *S. passalidarum* sob diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio: (A) anaerobiose $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$, (B) $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$, (C) $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$, (D) $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$. Símbolos referem-se a: (■) – Glicose; (■) – Xilose; (▲) – CDW; (●) – Etanol; (○) – Xilitol.



Pode-se observar que consumo de glicose ocorre em todas as fermentações, inclusive em anaerobiose, antes das 8 h iniciais de processo. Também é observado o consumo sequencial de açúcares, ou seja, a xilose começa a ser consumida após concentrações limitantes de glicose no meio de cultura. Isso acontece devido à repressão catabólica observada em meios compostos, onde concentrações elevadas de hexoses inibem o transportador de pentoses da célula (FARWICK et al., 2014). Para o experimento com o maior valor de k_{La} (45 h^{-1}), foi registrado o início da consumo da xilose quando a concentração de glicose estava abaixo de 8 g.L^{-1} . Esse mesmo efeito foi observado em trabalhos anteriores para *S. passalidarum* em condição de anaerobiose (HOU, 2012), bem como para outras leveduras, como *S. stipitis*, em condições de microaeração (AGBOGBO e COWARD-KELLY, 2008; SANTOS et al., 2015), tanto em meio sintético como para hidrolisado de palha de trigo

(BELLIDO et al., 2013). Vale ressaltar que os resultados obtidos no presente trabalho contradizem dados reportados na literatura, em que Su et al. (2015) e Hou (2012) afirmam que o consumo dos açúcares acontece de forma simultânea pela levedura em condições de microaeração e aerobiose, respectivamente. Para atingir a condição de microaeração, os autores utilizaram frascos Erlenmeyer de 150 mL com volumes de meio de 50 e 75 mL, aplicando uma agitação de 110 ou 150 rpm, promovendo, assim, 4 diferentes condições de microaeração. A condição de aerobiose também foi realizada em frascos de 100 mL contendo 50 mL de volume de trabalho agitados a 120 rpm.

Para as condições de microaeração, as concentrações finais de etanol e xilitol foram similares para os diferentes experimentos (Tabela 7), com variação no tempo de consumo de xilose (Figura 13 [B] - [D]). Ou seja, a disponibilidade de oxigênio afetou a velocidade de consumo desse açúcar (Figura 13), sendo que a elevação do k_{La} possibilitou a exaustão desse açúcar em um tempo menor. Para o k_{La} de $4,9 \text{ h}^{-1}$, 48 h de fermentação não foram suficientes para a levedura esgotar 90 g.L^{-1} de substrato (residual de $9,75 \text{ g.L}^{-1}$). Para o k_{La} de 8 h^{-1} , todo o açúcar foi consumido neste intervalo e, para o maior k_{La} (45 h^{-1}), toda a fonte de carboidrato foi consumida na metade do tempo (24 h), refletindo na elevação da produtividade volumétrica (Q_p), apresentada na Tabela 7.

Na Figura 13, também é possível observar a elevação da concentração de xilitol, subproduto da via metabólica, excretado ao meio fermentativo ao longo da reação. Para o experimento em anaerobiose, a concentração atinge $11,49 \text{ g.L}^{-1}$ e é obtido um fator de conversão de xilose a xilitol ($Y_{\text{xilitol/xil}}$) de $0,40 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xil}}^{-1}$. Para as condições de microaeração, o valor médio do fator de conversão entre as três condições é de $0,24 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xil}}^{-1}$.

Veras et al. (2017), também realizaram experimentos com *S. passalidarum* em meio sintético, somente xilose, em condições de anaerobiose e oxigênio limitado, e observaram a diminuição da velocidade de consumo de xilose, na ausência de oxigênio, além da elevação da concentração de xilitol no meio. Sem aeração, 120 h de fermentação não foram suficientes para o consumo de 40 g.L^{-1} de xilose, produzindo somente 4 g.L^{-1} de etanol e uma considerável concentração de xilitol (3 g.L^{-1}). Outro trabalho relatou que o acúmulo de xilitol também afetou a produtividade do processo fermentativo, sendo mais acentuado em meio composto por xilose e glicose (120 e 30 g.L^{-1} , respectivamente),

chegando excretar 3 vezes mais subproduto do que o meio composto somente por pentose (SU et al., 2015). Como descrito anteriormente, o presente trabalho realizou experimentos com mistura desses açúcares (70% xilose e 30% glicose), resultando em uma concentração de xilitol excretado ao meio durante as condições de microaeração 5 vezes maior quando comparada ao trabalho de Su et al. (2015).

Tabela 7: Resultados obtidos durante as fermentações com *S. passalidarum*, sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio.

k_{La} (h^{-1})	Tempo (h)	Etanol ($g.L^{-1}$)	AR_{res} ($g.L^{-1}$)	CDW_f ($g.L^{-1}$)	Xilitol ($g.L^{-1}$)	η_E (%)	$Q_{P(etanol)}$ ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}$)
0	48	19,75 $\pm 0,03$	38,81 $\pm 0,26$	16,75 $\pm 0,87$	11,49 $\pm 0,08$	36,76 $\pm 0,05$	0,38 $\pm 0,00$	0,31 $\pm 0,01$	0,00 $\pm 0,00$
4,9	48	30,24 $\pm 0,36$	9,75 $\pm 1,88$	20,17 $\pm 0,05$	14,59 $\pm 0,38$	59,19 $\pm 1,58$	0,58 $\pm 0,01$	0,34 $\pm 0,00$	0,03 $\pm 0,01$
8	48	32,57 $\pm 0,13$	1,54 $\pm 0,92$	19,70 $\pm 1,13$	15,86 $\pm 0,13$	62,20 $\pm 1,44$	0,62 $\pm 0,00$	0,32 $\pm 0,00$	0,03 $\pm 0,00$
45	24	28,61 $\pm 0,42$	0,50 $\pm 0,64$	22,03 $\pm 0,24$	14,62 $\pm 0,40$	56,85 $\pm 0,50$	1,12 $\pm 0,01$	0,29 $\pm 0,00$	0,06 $\pm 0,00$

AR_{res} = açúcar redutor residual; CDW_f = massa seca final; η_E = rendimento em etanol; $Q_{P(etanol)}$ = produtividade volumétrica em etanol; $Y_{P/S}$ = fator de conversão de substrato em etanol, $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em célula.

Na Tabela 7, é possível observar que, para a condição de anaerobiose, foram registrados baixo título e baixo rendimento em etanol (19,75 $g.L^{-1}$ e 36,76%, respectivamente).

A leve queda observada no rendimento em etanol do experimento com k_{La} de 45 h^{-1} , em comparação ao k_{La} de 8 h^{-1} , pode ser explicada pelo maior fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$ de 0,06 $g.g^{-1}$), ou seja, uma maior aeração acarretou em uma maior produção de biomassa celular. Considerando que todas as fermentações foram lançadas com uma concentração celular de, aproximadamente, 17 $g.L^{-1}$, a massa celular ao final do experimento com maior k_{La} teve um crescimento de 33%, enquanto que para as demais condições de microaeração esse valor fica em torno de 13 %, correspondendo a um $Y_{X/S}$ de 0,03 $g.g^{-1}$. Já para o experimento em anaerobiose, não foi observado crescimento celular ao longo do processo fermentativo ($Y_{X/S}$ de 0,00).

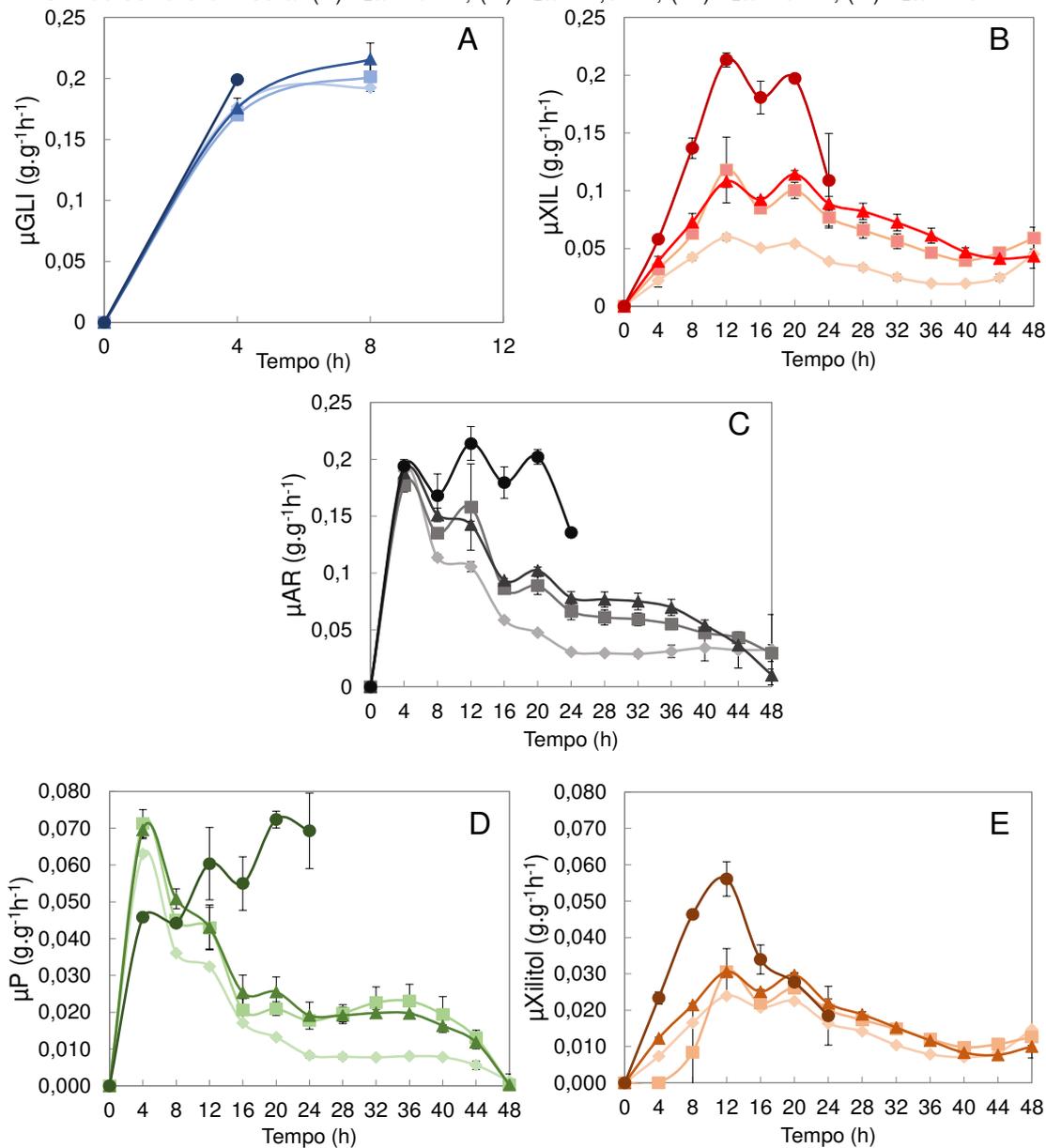
Leveduras *Crabtree* negativas têm a característica de desviar a rota metabólica frente à disponibilidade de oxigênio, favorecendo o crescimento celular na presença de maiores concentrações de oxigênio dissolvido ao meio, afetando os rendimentos em etanol, o que explica a elevação do fator de conversão de substrato em célula com a elevação do k_{La} (DU PREEZ, 1994; AGBOGBO e COWARD-KELLY 2008; DUSSÁN et al., 2016). Para este grupo de microrganismos, a produção de etanol é favorecida em condições de limitação de OD.

Um estudo realizado por Silva et al. (2012), com o objetivo de avaliar a influência de diferentes condições de transferência de oxigênio para a levedura *S. stipitis*, registrou que valores de k_{La} abaixo de 12 h^{-1} apresentaram os melhores resultados para a produção de etanol. Acima desse coeficiente, foi observado o desvio da rota, favorecendo o crescimento celular e afetando a produção de etanol. Skoog e Hahn-Hägerdal (1990) observaram que a ausência de oxigênio causou inibição do crescimento celular para esta levedura (*S. stipitis*). No presente trabalho, foram observados os mesmos comportamentos para *S. passalidarum*, isto é, além de não ser registrado crescimento celular em anaerobiose ($Y_{x/s}$ de 0,00), registrou-se lento consumo dos substratos, impactando na formação de etanol e no rendimento, ao contrário do que foi observado no trabalho de Hou (2012), que mesmo em ausência de oxigênio foi registrado crescimento celular. Entretanto, quando comparada a condição de aerobiose imposta por esse autor, foi necessário 4,5 vezes mais tempo para consumo total dos açúcares e o crescimento celular foi 4 vezes menor para a condição de anaerobiose.

Como mencionado anteriormente, a elevação da disponibilidade de oxigênio elevou a produtividade volumétrica, assim como as velocidades específicas de consumo de substratos e formação de etanol e xilitol, como apresentado na Figura 14 e na Tabela 8, onde é apresentada a média das velocidades registradas durante cada experimento.

Figura 14: Perfil de velocidades específicas de consumo de substratos: (A) Glicose, (B) xilose, (C) AR, e velocidades específicas de formação de: (D) etanol, (E) xilitol para as fermentações com diferentes valores de k_{La} , para a levedura *S. passalidarum*.

Símbolos referem-se a: (♦) $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (■) $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (▲) $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$.



É possível observar que a velocidade específica de consumo de glicose se manteve similar para todos os experimentos (Figura 14A), tanto em faixas de microaeração como em ausência de oxigênio. Já para o consumo de xilose (Figura 14B), é observada a elevação da velocidade específica com o aumento da disponibilidade de oxigênio, sendo que, para as condições de 4,9 e 8 h⁻¹, a velocidade se manteve semelhante, sendo duas vezes maior quando comparada à condição anaeróbica e 2,4 vezes menor que o valor para o k_{La} de 45 h⁻¹. No experimento com maior k_{La} , a mesma concentração de AR (soma de glicose +

xilose) foi consumida em um tempo consideravelmente menor, o que explica as velocidades específicas mais destacadas. Esse mesmo comportamento também é observado para a velocidade específica de formação de etanol e do subproduto xilitol, sendo que, para a faixa intermediária de microaerofilia (4,5 e 8 h⁻¹), a velocidade para o etanol é 1,5 vezes maior do que para a condição de anaerobiose e 2,2 vezes menor do que para o maior k_La. Já para a velocidade específica de formação de xilitol, a diferença significativa está no experimento com maior coeficiente de aeração, ressaltando que foram observadas concentrações similares desse analito para todas as condições, ou seja, o tempo novamente é responsável pela variação nas velocidades específicas.

Tabela 8: Média das velocidades específicas registradas durante o consumo de substratos e formação de produto e subproduto para as fermentações com diferentes k_La, para a levedura *S. passalidarum*.

k_La (h⁻¹)	μP (g.g⁻¹h⁻¹)	μXIL (g.g⁻¹h⁻¹)	μGLI (g.g⁻¹h⁻¹)	μAR (g.g⁻¹h⁻¹)	μXilitol (g.g⁻¹h⁻¹)
0	0,017 ± 0,000	0,037 ± 0,001	0,185 ± 0,001	0,061 ± 0,007	0,014 ± 0,000
4,9	0,026 ± 0,002	0,069 ± 0,005	0,186 ± 0,005	0,084 ± 0,005	0,015 ± 0,000
8	0,027 ± 0,002	0,075 ± 0,002	0,196 ± 0,011	0,090 ± 0,001	0,018 ± 0,001
45	0,058 ± 0,001	0,175 ± 0,009	0,199 ± 0,000	0,182 ± 0,001	0,034 ± 0,000

P = produto (etanol); XIL= xilose; GLI = glicose; AR= açúcar redutor.

Nakanishi et al. (2017) realizou fermentações com *S. passalidarum* utilizando como substrato um hidrolisado lignocelulósico obtido a partir de pré-tratamento alcalino seguido de hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose (meio composto por aproximadamente 75% glicose e 25% xilose), empregando a estratégia de reciclo celular em batelada alimentada. Os autores registraram uma velocidade instantânea de consumo de xilose na primeira batelada de 0,45 g.L⁻¹h⁻¹, a qual elevou-se a cada reciclo, chegando a uma velocidade de 0,60 g.L⁻¹h⁻¹. Neste trabalho, sob a mesma condição de operação (anaerobiose), essa velocidade foi de 0,665 g.L⁻¹h⁻¹, vale ressaltar que existe um grande

diferença na proporção e concentração de xilose entre os 2 trabalhos que explicaria a diferença no resultado. No caso da glicose, a velocidade instantânea de consumo foi similar para ambos os trabalhos (próximo a 3,4 g.L⁻¹h⁻¹).

Devido à proximidade dos rendimentos obtidos para as fermentações nas diferentes condições de microaeração, conforme apresentado na Tabela 6, foi realizado o teste de Tukey com 95% de confiança com o auxílio do *software* Statistica, com o objetivo de se avaliar se há diferença significativa entre tais rendimentos. O resultado gerado pelo *software* estão apresentados nos Anexos A (Tabela A.1), onde os valores em vermelho indicam as médias de rendimento significativamente diferentes a 95% de confiança. Com esses resultados, foi possível gerar a Tabela 9, onde as médias estatisticamente iguais a 95% de confiança são representadas pela mesma letra. Pode-se concluir que os rendimentos em etanol para os ensaios com k_{La} de 8 e 45 h⁻¹ são diferentes estatisticamente. Já para as condições de 4,9 e 8 h⁻¹ são estatisticamente iguais, sendo os maiores valores de rendimento observados.

Tabela 9: Teste de Tukey realizado para os rendimentos em etanol das fermentações com diferentes valores k_{La} , para a levedura *S. passalidarum*.

k_{La}	Média dos rendimentos	DP
0h ⁻¹	36,76 ^a	0,05
4,9h ⁻¹	59,19 ^{bc}	1,58
8h ⁻¹	62,20 ^b	1,44
45h ⁻¹	56,85 ^c	0,50

Este teste também foi realizado para a produtividade volumétrica (Q_p), (análises apresentadas no Anexo A – Tabela A.2), gerando a Tabela 10. Como nenhuma média de Q_p está associada à mesma letra, é possível afirmar, a 95% de confiança, que a produtividade volumétrica difere para todas as fermentações realizadas, tanto em microaeração quanto em anaerobiose.

Tabela 10: Teste de Tukey realizado para as produtividades volumétricas em etanol das fermentações com diferentes valores k_{La} , para a levedura *S. passalidarum*.

k_{La}	Média de produtividade volumétrica	DP
0h ⁻¹	0,380 ^a	0,05
4,9h ⁻¹	0,584 ^b	1,58
8h ⁻¹	0,622 ^c	1,44
45h ⁻¹	1,128 ^d	0,5

Sendo assim, por mais que os rendimentos não difiram estatisticamente nas fermentações com k_{La} de 4.9 e 8 h⁻¹ e que a concentração de etanol para as fermentações em microaeração sejam similares, o que difere esses processos é a produtividade volumétrica, sendo que o aumento da disponibilidade de oxigênio gerou um aumento de Q_p , bem como das velocidades específicas de consumo e formação, resultando em uma fermentação mais rápida. Em termos de escalonamento de processo isto implicaria em redução no CAPEX (capital ou investimento em bens de capital), uma vez que reduziria o número de dornas de fermentação em uma instalação industrial, por exemplo.

O mesmo resultado foi observado por Bellido et al. (2013), que, ao avaliar o efeito da aeração para a levedura *S. stipitis*, verificou que um k_{La} de 3,8 h⁻¹ refletiu na redução de 42,9% do tempo de fermentação de um hidrolisado de palha de trigo quando comparado ao mesmo experimento sem aeração.

Sendo assim, o k_{La} de 45 h⁻¹ se destaca, uma vez que a média dos rendimentos é similar às médias registradas nas demais condições de microaeração e a produtividade volumétrica é maior, refletindo em uma significativa redução do tempo de processo (metade do tempo). Dessa forma, nessa condição, é possível realizar duas bateladas de fermentações no mesmo tempo em que se realiza apenas uma com k_{La} de 8 h⁻¹, produzindo-se o dobro da quantidade de etanol.

Outra grande vantagem desta condição (k_{La} 45 h⁻¹) é a renovação celular proporcionada durante a fermentação sem causar perdas significativas de rendimento, o que se torna um diferencial uma vez que a reutilização do creme de leveduras durante bateladas consecutivas (reciclo celular) requer células ativas e viáveis. Essa característica é observada em usinas de 1G, onde a *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo em condição de anaerobiose, promove a renovação celular, possibilitando a reutilização deste creme por longos períodos sem perda de viabilidade.

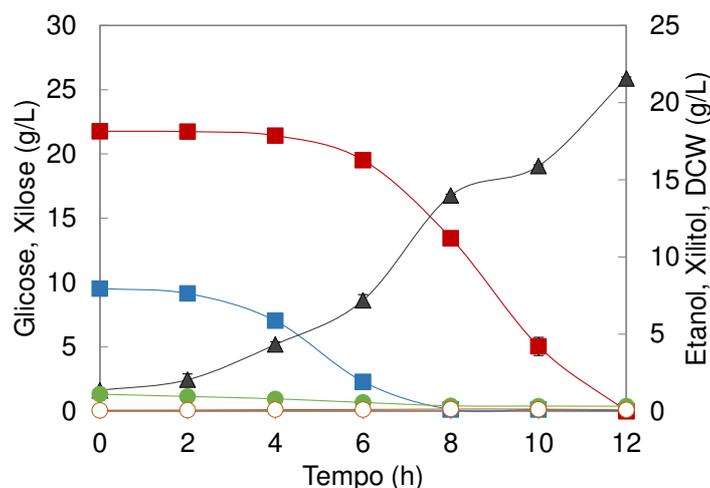
4.4 Propagação em batelada (condição de aerobiose)

Nesse experimento, o oxigênio dissolvido foi mantido entre 40 e 50% em relação a saturação com ar atmosférico através de controle automático em cascata que variou agitação (de 200 à 900 rpm) e aeração (0,1 e 2 Lpm). Como o objetivo principal desse experimento foi a obtenção de parâmetros cinéticos

respiratórios da levedura, o meio foi composto por uma concentração menor de açúcares (30 g.L^{-1}) quando comparado ao meio utilizado nos experimentos com valores de k_{LA} definidos, assim como uma menor concentração de levedura inoculada ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Na Figura 15 é possível ver o perfil da propagação celular de *S. passalidarum* (condição de aerobiose).

Figura 15: Perfil de propagação de *S. passalidarum* (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático. Símbolos referem-se a: (■) – Glicose; (■) – Xilose; (▲) – CDW; (●) – Etanol; (○) – Xilitol.



É possível observar que, em condição de aerobiose, o fluxo metabólico é totalmente desviado para crescimento celular, também favorecido pelas condições aplicadas no experimento (concentração de células e de AR). Como já comentado anteriormente, leveduras *Crabtree* negativas favorecem o crescimento celular quando submetidas a uma elevada disponibilidade de oxigênio, reduzindo a produção de etanol (DU PREEZ, 1994; AGBOGBO e COWARD-KELLY 2008; DUSSÁN et al., 2016). Dessa forma, justifica-se a ausência de etanol e xilitol ao final de 1 h de fermentação, mesmo sob completa exaustão da fonte de carbono, resultando em uma produtividade de etanol igual a zero (Tabela 11), bem como ausência de velocidade específica de formação de etanol (Tabela 12). Neste experimento, a massa celular inoculada (em base seca) foi de $1,35 \text{ g.L}^{-1}$, e a massa seca final obtida foi de $21,57 \text{ g.L}^{-1}$ (16 vezes maior), o que reflete em um fator de conversão de substrato em célula elevado ($0,65 \text{ g.g}^{-1}$). Veras et al. (2017) também observou a influência da disponibilidade de oxigênio, sendo que o crescimento celular foi 2 vezes maior para a condição de aerobiose quando comparada a condição de limitação de oxigênio,

decrecendo a produção de etanol. Já Long et al. (2012) observou o completo desvio de rota, assim como o registrado nesse trabalho, frente a elevada disponibilidade de oxigênio, onde nenhuma produção de etanol foi registrada.

Tabela 11: Dados obtidos durante propagação celular de *S. passalidarum* (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático.

Tempo	Etanol	AR _{residual}	CDW _{final}	η_E	$Q_{P(\text{etanol})}$	$Y_{X/S}$
(h)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(%)	(g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	(g.g ⁻¹)
12	0,32	0,00	21,57	0,00	0,00	0,65
	± 0,00	± 0,00	± 0,09	± 0,00	± 0,00	± 0,00

AR = açúcar redutor; CDW = massa seca; η_E = rendimento em etanol; $Q_{P(\text{etanol})}$ = produtividade volumétrica; $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em célula.

Assim como nos experimentos com k_{LA} fixo, foi observado o consumo sequencial de AR, visto que houve um maior consumo de xilose a partir de 4 h, quando a concentração de glicose já estava abaixo de 8 g.L⁻¹.

Na Figura 16 é apresentado o perfil das velocidades específicas de consumo de substratos e de formação de etanol e xilitol. Na Tabela 12 é apresentado o valor médio das velocidades específicas registradas durante a propagação celular.

Figura 16: Perfil de velocidades específicas de consumo de substratos e de formação de produto e subproduto durante propagação celular de *S. passalidarum* (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático. Símbolos referem-se a: (■) – Glicose; (■) – Xilose; (●) – AR; (▲) – CDW; (●) – Etanol; (○) – Xilitol.

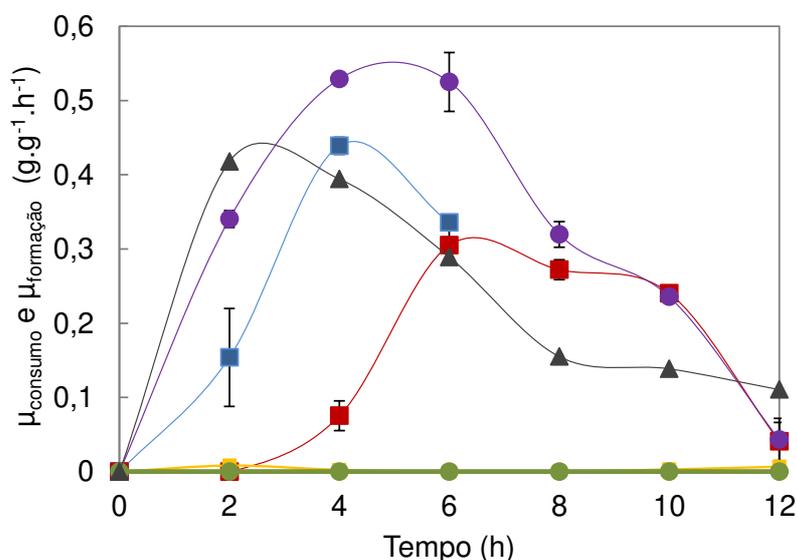


Tabela 12: Média das velocidades específicas registradas durante o consumo de substratos e a formação de produto para propagação celular da *S. passalidarum* (condição de aerobiose), com concentração de oxigênio dissolvido mantido entre 40 e 50% através do controle automático.

μ_P	μ_{XIL}	μ_{GLI}	μ_{AR}	μ_X	$\mu_{Xilitol}$
(g.g ⁻¹ h ⁻¹)					
0,000	0,187	0,310	0,332	0,251	0,004
± 0,000	± 0,001	± 0,028	± 0,007	± 0,018	± 0,000

P = produto (etanol); XIL= xilose; GLI = glicose; AR= açúcar redutor.

É possível observar que foram registradas velocidades específicas elevadas de formação celular que acompanham o perfil da velocidade específica de consumo de açúcares. A velocidade específica de crescimento é maior durante o consumo de glicose, antes das 8 h de experimento, obtendo-se a maior velocidade específica nesse período (0,42 h⁻¹). Após esse tempo, inicia-se o consumo, unicamente, da xilose, causando diminuição da velocidade específica de crescimento, a qual se estabiliza em torno de 0,14 h⁻¹ até a exaustão dessa fonte de carbono.

Comparando-se as velocidades específicas obtidas no experimento em aerobiose (Tabela 12) com as obtidas nos experimentos em microaeração (Tabela 8), nota-se uma elevação nas velocidades de consumo de açúcares.

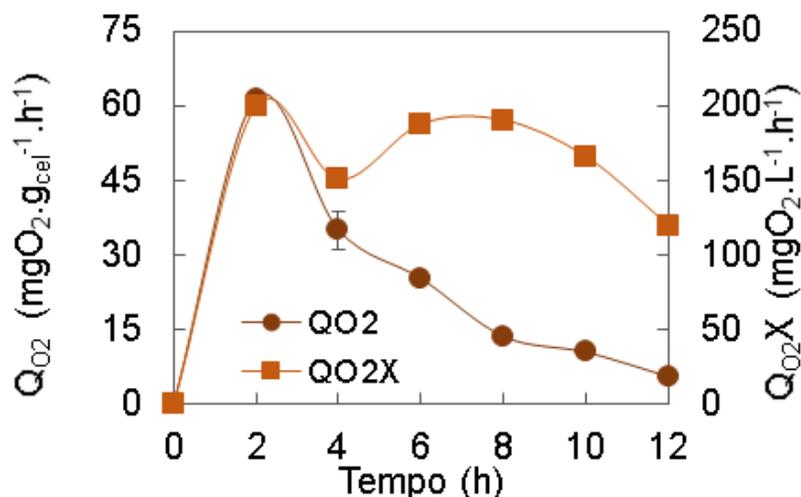
Tanto a velocidade específica de consumo de xilose (μ_{XIL}) quanto o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) são maiores para o presente trabalho (0,187 g.g⁻¹h⁻¹ e 0,65 g.g⁻¹, respectivamente) do que os obtidos por Veras et al. (2017) (0,13 g.g⁻¹h⁻¹ e 0,33 g.g⁻¹, respectivamente), sendo que, no trabalho de Veras et al. (2017), a injeção de ar manteve a concentração de oxigênio dissolvido acima de 60% durante todo o tempo de fermentação e o meio era composto somente por xilose. Entretanto, os autores reportaram o desvio metabólico para a via fermentativa, causando a produção de etanol em detrimento do crescimento celular. Su et al. (2015) observaram a queda na conversão de substrato em etanol ao elevar a disponibilidade de oxigênio em meio composto por mistura de glicose e xilose, refletindo na elevação da conversão em células. Em experimentos realizados sob menor disponibilidade de oxigênio, a levedura não foi capaz de utilizar todo o açúcar em 120 h. Entretanto, ao elevar a concentração de oxigênio disponível em duas vezes (79 para 151,4 mgO₂.L⁻¹h⁻¹), o açúcar foi consumido em 96 h (SU et al., 2015). Comparando-se a condição de anaerobiose com a condição de aerobiose, a

redução do tempo foi ainda mais significativa (5 vezes menor) e a produção de célula foi visivelmente maior (HOU, 2012).

Devido ao controle automático para manter a faixa de OD elevada, a agitação e a aeração não são constantes ao longo do experimento, ou seja, o k_{La} não pode ser conhecido previamente. Sendo assim, para determinação dessa grandeza e também da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}), foi aplicado o método dinâmico (descrito no item 3.5.4).

A Figura 17 apresenta os dados de velocidade de consumo de oxigênio (Q_{O_2X}) e velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}).

Figura 17: Perfil da velocidade de consumo de oxigênio e velocidade específica de consumo de oxigênio para condição de aerobiose com *S. passalidarum*.



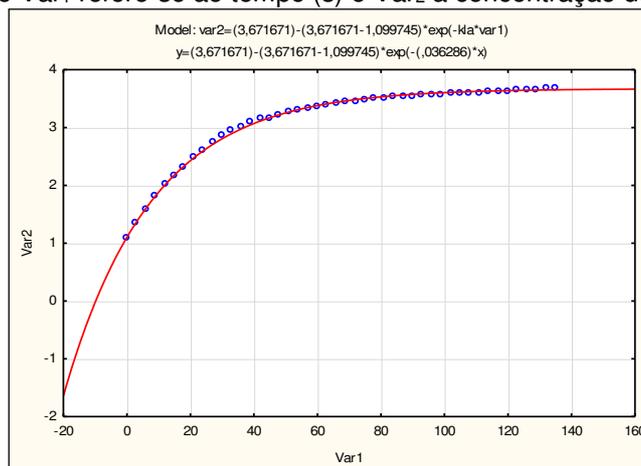
De acordo com a Figura 17, observa-se que a velocidade de consumo de oxigênio (Q_{O_2X}) se manteve entre 120 e 200 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Já a velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) permaneceu entre 5 e 62 $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Cabe ressaltar que o perfil obtido para Q_{O_2} é similar ao perfil observado para μ_x (Figura 16), onde o maior Q_{O_2} foi registrado em 2 h de processo, durante o consumo de glicose (61,5 $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), apresentando uma queda durante o consumo de xilose. Pode-se dizer que o consumo de oxigênio se mantém praticamente estável ao longo das 12 h de fermentação (Q_{O_2X}). Porém, devido à variação celular de 1,5 até 21,6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, a velocidade específica (Q_{O_2}) diminui ao longo do tempo.

Taniguchi et al. (1997) observaram Q_{O_2} inferiores para cultivo de *S. stipitis* em xilose quando comparados à glicose. Nesse trabalho, os autores obtiveram um Q_{O_2} máximo de 50 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em xilose e de 200 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ em glicose.

Entretanto, essas altas velocidades de respiração afetaram a velocidade específica máxima de formação de etanol. Sendo assim, os autores concluíram que, para otimizar a formação de produto, as velocidades devem ser mantidas em 14,3 e 66,7 $\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para xilose e glicose, respectivamente.

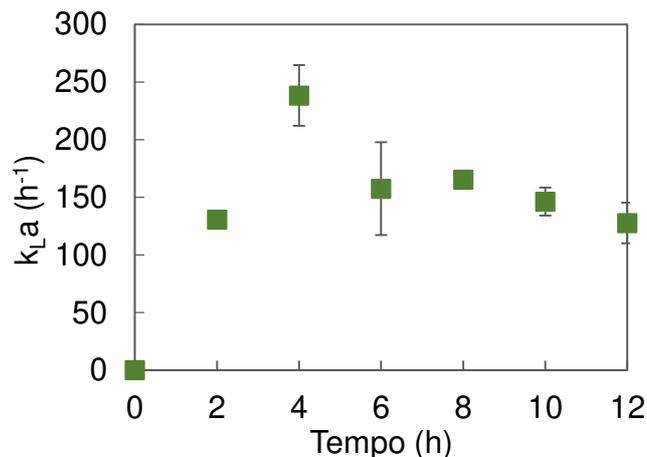
Através da execução do método dinâmico, foi possível obter o perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) durante a retomada da aeração controlada automaticamente pelo biorreator (modo cascata), considerando que a velocidade de respiração é constante, ou seja, não tenha sido afetada. Plotando-se os dados de concentração de oxigênio dissolvido (C [$\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$]) versus o tempo, os valores de k_{La} foram obtidos a partir da Equação 9 com auxílio do *software* Statistica. A figura 18 exemplifica a execução desta metodologia.

Figura 18: Exemplo da determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio durante a execução do método dinâmico para experimentos em condição de aerobiose com *S. passalidarum*. Onde Var₁ refere-se ao tempo (s) e Var₂ a concentração de oxigênio ($\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{L}^{-1}$).



O exemplo apresentado acima refere-se ao reestabelecimento da concentração de OD pelo controle automático após a execução do método dinâmico no tempo de 2 h de propagação. Nestas condições, o k_{La} foi de $0,036286 \text{ s}^{-1}$, ou seja, $130,63 \text{ h}^{-1}$. Seguindo essa metodologia, foi possível determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio para cada aplicação do método dinâmico durante o cultivo celular (condição de aerobiose). As médias dos coeficientes obtidos a cada condição de retomada de aeração são mostradas na Figura 19.

Figura 19: Perfil do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio obtidos na retomada da aeração, impostas pelo controle automático, para fermentação em aerobiose com *S. passalidarum*.



Os valores de k_{La} obtidos durante a execução do método dinâmico (Figura 19) variaram de 127,7 até 238,4 h^{-1} , sendo o maior valor registrado em 4 h de processo. De acordo com a metodologia citada na literatura se deveria realizar a medição de K_p (constante de atraso do eletrodo) para verificar a necessidade de correção dos valores de k_{La} . No entanto, usando a metodologia de correção de valores de k_{La} se teria valores da ordem de 750 h^{-1} para o trecho de crescimento exponencial. Porém, devido à incerteza da confiabilidade dos dados, optou-se por não realizar a correção nesta versão do trabalho. Acredita-se que os valores elevados podem ter ocorrido, pois com a retomada da aeração e como esta variável estava sob controle automático (modo cascata), pode ter havido uma grande injeção de ar visto que as células estavam em fase de crescimento exponencial, com uma alta necessidade de O_2 após o período de interrupção da aeração.

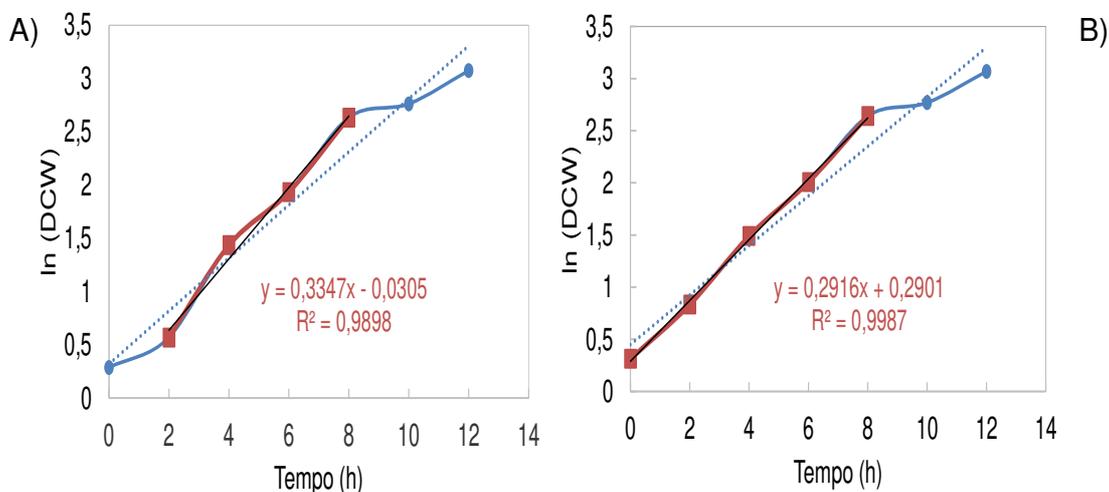
A utilização de elevada concentração celular já é amplamente aplicada em usinas de primeira geração e apresentou bons resultados para as fermentações desse trabalho. Sendo assim, para tornar essa metodologia viável, é necessária uma etapa de propagação celular bem estabelecida e eficiente. No presente trabalho, a etapa de propagação apresentou elevadas velocidades de conversão de substrato em célula, sem desvio de rota metabólica para produção de etanol ou subprodutos. Ou seja, a aplicação desse protocolo, em que se controla o consumo de oxigênio pela alimentação linear de açúcar, é uma possível alternativa para obtenção de uma alta densidade celular para ser

aplicada nas fermentações. A estimação dos parâmetros cinéticos referentes a essa etapa é de fundamental importância para dimensionamento dos biorreatores de propagação celular em larga escala para que a aeração esteja sempre em um nível adequado, uma vez que o processo adotado é similar ao encontrado nas usinas de etanol 1G.

4.5 Estimação de parâmetros cinéticos e de respiração

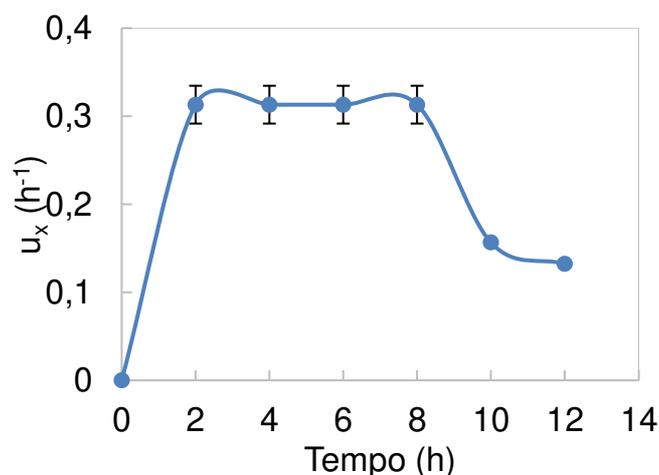
A velocidade específica máxima de crescimento da biomassa (μ_{max}) foi obtida a partir do ajuste linear dos dados na fase exponencial de crescimento, sendo representada pelo coeficiente angular da reta $\ln(X)$ versus tempo. Os valores de μ_x para as fases de desaceleração do crescimento e estacionária foram obtidos a partir da derivação do ajuste polinomial dos dados de massa seca versus tempo. A Figura 20 apresenta a determinação das velocidades específicas de crescimento para cada replicata.

Figura 20: $\ln(x)$ versus tempo para para o cada replicata do cultivo celular (condição de aerobiose) para *S. passalidarum*. O coeficiente angular dos ajustes lineares na fase exponencial representam o valor da velocidade específica máxima de crescimento celular (pontos em vermelho).



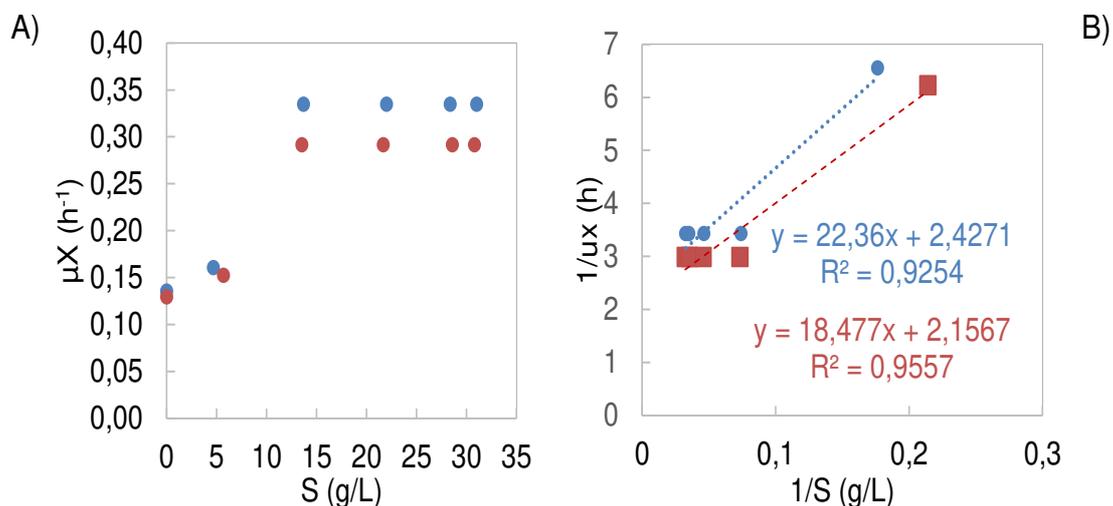
Para a replicata A, a fase exponencial se estende de 2 a 8 h, refletindo em um μ_x de $0,3347 \text{ h}^{-1}$. Para a replicata B, esse valor é de $0,2916 \text{ h}^{-1}$, com uma fase exponencial que varia entre o tempo inicial e 8 h. Realizando a média desses valores e considerando as velocidades específicas de crescimento além faixa exponencial, é obtido o gráfico da Figura 21.

Figura 21: Perfil da velocidade específica de crescimento celular (μ_x) para o cultivo celular (condição de aerobiose) para *S. passalidarum*.



Sendo assim, conhecendo-se o perfil da velocidade específica de crescimento da biomassa (μ_x) e aplicando a linearização de Lineweaver-Burk (Equação 19), é possível obter os valores de μ_{max} e K_s . Onde μ_{max} é representado pelo inverso do coeficiente linear e K_s é igual ao valor de μ_{max} multiplicado pelo coeficiente angular dessa reta. A Figura 22 apresenta as retas obtidas para cada replicata de cultivo celular.

Figura 22: Relação entre a concentração do substrato limitante e a velocidade específica de crescimento celular para determinação dos parâmetros da equação de Monod, onde cada cor representa uma replicata.

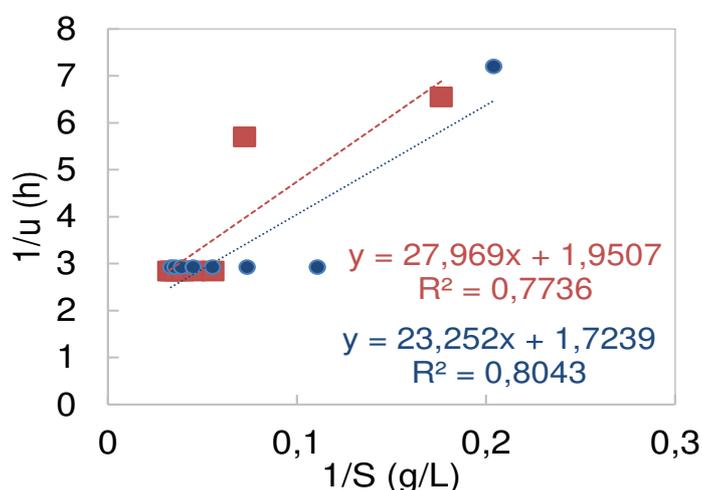


É observado que, no início do cultivo (Figura 22), onde a concentração de substrato é maior, são registradas as maiores velocidades específicas de crescimento, valores mais próximos a μ_{max} . A partir do gráfico gerado do inverso de μ_x ($1/\mu_x$) pelo inverso da concentração de substrato ($1/S$), são obtidos os

valores de μ_{\max} para cada replicata, com uma média de $0,44 \text{ h}^{-1}$ ($\pm 0,03$), além dos valores de K_s , com uma média de $8,9 \pm 0,32$. K_s refere-se à concentração de substrato na qual a velocidade específica de crescimento é a metade do seu valor máximo, conforme indicado pela equação de Monod (Equação 11).

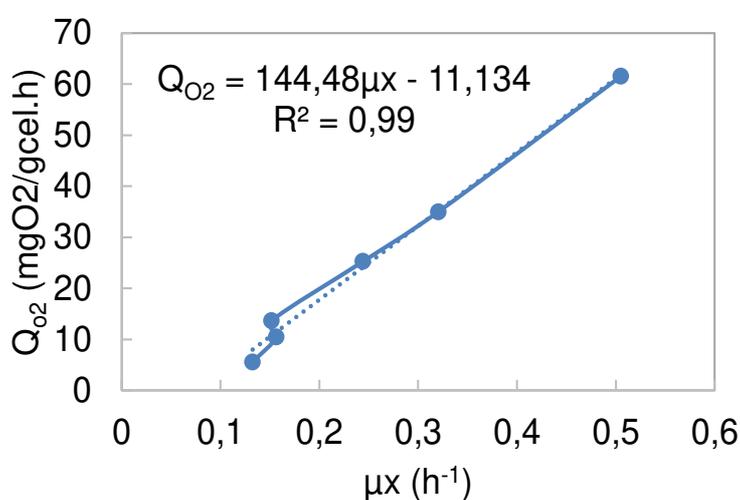
Como pode ser observado na Figura 22 B, para obtenção dos parâmetros de Monod, uma reta com poucos pontos é obtida, devido à pouca quantidade de amostras retiradas durante o experimento. Para elevar a confiabilidade desses dados foi gerado um novo gráfico de $1/\mu_x$ versus $1/S$ com dados estimados a partir dos dados experimentais, como descrito no item 3.8. A Figura 23 apresenta os dados obtidos a partir desta metodologia.

Figura 23: Determinação dos parâmetros da equação de Monod a partir de dados estimados, onde cada cor representa uma replicata.



Segundo Schmidell (2001), microrganismos com elevada velocidade de crescimento (μ_x) refletem em altas velocidades específicas de respiração (Q_{O_2}). Pirt (1975), sugere uma relação linear destes parâmetros (Equação 16). Plotando-se os dados de Q_{O_2} por μ_x obtém-se a velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular (m_{O_2}) e o fator de conversão de oxigênio em biomassa (Y_{X/O_2}). A Figura 24 apresenta a reta obtida para a condição de aerobiose (propagação celular) para *S. passalidarum*.

Figura 24: Relação entre a velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) e a velocidade específica de crescimento celular (μ_x) para determinação de m_{O_2} e Y_{X/O_2} para a condição de aerobiose (propagação celular) para *S. passalidarum*.



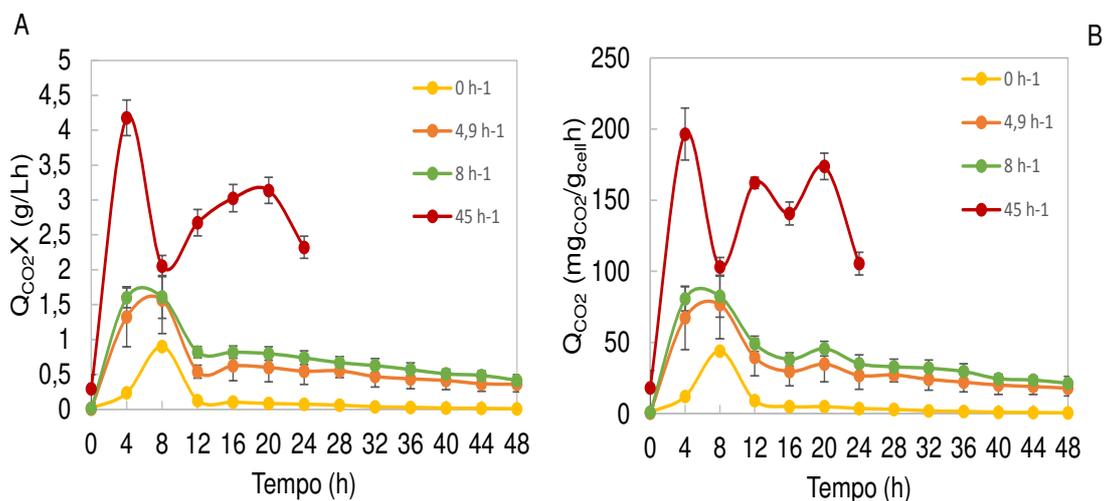
A partir da Figura 24 e da equação de Pirt (Equação 16), foi possível determinar os parâmetros relacionados à respiração celular para o cultivo celular (condição de aerobiose). O fator de conversão de oxigênio em biomassa é representado pelo inverso do coeficiente angular da reta formada a partir do gráfico de Q_{O_2} por μ_x . Neste caso, Y_{X/O_2} foi de $6,9213 \text{ g}_x \cdot \text{g}_{O_2}^{-1}$. Já o coeficiente de manutenção (m_{O_2}) refere-se à velocidade específica de consumo de O_2 para manter as células viáveis representado pelo coeficiente linear da reta. Sendo assim, m_{O_2} é de $11,134 \text{ mg}_{O_2} \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Era esperado que com a metodologia descrita no item 3.9 (Monitoramento de gases de entrada e saída durante as fermentações) fosse possível determinar os dados de respirometria durante as condições fermentativas (anaerobiose e aerobiose). Porém, devido ao baixo crescimento celular, não foi possível estabelecer um perfil de velocidade de crescimento durante o processo. Acredita-se que esse baixo consumo de oxigênio registrado durante as

fermentações está associado à manutenção celular, mantendo a produção de etanol, e não ao crescimento celular e às variáveis associadas a estes parâmetros como, por exemplo, μ_x . Dessa forma, a relação de Pirt não é válida para condições onde a via fermentativa é mais expressiva refletindo em baixo ou zero crescimento celular.

Entretanto, com a metodologia de monitoramento de gases, foi possível acompanhar e obter perfis de formação de CO_2 , uma vez que a formação deste gás foi mais significativa. Os perfis de velocidade de formação ($Q_{\text{CO}_2\text{X}}$) e velocidade específica de formação de gás carbônico (Q_{CO_2}) são apresentados na Figura 25.

Figura 25: Perfil da velocidade de formação de CO_2 (A) e velocidade específica de formação de CO_2 (B) para condição de anaerobiose e microaeração com *S. passalidarum*. Símbolos referem-se: (●) – $k_{\text{LA}} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{\text{LA}} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{\text{LA}} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{\text{LA}} = 45 \text{ h}^{-1}$.



Como pode ser observado na Figura 25, a velocidade de formação de CO_2 é intensificada com a elevação da disponibilidade de O_2 , com um valor máximo durante o consumo de glicose, como já foi observado nas demais velocidades de consumo e de formação, bem como a similaridade dos perfis entre os coeficientes 4,9 e 8 h⁻¹ e os valores mais elevados para o maior k_{LA} (45 h⁻¹). O consumo de xilose acontece a partir de 8 h de processo, sendo possível observar a alteração das velocidades de formação de CO_2 a partir deste momento, onde, majoritariamente, é registrado produção de etanol.

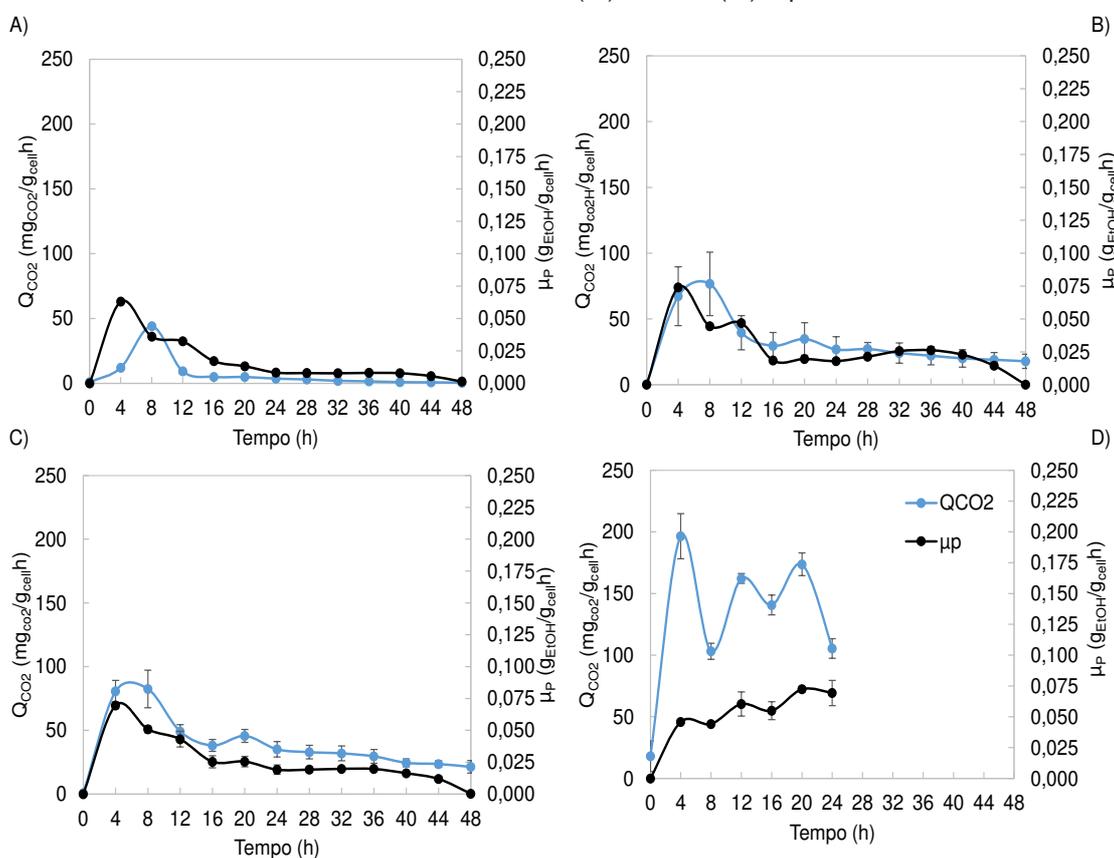
Para a condição de anaerobiose, uma pequena produção de CO_2 é registrada durante o consumo de glicose e, após exaustão desse açúcar, esse valor é reduzido até atingir valores muito próximos a zero.

No trabalho de Kolling (2017), a concentração de OD para cultivos do fungo *T. harzianum* variaram entre 0,2 a 50%, ou seja, diferentes disponibilidades de oxigênio. Assim como neste trabalho, a formação de CO₂ foi superior durante os níveis mais altos de OD.

No presente trabalho que tem o foco na produção de etanol de segunda geração, a formação de gás carbônico está diretamente relacionado com a formação de etanol, como pode ser observado na Figura 26, a qual apresenta os perfis de velocidades específicas de formação de etanol e de gás carbônico.

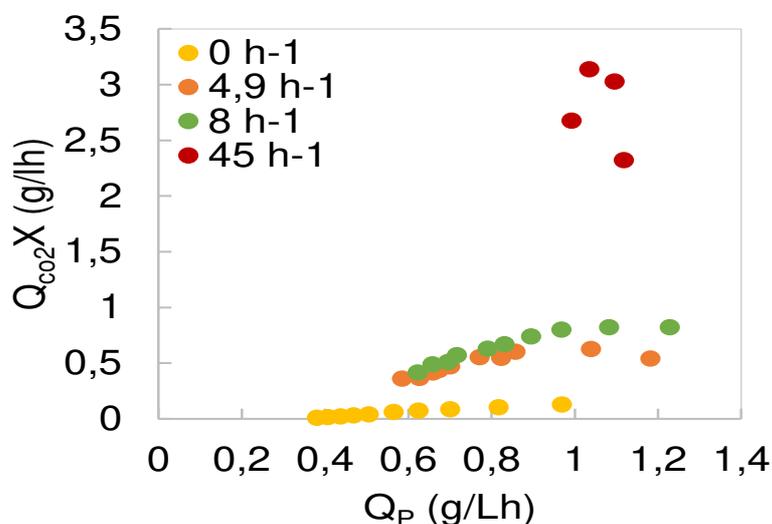
Figura 26: Perfil de velocidade específica de formação de CO₂ e etanol para as fermentações utilizando *S. passalidarum* sob diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio: (A) anaerobiose $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$, (B) $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$, (C) $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$, (D) $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$.

Símbolos referem-se a: (●) – Q_{CO_2} ; (●) – μ_P .



A partir das curvas de velocidades específicas de formação de CO₂ e etanol apresentadas na Figura 26, é possível observar a similaridade entre os perfis. Na Figura 27, a relação entre formação de gás carbônico e etanol é ressaltada através dos dados de velocidade de formação de CO₂ ($Q_{CO_2}X$) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) durante o consumo de xilose.

Figura 27: Relação entre a velocidade específica de formação de CO₂ e a produtividade volumétrica de etanol para condição de anaerobiose e microaeração com *S. passalidarum* durante o consumo da xilose. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$.



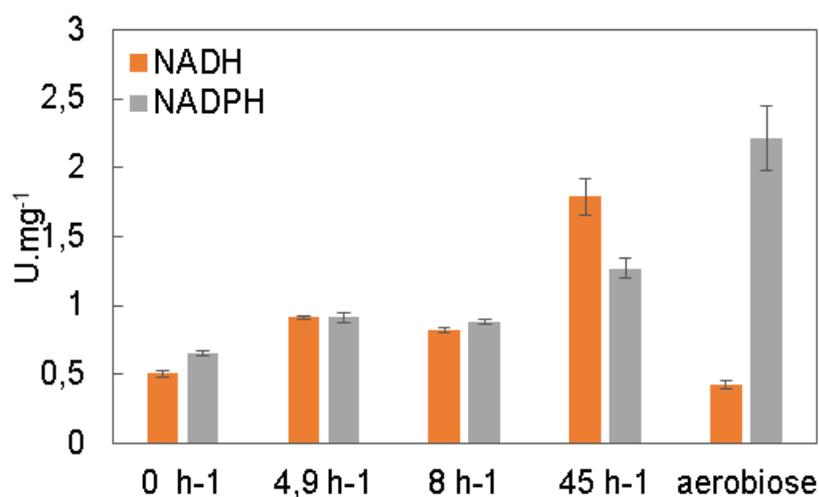
A Figura 27 comprova a relação linear entre formação de etanol e CO₂, principalmente para as condições onde somente a via fermentativa estava ativa (anaerobiose e k_{La} de 4,9 e 8 h⁻¹). Como mencionado anteriormente, a disponibilidade de O₂ afeta a velocidade de consumo de xilose, o que exerce influência sobre velocidade de formação de etanol e, conseqüentemente, na formação de CO₂. Novamente, há uma similaridade de resultados entre os coeficientes 4,9 e 8 h⁻¹.

Para a condição de k_{La} 45 h⁻¹, devido ao leve desvio de rota para o crescimento e ao rápido consumo de xilose, a velocidade de formação de CO₂ é mais elevada, uma vez que este gás também é produzido durante o crescimento celular. Sendo assim, a relação linear entre $Q_{CO_2}X$ e Q_P observada nas outras condições não é válida para o k_{La} 45 h⁻¹.

4.6 Caracterização da atividade enzimática (enzimas XR e XDH)

A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme metodologia descrita no item 3.9 (TRAMONTINA et al., em submissão). Para a enzima XR, foram realizados experimento variando as coenzimas entre NADPH e NADH (Figura 28), enquanto que para a enzima XDH a coenzima utilizada foi NAD⁺ (Figura 29).

Figura 28: Atividade enzimática da XR para as coenzimas NADPH e NADH.



Pode-se notar que a atividade enzimática em microaerofilia é maior do que a atividade enzimática em anaerobiose para as duas coenzimas. Considerando a atividade enzimática nos ensaios em microaerofilia, a maior a atividade da enzima XR (para coenzimas NADPH e NADH) foi para o ensaio com k_{La} 45 h⁻¹, seguida pela atividade dos ensaios a k_{La} 4,9 e 8 h⁻¹. Em anaerobiose, k_{La} 4,9 e 8 h⁻¹, não foi observada preferência da enzima XR por nenhuma das duas coenzimas. Já para o maior k_{La} (45 h⁻¹), a preferência foi pela utilização de NADH e em aerobiose a preferência foi por NADPH.

Segundo a sequência de genoma publicada por Wohlback et al. (2011) e estudos de Cadete et al. (2016), *S. passalidarum* possui duas enzimas XR (gene XIL1.1 e XIL1.2), sendo a primeira estritamente dependente de NADPH e a segunda, apesar de usar as duas coenzimas, com maior preferência por NADH.

No trabalho de Veras et al. (2017), em condição de microaeração, as atividades específicas da XR para as coenzimas NADH e NADPH foram de 0,60 e 0,46 U.mg_{proteína}⁻¹ em meio contendo somente pentose, resultando em uma razão de 1,29 (NADH/NADPH). No presente trabalho, as atividades médias para os valores de k_{La} de 4,9 e 8 h⁻¹ foram de 0,87 e 0,89 U.mg_{proteína}⁻¹, respectivamente, com uma razão (NADH/NADPH) média de 0,97 entre as coenzimas. Sendo assim, a enzima XR não teve uma preferência significativa por coenzima nessas faixas de k_{La} . Para o maior k_{La} (45 h⁻¹), porém, esta razão foi de 1,41, ou seja, a preferência por NADH foi mais significativa.

No trabalho de Hou (2012), a XR da *S. passalidarum* teve uma preferência por NADH em experimento realizado com mistura de pentose e hexose (50:50)

em anaerobiose. A atividade específica de XR para a coenzima NADH foi de 0,51 U.mg_{proteína}⁻¹, enquanto que para NADPH foi de apenas 0,11 U.mg_{proteína}⁻¹, ou seja, valores maiores do que os observados em meio contendo somente glicose e menores do que os observados em xilose na mesma condição de aeração.

No presente trabalho, na mesma condição de transferência de oxigênio, as atividades específicas para NADH e NADPH foram de 0,51 e 0,65 U.mg_{proteína}⁻¹, respectivamente. Sendo assim, a atividade específica de XR utilizando a coenzima NADH foi a mesma registrada por Hou (2012), porém a atividade para NADPH foi mais elevada para o presente trabalho. Diferentemente do que foi observado por Hou (2012), apesar de ambos os trabalhos terem sido realizados em condição de anaerobiose e em meio composto por mistura de açúcares, a levedura não teve preferência marcada por coenzima. Um fator que difere os dois trabalhos é a massa celular inoculada, pois, enquanto Hou (2012) inicia seus experimentos com baixa concentração celular e registra crescimento, no presente trabalho é inoculada uma alta concentração celular, não sendo registrado crescimento em anaerobiose. Cabe ressaltar, também, que os experimentos em anaerobiose realizados por Hou (2012) foram executados em frascos *Erlenmeyer* sem eliminação prévia do oxigênio contido no meio de cultivo através da injeção de nitrogênio, o que pode ter alterado o metabolismo celular. No experimento com o maior k_{La} (45 h⁻¹), onde são observadas as duas rotas de utilização de xilose ativas (crescimento e produção de etanol), é registrada uma preferência de XR por NADH (citada por Hou (2012)). Sendo assim, supõe-se que a preferência por coenzima está relacionada com a rota metabólica, isto é, se ambas as vias estiverem ativas, a preferência da XR será por NADH. Porém, caso somente a via fermentativa estiver ativa, essa preferência será minimizada.

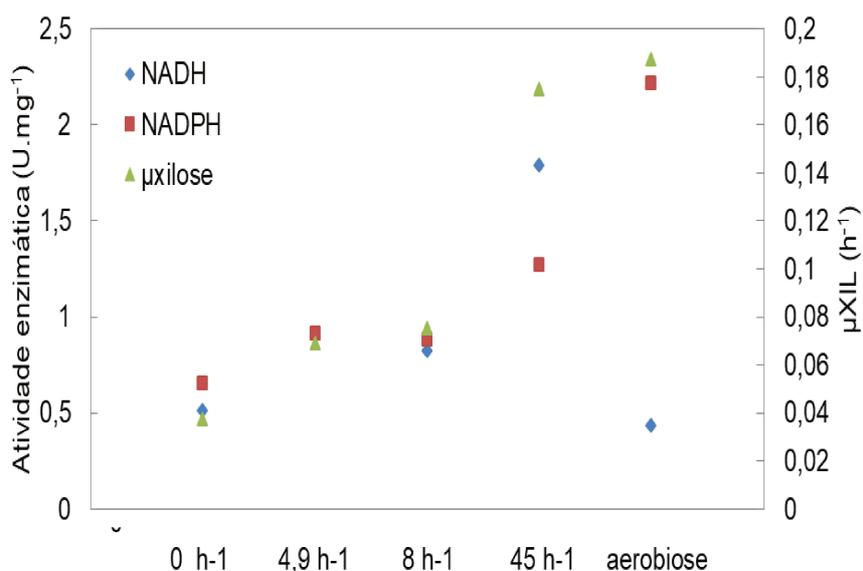
Em aerobiose, onde a rota metabólica foi totalmente desviada para a via respiratória (promovendo elevado crescimento celular), a XR preferiu a coenzima NADPH (razão NADH/NADPH de 0,19), sendo que a atividade de XR com esta coenzima foi de 2,21 U.mg_{proteína}⁻¹. Veras et al. (2017) obtiveram uma razão de NADH/NADPH 1,38, porém, ambas as rotas metabólicas estavam ativas e, como mencionado anteriormente, quando tanto crescimento celular quanto formação de etanol estiverem sendo observados, XR terá preferência por NADH. Com

isso, supõe-se que quando somente a via respiratória estiver ativa, a preferência será por NADPH.

Para *S. stipitis*, as atividades enzimáticas de XR para ambas as coenzimas, em condição de aerobiose ou microaeração, foram menores do que os observados para a *S. passalidarum*. Porém, as razões NADH/NADPH foram menores do que 1, ou seja, *S. stipitis* tem preferência por NADPH (Veras et al., 2017). Como a próxima enzima da via da xilose (XDH) é estritamente dependente de NAD⁺, o uso preferencial de NADPH por *S. stipitis* agrava o desequilíbrio de coenzimas, enquanto que, para *S. passalidarum*, esse desequilíbrio é amenizado pelo fato de uma das enzimas XR ter preferência por NADH. Como pôde ser observado, a levedura *S. passalidarum* apresenta melhor desempenho que *S. Stipitis* em condições de anaerobiose, o que também pode ser atribuído às preferências das enzimas XR da *S. passalidarum*. Entretanto, vale ressaltar que condições de microaeração se mostraram superiores para o consumo de xilose e produção de etanol quando comparadas à anaerobiose.

Na Figura 29 é possível observar o perfil da atividade específica de XR para as coenzimas NADH e NADPH em comparação com o perfil da velocidade específica de consumo de xilose.

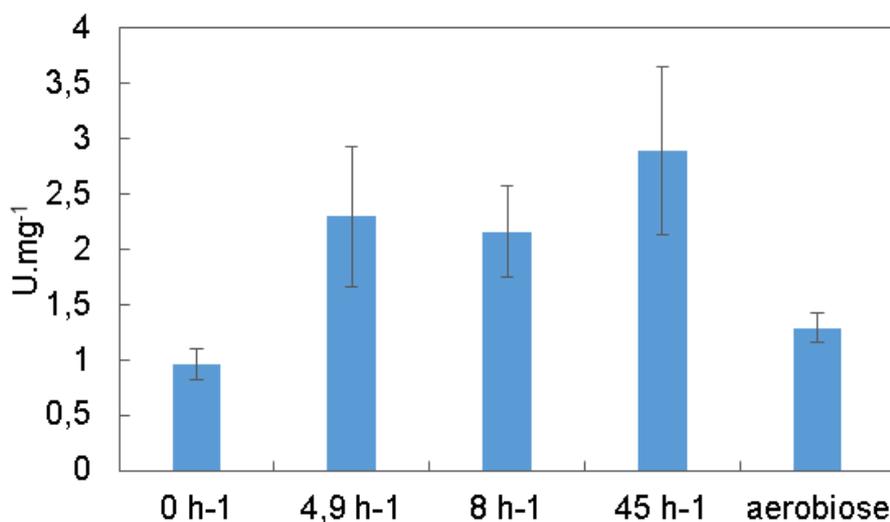
Figura 29: Atividade enzimática da XR para as coenzimas NADH e NADPH e velocidade específica de consumo de xilose. Símbolos refere-se a: (■) – Atividade enzimática com NADH; (■) – Atividade enzimática com NADPH; (▲) – velocidade específica de consumo de xilose



É possível observar que uma elevação da aeração reflete em elevação da velocidade específica de consumo de xilose, o que influencia na atividade específica de XR. Como mencionado anteriormente, a preferência por cofatores está relacionada à via metabólica ativa. Entretanto, independentemente do cofator preferido, é observada uma estabilidade no perfil de atividade, sendo que, com um aumento da velocidade de consumo, observa-se uma elevação na atividade de XR.

Na Figura 30 é apresentada a atividade enzimática da enzima XDH.

Figura 30: Atividade enzimática da enzima XDH para o cofator NAD^+ .



Para a enzima XDH (coenzima NAD^+), a atividade foi maior nas condições de microaeração do que em anaerobiose (Figura 30) e aerobiose, não havendo diferença significativa para os valores de k_{La} testados nas faixas de microaeração.

Segundo a literatura, NADH não é eficientemente regenerado a NAD^+ em condições de anaerobiose, provocando um desequilíbrio (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; HOU, 2012). No presente trabalho, é observado que, nesta condição, a atividade enzimática da enzima XDH é menor do que a atividade observada em condição de microaeração, em que a regeneração NAD^+ é mais eficiente.

Em condição de aeração, a atividade enzimática observada para a XDH é baixa devido a preferência da enzima XR em usar o cofator NADPH , conforme previamente discutido, produzindo mais NADP^+ em detrimento de NAD^+ .

Hou (2012), em mistura de açúcares e em anaerobiose, obteve uma atividade específica de XDH (usando coenzima NAD^+) de $0,16 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$. Em

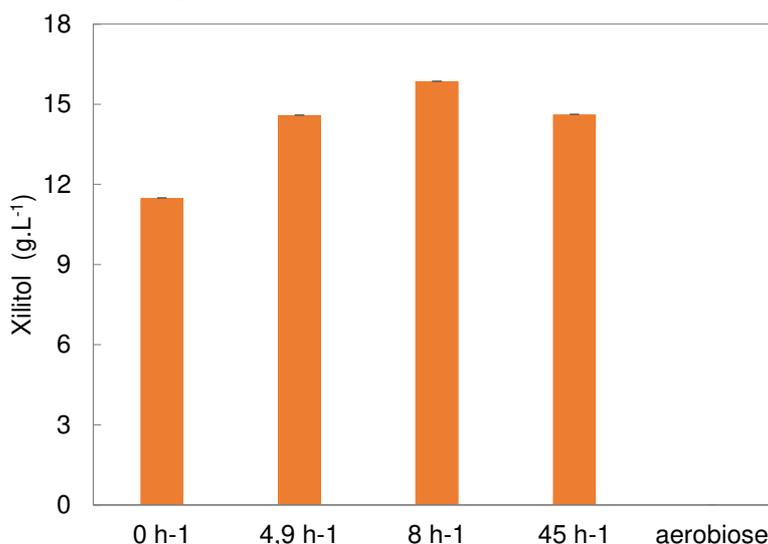
xilose, o valor foi de $0,44 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$. No presente trabalho, esse valor foi de $0,96 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$.

Veras et al. (2017) obtiveram atividades de $0,21$ e $0,30 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$ para as condições de oxigênio limitado e aerobiose para a mesma linhagem de levedura, respectivamente, valores muito inferiores ao obtidos no presente trabalho ($2,41$ (média entre os valores de k_{La}) e $1,29 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$, respectivamente).

Hou (2012) observou a preferência de *S.stipitis* por NADPH em misturas de açúcares, o que refletiu em uma baixa atividade específica de XDH com coenzima NAD^+ ($0,04 \text{ U.mg}_{\text{proteína}}^{-1}$), 4 vezes menor do que o valor obtido para *S. passalidarum* nas mesmas condições.

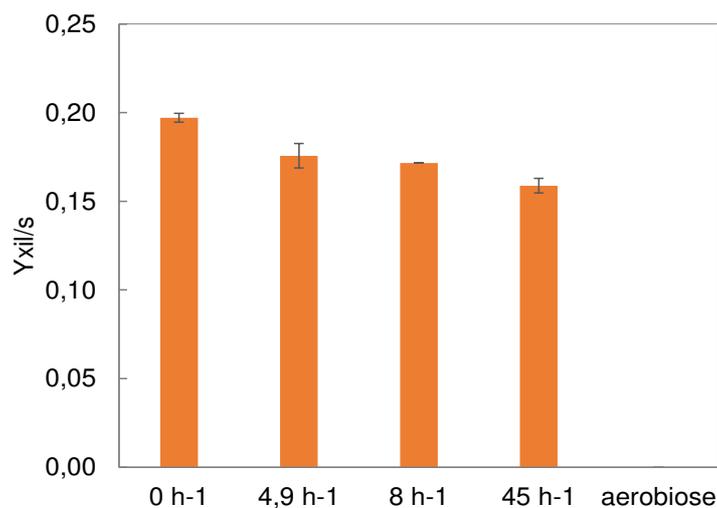
Na Figura 31 são apresentadas as concentrações de xilitol ao final de cada fermentação.

Figura 31: Concentração de xilitol para as fermentações com diferentes disponibilidades de oxigênio, para a levedura *S. passalidarum*.



Conforme previamente mencionado, xilitol é oxidado a D-xilulose pela enzima XDH, dependente da coenzima NAD^+ . Sendo assim, esperava-se que, em experimentos com maior preferência de XR pela coenzima NADH, houvesse maior regeneração de NAD^+ , amenizando o desbalanço de cofatores e, conseqüentemente, a não interrupção da via de metabolização da xilose. Porém, através da Figura 31, é observada uma elevada excreção do subproduto xilitol ao meio, mesmo para o experimento onde há a maior preferência por NADH (k_{La} de 45 h^{-1}). Na Figura 32, é apresentado o fator de conversão de substrato consumido em xilitol.

Figura 32: Fator de conversão de xilose em xilitol para as fermentações com diferentes disponibilidades de oxigênio, para a levedura *S. passalidarum*.



Conforme a disponibilidade de oxigênio foi sendo elevada, o fator de conversão de substrato (considerando somente xilose consumida) em xilitol foi diminuindo. Isso pode ser explicado pela elevação da concentração do cofator NAD⁺ disponível, resultado da maior preferência da enzima XR pela coenzima NADH. Chung e Lee (1986), observaram o mesmo perfil, onde a elevação do k_{La} causou uma queda do rendimento em xilitol para *Pachysolen tannophilus*.

Veras et al. (2017) registraram concentrações muito baixas de xilitol de 0,04 e 0,05 g.L⁻¹ para os experimentos em aerobiose e oxigênio limitado, respectivamente, com baixa massa celular inoculada (menos de 2 g.L⁻¹). Em contrapartida, Su et al. (2015) registraram uma concentração superior de xilitol, sendo que, nesse caso, a concentração celular inoculada foi de, aproximadamente 7 g.L⁻¹, chegando a produzir até 4 g.L⁻¹ de xilitol.

4.7 Potencial de oxirredução (ORP)

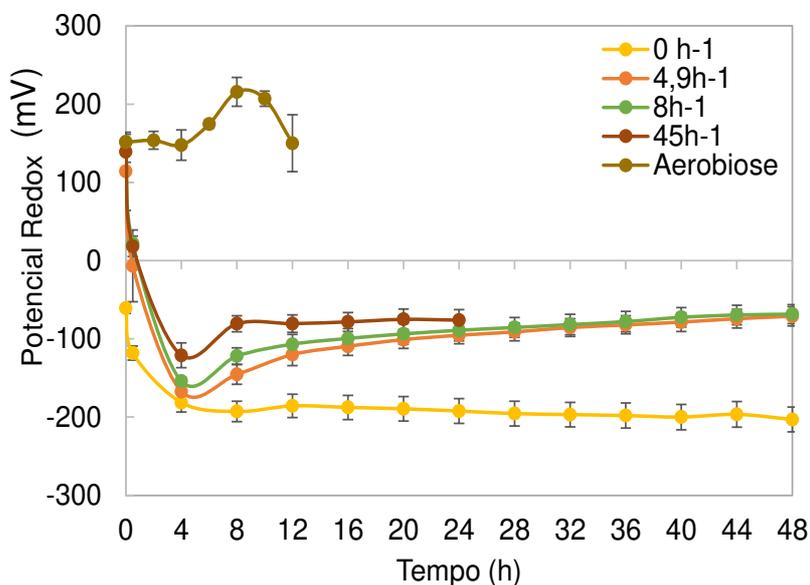
Segundo a literatura, a atividade metabólica de microrganismos está relacionada a diversos fatores, entre eles o potencial redox. O potencial de oxirredução é uma medida que registra a transferência de elétrons em um meio, sendo que a presença e a proporção de nutrientes, como carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, influenciam essa variável. A adição desses agentes redutores ou oxidantes pode garantir o controle deste potencial em uma faixa desejada, principalmente quando os níveis de oxigênio dissolvidos estão muito

baixos, não sendo detectados pela sonda de OD, a qual, nesses casos, registra um valor de OD igual a zero (R & D LABORATORY, 2008).

As fontes de carbono (glicose e xilose) são classificadas como agentes redutores; em contrapartida, o oxigênio é classificado como o principal agente oxidante que pode afetar o potencial redox. Sendo assim, quanto maior a capacidade de redução do meio de cultura menor o valor registado pela sonda, sendo que a introdução de um agente oxidante eleva os níveis do potencial redox (R & D LABORATORY, 2008; LIU et al., 2011).

Dessa forma, foram avaliados os perfis de alteração do ORP (medido por sensor redox [Pt4805-DPAS-SC-K8S Redox - Mettler Toledo] conectada a um transmissor Analítico [M300 – Mettler Toledo]) frente a aplicação de diferentes condições de aeração, além de se estabelecer uma relação com outros parâmetros fermentativos. As médias registradas para cada condição de aeração são apresentadas na Figura 33.

Figura 33: Perfil do potencial redox registrado para as fermentações com diferentes condições de aeração para *S. passalidarum*. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{LA} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{LA} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{LA} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{LA} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose.



Na condição de aerobiose (propagação celular), devido ao caráter oxidante do O_2 , o potencial se mantém positivo durante todo o tempo de experimento. Nas demais condições, mesmo durante a injeção de oxigênio, o valor é negativo, uma vez que todo oxigênio dissolvido no líquido é imediatamente consumido pelo

microrganismo. Nessas condições, vale ressaltar que o valor indicado pela sonda de OD se mantém em zero.

É possível observar duas fases no processo fermentativo por *S. passalidarum* em condição de anaerobiose (k_{La} 0 h^{-1}) e microaeração (k_{La} 4,9; 8 e 45 h^{-1}). Em um primeiro momento (4 h iniciais), é observada uma rápida queda dos valores de potencial redox, atingindo valores entre -181 e -121 mV, resultado da rápida depleção dos compostos oxidantes do meio, como o oxigênio dissolvido, devido à respiração celular observada durante o consumo de glicose, deixando o meio com um caráter menos oxidativo. Para a condição de anaerobiose, cabe ressaltar que o valor de potencial registrado inicialmente é negativo (-60,75 mV), uma vez que foi adicionado nitrogênio no meio durante 30 minutos antes da inoculação para completa expulsão do oxigênio presente no líquido. Para os meios em microaeração, o valor médio registrado no tempo 0 h é de -134 ($\pm 10,6$) mV.

Em um segundo momento, o potencial se estabiliza durante o consumo da xilose, o que pode ser resultado da queda das velocidades específicas de respiração e da reoxidação das coenzimas. Ainda pode ser observado que, com a elevação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, esta faixa estável de potencial redox está situada em valores mais elevados, confirmando que o oxigênio dissolvido é um fator que influencia no potencial redox.

Lin et al. (2010) observaram um perfil similar ao registrado nas primeiras 8 h deste trabalho, onde, durante o consumo da glicose por *S. cerevisiae*, foi registrada uma queda no nível de ORP, resultado do consumo do O_2 dissolvido no meio para geração de ATP através da respiração celular, o que acarretou em um leve crescimento celular. O mesmo perfil foi observado por Thani et al. (2016) e por outro trabalho em submissão do grupo de pesquisa onde foi avaliado o potencial redox durante fermentações com *S. stipitis*. À medida que os açúcares redutores eram consumidos, atrelados à liberação de metabólitos oxidativos ao meio, observou-se um aumento do potencial redox, favorecendo o poder de oxidação do meio.

A variação de ORP pode ser explicada por diferentes razões, dentre as quais o estado metabólico das células, sendo um indicativo da atividade oxiredutora do microrganismo (LIU et al. 2017). Segundo Liu et al. (2013), reações de oxirredução ocorrem simultaneamente dentro das células, não importando se as

culturas são aeróbias, anaeróbias ou microaeróbias, sendo que o ORP detectado no meio (extracelular) é um indicativo do metabolismo intracelular. Assim como o O_2 é um importante acceptor de elétrons, o NADH é um relevante doador de elétrons, e ambos influenciam nas mudanças de ORP. Segundo esses autores, os pares redox NADH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺ desempenham papel importante no ORP intracelular, sendo a razão NADH/NAD⁺ o principal determinante. As formas reduzidas (NADH e NADPH) são geradas a partir das coenzimas oxidadas (NAD⁺ e NADP⁺), principalmente durante o catabolismo dos substratos redutores (glicose e xilose), para fornecer energia redutora para as reações redox. O fluxo contrário é regenerado para favorecer o balanço redox.

Segundo Finkler (2002), o ORP parece estar estritamente relacionado ao crescimento celular e, como mencionado anteriormente (item 4.6), a disponibilidade de O_2 afeta na divisão do fluxo de carbono, o que afeta a preferência da enzima XR por coenzimas (Figura 28). Ou seja, saindo da condição de microaeração para aerobiose, é observado o desvio metabólico para via de crescimento celular e, assim, uma maior preferência por NADPH em detrimento a NADH, uma vez que somente a via oxidativa está ativa. Sendo assim, a regeneração de NAD⁺ é comprometida, lembrando que a enzima XDH tem preferência por NAD⁺. O excesso de NADP⁺ e falta de NAD⁺ causa um desequilíbrio redox.

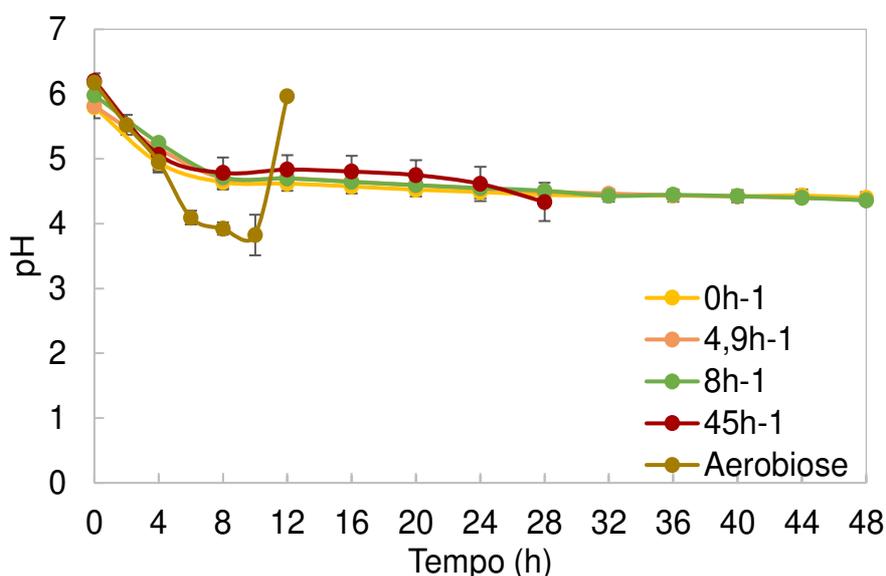
Dentre as condições de microaeração, é observada uma elevação da atividade enzimática e da preferência por NADH com o aumento da disponibilidade de O_2 , resultado do crescente desvio de rota para o crescimento celular. Segundo Bruinenberg et al. (1984) e Correia et al. (2018), enzimas XR ligadas a NADH aliviam o desbalanço redox da via XR-XDH. Nestas condições, a ampliação da preferência pela coenzima NADH ocorre simultaneamente ao aumento da faixa de estabilização do potencial redox após as primeiras 4 h de processo. Nesta mesma fase, também é observada a semelhança de perfis entre os valores de k_{La} 4,9 e 8 h⁻¹, ocorrendo um acréscimo de 90 mV nesse intervalo. Esta mesma semelhança também é observada na atividade enzimática da XR e na preferência por coenzima. A elevação no ORP pode ser resultado de uma baixa, mas importante, dissolução de O_2 no meio fermentativo (em níveis tão baixos que não são captáveis pelo sensor de OD), uma vez que somente a via fermentativa está ativa e a respiração é reduzida durante o consumo de xilose.

Esse comportamento não foi observado no k_{La} de 45 h^{-1} , uma vez que, nesta condição, ambas as vias estavam ativas, sendo que a via oxidativa requer mais oxigênio, elevando a respiração celular e consumindo todo oxigênio dissolvido, mantendo, assim, o caráter redutor do meio.

No trabalho de Lin et al. (2010), a elevação de potencial redox é associada à elevação do poder de oxidação e ao efeito da toxicidade sobre a *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Red) causada pelo aumento da excreção de etanol ao meio, o que pode afetar o metabolismo da célula e causar a morte celular. Porém, no presente trabalho não foi observada perda de viabilidade e, caso a concentração de etanol causasse danos à célula, esse mesmo perfil de elevação de ORP seria observado para o k_{La} 45 h^{-1} .

Como já mencionado, o comportamento do potencial redox também pode ser associado à variação de pH. Na Figura 34 é apresentado o perfil da variação de pH para os experimentos com diferentes condições de aeração.

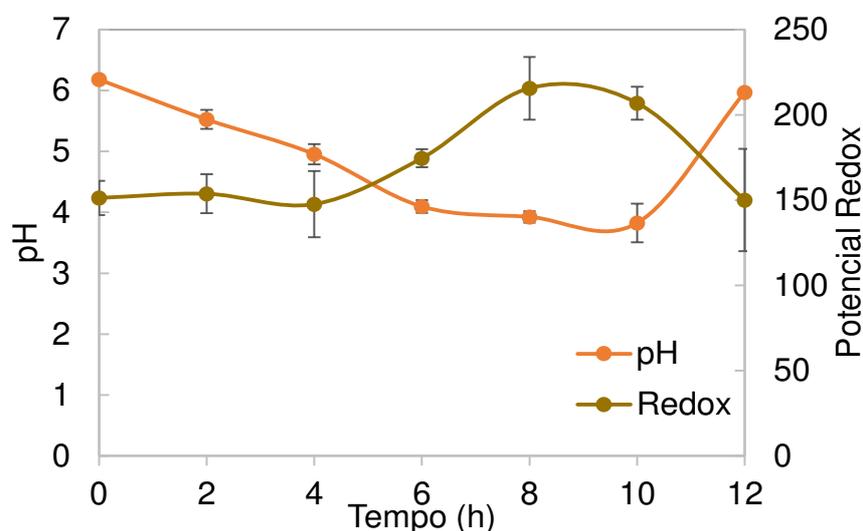
Figura 34: Perfil de valores de pH registrado para as fermentações com diferentes condições de aeração para *S. passalidarum*. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose.



Um perfil similar ao registrado para o potencial redox é observado para o pH, onde, em um primeiro momento (até 8 h), para as fermentações em anaerobiose e microaeração, ocorre uma queda nos valores, seguido por estabilização. O pH se manteve, na maior parte do tempo, próximo a 5,00. Segundo Pelczar et al. (1997), a faixa de pH ótimo para favorecer o processo de fermentação com leveduras é de 5 a 6. Sendo assim, os experimentos sob diferentes condições

de aeração mantiveram uma boa faixa para a fermentação. Os perfis de pH e ORP para a condição de aerobiose são apresentados na Figura 35. É importante ressaltar que não houve correção automática do pH durante os experimentos.

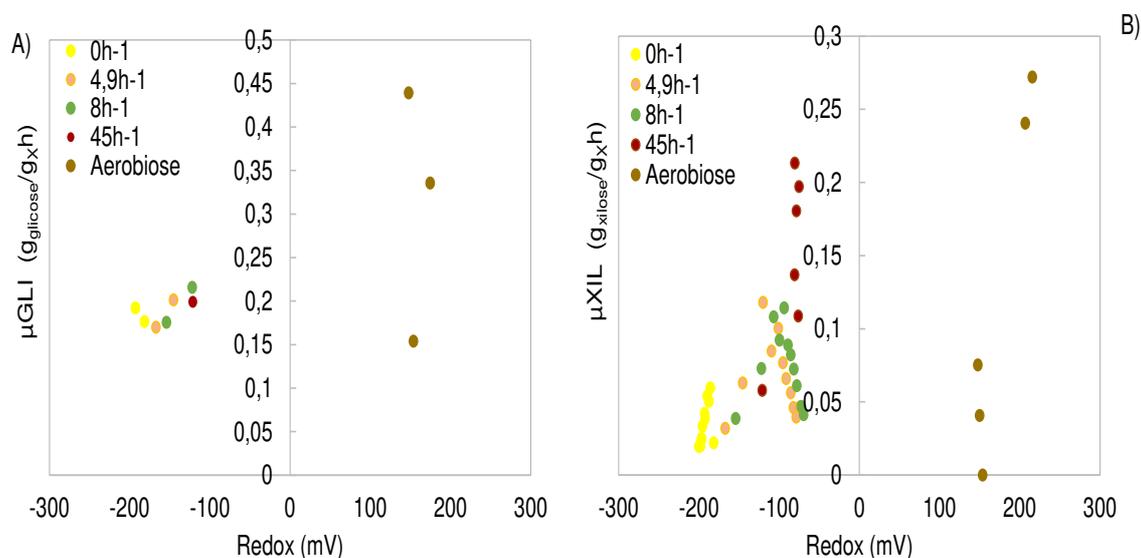
Figura 35: Perfil de pH e potencial de oxirredução para condição de aerobiose com *S. passalidarum*. Símbolos referem-se a: (●) -pH; (●) Potencial redox.



Nessa condição (aerobiose), é possível observar que o pH também influenciou na variação do redox, ou seja, quando o pH se elevou (entre 4 e 8 h), os valores de potencial redox caíram. Já quando o pH caiu (ao final do experimento e aumento de íons H^+), foi registrada uma elevação de potencial redox. Isto está de acordo com o que está descrito na literatura, sendo que alguns autores observaram que diminuição de pH eleva o poder de oxirredução do meio (a variação de uma unidade de pH pode acarretar em uma variação de 57 mV) (NEEDHAM e NEEDHAM, 1926; CONROY et al., 1978). Neste experimento, os níveis de ORP se mantiveram positivos, resultado do forte poder oxidativo provocado pela elevada injeção de oxigênio no meio. Nas demais condições de aeração (anaerobiose e microaeração), o pH não afetou o ORP devido ao caráter redutor do meio, o qual, provavelmente, é mais forte do que a influência do pH. Como já mencionado, não somente o pH afeta o potencial redox, mas também a presença de agentes oxidantes e redutores e o metabolismo celular.

As Figuras 36 e 37 mostram as relações entre as velocidades específicas de consumo dos açúcares e formação de produto e subproduto.

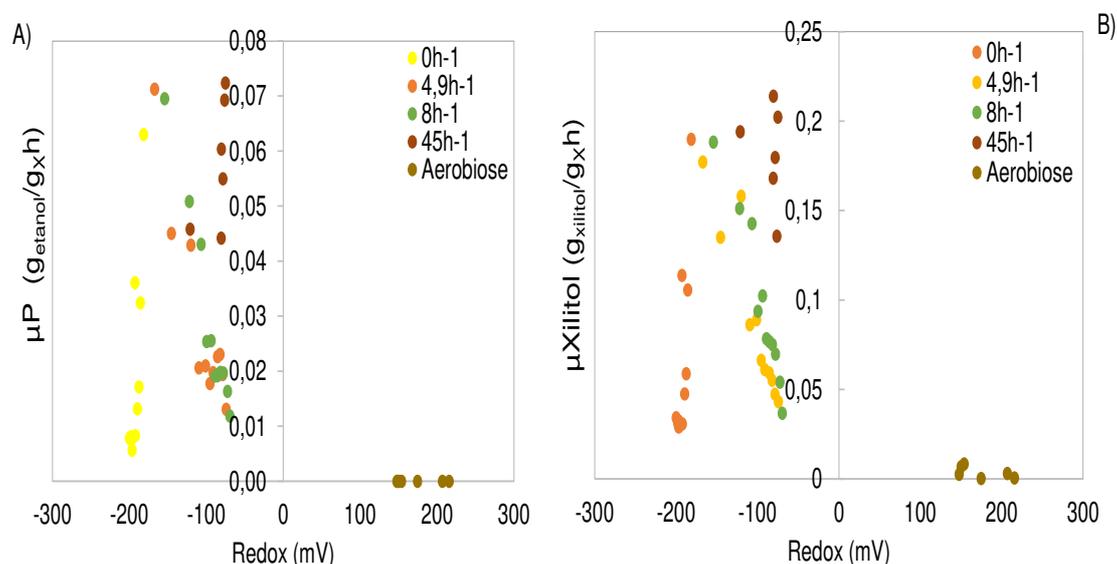
Figura 36: Relação entre velocidade específica de consumo de açúcares *versus* potencial redox. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose.



Segundo a Figura 36, é possível observar que as maiores velocidades específicas de consumo de açúcares são registradas durante o potencial redox positivo, sendo que esses valores se referem à condição de aerobiose (propagação celular).

Para as fermentações em anaerobiose e microaeração, a velocidade de consumo de glicose (Figura 36 A) não sofreu variação significativa com a oscilação de ORP. Já a velocidade de consumo de xilose (Figura 36 B) teve um maior valor em faixas de ORP ao redor de -100 mV.

Figura 37: Relação entre velocidade específica de formação de produto (etanol) e subproduto (xilitol) *versus* potencial redox. Símbolos referem-se a: (●) – $k_{La} = 0 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 4,9 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$; (●) – $k_{La} = 45 \text{ h}^{-1}$; (●) Aerobiose.



Diferente do que foi observado para o consumo de açúcares (Figura 36), onde as maiores velocidades foram registradas em potencial positivo, as maiores velocidades específicas de formação de etanol e xilitol (μ_P e μ_{xilitol}) foram registradas em potencial redox negativo (entre -75 e -181 mV para etanol), sendo que as maiores velocidades foram observadas para o maior k_{La} (45 h^{-1}) (Figura 37).

Como mencionado, o potencial positivo registrado nesses gráficos refere-se à condição de aerobiose. Devido à baixa ou quase inexistente produção de produto e subproduto, as velocidades específicas de formação se mantiveram em valores próximos a zero.

Sendo assim, valores positivos de ORP aceleram o consumo de açúcares, porém afetam a produção de etanol. Em valores de ORP em torno de -100 mV, foram observadas as maiores velocidades de consumo de xilose, assim como as de formação de etanol. Lin et al. (2010) registraram que um ORP de -150 mV promoveu uma melhora na fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, acarretando em melhor produtividade e rendimentos.

Yu et al. (2007) mantiveram níveis de potencial redox constantes (-50, -100, -150 e -230 mV) e observaram uma variação nos parâmetros de fermentação, como crescimento celular e produção de etanol. Assim como em outros trabalhos (Lin et al., 2010), observaram que o melhor nível de ORP para favorecer a formação de etanol era de -150 mV. Porém, esse controle é realizado através da variação da agitação e taxa de aeração, ou seja, durante esses experimentos, na tentativa de se fixar os valores de ORP, estava ocorrendo uma variação da disponibilidade de oxigênio no processo. Chung e Lee (1986) realizaram experimentos para verificar a real influência do potencial redox sobre fermentações de xilose fixando níveis de ORP a partir de injeção de ar e concluíram que a formação de etanol está diretamente relacionada à disponibilidade de oxigênio e não ao ORP, sendo o potencial registrado resposta a variação de OD uma vez que estas propriedades estão associados. Mas esses autores destacam a eficiência de sondas redox no monitoramento de baixos níveis de OD (não detectáveis por sonda de OD). No presente trabalho, foi observado que as condições de aeração afetaram o potencial redox, assim como os demais parâmetros relacionados à aeração, uma vez que esse elemento auxilia na regeneração das coenzimas e minimiza o desequilíbrio redox.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio no desempenho fermentativo da levedura *S. passalidarum*. Para isso, foram realizadas fermentações em diferentes condições de aeração em elevada concentração celular (17 g.L^{-1}). As condições empregadas foram: completa anaerobiose, três condições de microaeração (k_{La} 4,9; 8; 45 h^{-1}) e uma condição de aerobiose (propagação celular).

Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a disponibilidade de oxigênio influencia de forma significativa, além de parâmetros fermentativos, outras propriedades relacionados ao metabolismo intracelular do microrganismo, como atividade enzimática e o potencial de oxirredução.

Neste sentido, pudemos constatar que condições de microaeração se mostraram mais interessantes do que a condição de anaerobiose, uma vez que as velocidades de consumo e de formação são favorecidas, e, como consequência, o tempo necessário para a completa exaustão das fontes de carbono é reduzido. Dentre as condições de microaeração testadas, observou-se uma elevação de rendimento e produtividade volumétrica (Q_P) frente a elevação de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). Para o maior k_{La} empregado (45 h^{-1}), foi registrado um valor de Q_P duas vezes maior do que o registrado para os coeficientes 4,9 e 8 h^{-1} , uma vez que, nesta condição de aeração, metade do tempo de fermentação foi suficiente para obtenção de um título em etanol similar às outras duas condições. Essa redução de tempo é vantajosa para a usina, uma vez que podem ser realizadas duas bateladas de fermentação no mesmo período de uma quando empregada uma disponibilidade de oxigênio superior, obtendo o dobro de produção de etanol. Entretanto, é necessário realizar uma análise econômica para avaliar a viabilidade de operar o processo nesta condição, relativizando a produção de etanol *versus* o gasto com a elevada injeção de ar.

Para a condição de aerobiose (propagação celular), foi possível determinar parâmetros respiratórios desta levedura, dados ainda não reportados em literatura, em que a velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}) estimada foi de $0,44 \text{ h}^{-1}$, o fator de conversão de oxigênio em célula (Y_{x/O_2}) foi de $6,9213 \text{ g}_x.\text{g}_{O_2}^{-1}$ e a velocidade específica de consumo de O_2 para manter as

células viáveis (m_{O_2}) foi de 11,134 $\text{mg}_{O_2} \cdot \text{g}_x^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nessa condição, foi observado o completo desvio metabólico para crescimento celular, atingindo o objetivo desse experimento, confirmando que o protocolo definido para esta etapa está bem estabelecido e pode ser aplicado para a realização de fermentações com elevada densidade celular, como já amplamente utilizado nas usinas 1G.

Para as condições de anaerobiose e microaeração, foi observada uma alta produção de xilitol. Não foi observado crescimento celular significativo, o que inviabilizou a determinação de parâmetros respiratórios para essas condições de aeração. Entretanto, com o monitoramento da composição dos gases de exaustão, foi possível monitorar a produção de CO_2 durante as fermentações e relacioná-la com a produção de etanol. Principalmente para as condições de anaerobiose e para os k_L s mais baixos (4,9 e 8 h^{-1}), foi possível observar uma relação linear entre velocidade de formação de CO_2 e produtividade volumétrica de etanol. Nesta etapa pode-se novamente verificar que a fermentação com k_{LA} 45 h^{-1} apresentou os melhores resultados de produção de etanol e manutenção de células.

Como mencionado, a disponibilidade de O_2 afetou também a atividade enzimática na rota de assimilação da xilose, bem como a preferência da enzima XR entre as coenzimas NADH e NADPH. A elevação de k_{LA} ocasionou uma elevação da atividade enzimática, o que implica em uma velocidade de consumo de xilose superior. Sendo assim, a atividade enzimática registrada em aerobiose foi superior à observada para as fermentações com oxigênio limitante. Além disso, a preferência por certa coenzima também é alterada. Pudemos constatar que, quando somente a via fermentativa estava ativa (anaerobiose e k_{LA} de 4,9 e 8 h^{-1}), a enzima XR não apresentou preferência significativa por determinada coenzima. Já para o coeficiente mais elevado (45 h^{-1}), foi observado um leve desvio metabólico para a via oxidativa, refletindo em um crescimento celular. Nesta condição, houve uma preferência na razão de 1,41 (NADH/NADPH). Para a condição de propagação celular, onde somente a via oxidativa estava ativa, a razão foi de 0,19 (NADH/NADPH), ou seja, a preferência foi significativamente maior para NADPH.

Por último, foi avaliada a influência da aeração sob o potencial de oxirredução (ORP). Foi observado que as velocidades específicas de consumo de substrato foram favorecidas em faixas de potencial redox positivos. Porém

isso não refletiu em uma maior formação de etanol, a qual foi favorecida em valores de ORP próximos a -100 mv. Sendo assim, para otimizar a fermentação, seria interessante manter o ORP nesta faixa, fator que é influenciado pelo poder oxi-redutor do meio e pela concentração de oxigênio dissolvido.

Sendo assim, conclui-se que o trabalho desenvolvido atingiu os objetivos inicialmente propostos.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Com base nos resultados apresentados, é possível sugerir alguns experimentos futuros, visando a complementar os dados obtidos pelo presente trabalho, tais como:

- Monitoramento da formação acumulativa de CO₂ produzido durante toda a fermentação e verificação da estequiometria para formação de etanol;
- Utilização de uma metodologia mais eficiente na quantificação de O₂ total consumido para determinação de propriedades relacionados a oxigênio, como rendimento de O₂ em células (Y_{x/o_2});
- Determinação de valores de k_{LA} correspondentes à condição de agitação e aeração impostas para manutenção dos níveis de oxigênio em OD 50%, no caso do experimento em completa aerobiose (propagação celular), considerando o atraso do sensor de oxigênio dissolvido;
- Aumento da escala de experimento para comprovar a reprodutibilidade destes resultados, de modo a avaliar a possibilidade de aplicação em escala industrial;
- Análise técnico-econômica para operação com uma condição de microaeração controlada, destacando-se o k_{LA} de 45 h⁻¹, considerando a redução do tempo fermentativo observado para este caso.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.*, v. 30, p. 1515-1524, 2008.
- AGBOGBO, F.K., COWARD-KELLY, G., TORRY-SMITH, M., WENGER K.S., JEFFRIES, T. W. The Effect of Initial Cell Concentration on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 136-140, p. 653-662, 2007.
- ALMEIDA, R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 349, n. 4, p. 340–349, 2007.
- ANDERSEN, L.B.; EVANS, J. H.; SINGER, C. A. Aparatus and process for fermentation of biomass hydrolysate. Patente. US2011/0059497A1, 2011.
- ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome res.*, v. 19, n. 12, p. 2258-2270, 2009.
- BARNETT, J. A.; ENTIAN, K-D. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism¹. *Yeast*, v. 22, p. 835-894, 2005.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, v. 8, n. 7, p. 1155–63, 2008.
- BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.*, v. 133, p. 51-58, 2013.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL, CTNBio. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 2, DE 27 DE NOVEMBRO DE 2006. Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. Disponível em: <https://agrobiobrasil.org.br/wp-content/uploads/2013/11/RESOLU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-2-DE-27-DE-NOVEMBRO-DE-2006.pdf>. Acesso em 19 de agosto de 2018.

- BRASIL, CTNBio. Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018. Estabelece os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoria de Precisão. Disponível em: http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio/-/asset_publisher/58KNi0CuF68J/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018. Acesso em 19 de agosto de 2018.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Agroenergia: 2006 - 2011. Brasília, 2006.
- BRASIL, Brasil é líder mundial no setor de agroenergia. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/editoria/infraestrutura/2011/12/brasil-e-lider-mundial-no-setor-de-agroenergia>. Acesso em 30 de julho de 2018, 2011.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 4862-4874, 2010.
- BRUINENBERG, P. M., DE BOT, P. H., VAN DIJKEN, J. P., AND SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.19, p.256–260, 1984.
- CADETE, R. M.; DE LAS HERAS, A.M.; SANDSTROM, A.G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; ROSA, C.A.; FONSECA, C Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1. 2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.*, v.9, p.1–14, 2016.
- CADETE. R.M.; ROSA, C.A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast* v. 35, p. 191-199, 2018.
- CAMPOS, V. J. Caracterização fisiológica de leveduras fermentadoras de xilose. (Dissertação) - (mestrado em microbiologia Agrícola) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- CGEE - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Geração de energia elétrica a partir de biomassa no Brasil: situação atual, oportunidade e desenvolvimento, 2001. IOP Publishing CGEE. http://www.cgee.org.br/arquivos/estudo003_02.pdf. Acesso em 10 jun 2017.
- CHATURVEDI V, VERMA P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *Biotech.*, v.3, p. 415–431, 2013.
- CHUNG, I. S.; LEE, Y.Y. Effect of oxygen and redox potential on D-xylose fermentation by non-growing cells of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.*, v.8, p.503-507, 1986.

- CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Relatório de inteligência: do bagaço ao posto, 2013. Disponível em <http://www.icna.org.br/sites/default/files/relatorio/RELAT%C3%93RIO%20O%20AGRONEG%C3%93CIO%20-%20janeiro%20de%202013.pdf>. Acesso em: 12 Jan 2018.
- CONROY, C.W.; TYMA, P.; DAUM, P.H.; ERMAN, J.E. Oxidation-reduction potential measurements of cytochrome c peroxidase and pH dependent spectral transitions in the ferrous enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 537, p. 62-69, 1978.
- CORREIA, K.; KHUSNUTDINOVA, A.; LI, P. Y.; JOO, J. C.; BROWN, G.; YAKUNIN, A.F.; MAHADEVAN, R. Flux balance analysis predicts NADP phosphatase and NADH kinase are critical to balancing redox during xylose fermentation in *Scheffersomyces stipitis*. *bioRxiv* 390401; doi: <https://doi.org/10.1101/390401>, 2018.
- CRABTREE, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical J.* v. 23, p. 536-545, 1929.
- DE SALES, B.B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D.L.; KNYCHALA, M.M.; MATSUSHIKA, A.; Bon, E.P.S.; Stambuk, B.U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v. 37, p.1973-1982, 2015
- DIAS, M.O.S.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSEL. C.E.V.; MACIEL M.R.W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. *Chem. Eng. Res. Des.*, v. 87, p.1206-1216, 2009.
- DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-Xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, v.16, p. 944-956, 1994.
- DU PREEZ, J.C., VAN DRIESSEL, B.; Prior, B.A. The relation between Redox potential and D-xilose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia sitipitis*. *Biotechnol. Lett.* v.10, n.12, p.901-906, 1988.
- DUSSÁN, K.J.; SILVA, D.D.V.; PEREZ, V.H.; da SILVA, S.S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew. energy.*, v. 87, p. 703-710, 2016.
- FARIAS, D.; ANDRADE, R.R.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from Xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 172, p. 361-379, 2014.
- FARIAS, D. Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses em processo extrativo à vácuo. Tese (doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2012.

- FARWICK, A.; BRUDER, S.; SCHADEWEG, V.; OREB, M.; BOLES, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 111, n. 14, p. 2159-5164, 2014
- FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FINKLER, L. Utilização do potencial de óxido-redução para o monitoramento de culturas de *Ralstonia eutropha* visando a produção de polihidroxibutirato. Dissertação (metrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2012.
- FIORAVANTE, M.G.A. As artesãs do etanol. *Pesquisa Fapesp*, São Paulo, n. 165, p. 45-48, 2009. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2009/11/Artesas.pdf>. Acesso em: 30 de agosto de 2018.
- FUJII, T.; YU, G.; MATSUSHIKA, A.; KURITA, A.; YANO, S.; MURAKAMI, K.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing beta-xylosidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 75, n. 6, p. 1140-1146, 2011.
- FUJITA, T. P. L. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. 60 f. Tese (Mestrado em microbiologia agrária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 153-176, 2009.
- GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T. do; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-deaçúcar. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.
- GUPTA, A.; VERMA, J.P.; Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew Sust Energ Rev.*, v.41, p. 550–567, 2015.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 74, n. 5, p. 937–953, 2007.
- HECTOR, R.E., DIEN, B.S., COTTA, M.A., MERTENS, J.A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol. Biofuels* v. 6, p.1–12, 2013.
- HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

- HOU, X. Development of industrial yeast for second generation bioethanol production. National Laboratory for Sustainable Energy, Technical University of Denmark, Roskilde. Tese (Doutorado) 155p, 2011.
- HSU, T. A., LADISCH, M.R., TSAO, G.T. Alcohol from cellulose. Chem. Technol., v. 10, n. 5, p. 315-319, 1980.
- HUMPHREY, A.E.; TAGUCHI, H. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems, J. Ferment. Technol., v. 44, p. 881-889, 1966.
- IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- JIN, Y.S.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. Appl. Environ. Microbiol., v. 70, n. 11, p. 6816–6825, 2004.
- KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. A convenient method for the determination of oxygen solubility in different solutions. Biotechnol. Bioeng., v. 23, p. 1969-1977, 1986.
- KJAERGAARD, L. The redox potential, its use and control in biotechnology. In Ghose TK, Fiechter A, Blakebrough N (ed.) Advances in biochemical engineering, Springer-Verlag, Berlin, p. 131-150, 1977.
- KIM, S.R.; LEE, K.S.; KONG, I.I.; LESMANA, A.; LEE, W.H.; SEO, J.H.; KWEON, D.H.; JIN, Y.S. Construction of an efficient xylose-fermenting diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain through mating of two engineered haploid strains capable of xylose assimilation, J. Biotechnol., v. 164, n. 1, p. 105-111, 2013.
- KOLLING, D. Ampliação de escala do processo de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungo filamentoso em fermentação submersa. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas. Dissertação (mestrado) 99p.,2017.
- KUYPER, M.; TOIRKENS, M.J.; DIDERICH, J.A.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. FEMS Yeast Research, v. 5, n. 10, p. 925-934, 2005.
- LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 36, p. 158-162, 1991.
- LI H, Wu M, XU L, HOU J, GUO T, BAO X, SHEN Y. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. Microb. Biotechnol., v. 8:266–74, 2015.

- LIN, Y.H.; Chien, W.S.; Duan, K.J. Correlations between reduction-oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation. *Process. Biochem.* v. 45, p. 765-770, 2010.
- LIU, C.G.; LIN, Y.H.; BAI, F.W. Ageing vessel configuration for continuous redox potential-controlled very-high-gravity fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 111, p. 61-66, 2011.
- LIU, C.G.; LIN, Y.H.; BAI, F.W. Global gene expression analysis of *Saccharomyces cerevisiae* grown under redox potential-controlled very-high-gravity conditions. *Biotechnol. J.*, v. 8, p. 332-7340, 2013.
- LIU, C. G.; QIN, J. C.; LIN, Y. H. Fermentation and Redox Potential, *Fermentation Processes*, Dr. Angela Jozala, InTech. 2017. DOI: 10.5772/64640. Available from: <https://www.intechopen.com/books/fermentation-processes/fermentation-and-redox-potential>
- LIU, C.G.; XUE, C.; LIN, Y.H.; BAI, F.W. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnol. Adv.*, v. 31, p. 257-265, 2013.
- LONG, T.M.; SU, Y.K.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.
- MA, M.; LIU, Z.L.; MOON, J. Genetic engineering of inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* for improved xylose utilization in ethanol production. *Bioenergy Res.*, v. 5, n. 2, p. 459-469, 2012.
- MALUF, G. A competição entre o etanol de segunda geração e a produção de eletricidade pelo uso do bagaço. São Paulo, Dissertação (Mestrado em Economia) – Fundação Getúlio Vargas, 2014.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Agroenergia: 2006 - 2011. Brasília, 2006.
- MCMILLAN J.D. Xylose Fermentation to ethanol: A Review. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, 1993.
- MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Performance of *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wook hydrolyzates. *Enzyme and microbial technology*, 2004.
- MORALES, P.; GENTINA, J.C.; AROCA, G.; MUSSATTO, S.I. Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. *Ind. Crops. Prod.*, v. 106, p. 5 – 11, 2017
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização - preparação - purificação. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher. 1972. 627p.

- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I. C., Efeito do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na produção de xilitil em biorreator de bancada. *Revsita UniVAp*, v. 10, n. 18, p. 83 – 87, 2003.
- NAKANISHI, S.C.; SOARES, L.B.; BIAZI, L.E.; NASCIMENTO, V.M.; IENCZAK, J.L.; ROCHA, G.J.M. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 9999, p. 1-11, 2017.
- NEEDHAM, J.; NEEDHAM, D.M. The oxidation-reduction potential of protoplasm: A review. *Protoplasma*, v.1, p.255-294, 1926
- NGUYEN, N.H.; SH, S.O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum gen. sp nov* and *Candida jeffriesii sp nov*. *Mycol. Res.*, v. 110, p. 1232-1241, 2006.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipites*. *J. Biotechnol.*, v. 87, p. 17 – 27, 2001.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.*, v. 74, p. 17-24, 2000.
- PASTEUR, L. Influence de l'oxygène sur le développement de la levûre et la fermentation alcoolique. *Bulletin de la Société de Paris. Résumé de Séance du 28 juin 1861*; p. 79-80, 1861.
- PAULY, M.; GILLE, S.; LIU, L.; MANSOORI, N.; DE SOUZA, A.; SCHULTINL, A.; XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. *Planta* v. 238, p. 627–642, 2013.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia. Conceitos e aplicações*. Editora Pearson, São Paulo, 1997.
- PINTO, Fábio Henrique Paschoal Bianchi. *Etanol celulósico: Um Estudo de Viabilidade Econômico-Financeira*. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) – Escola de Economia de São Paulo-FGC-EESP, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA e Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” – ESALQ/USP, São Paulo, 2010.
- PIRT, S.J. *Microbe and cell cultivation*. Londres. Willian Clowes & Sons, p. 217, 1975.
- R & D Laboratory, New Brunswick Scientific. Using redox measurements to control an anaerobic yeast fermentation. *BioTechniques*, v. 45, p. 670-672, 2008.
- RABELO, S.C., *Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração*, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (tese de doutorado), 2010.

- RAMIREZ, R. Q. Hidrólise da biomassa lignocelulósica. In: CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar. P&D para produtividade e sustentabilidade. UNICAMP: Blucker, 2010.
- ROSSELL, C.E.V.; ZAINAGHI, G. Produção de Etanol Combustível pela Hidrólise Enzimática. In: ROSSAFA, Luiz Antonio (Org.) Álcool combustível – Série Indústria em Perspectiva. Brasília: Instituto Euvaldo Lodi, Cap. 9, p. 123 – 138, 2008.
- ROSSI, J. M. Tecnologia para produção de inoculantes de fungo Ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *Airlift*. Florianópolis: Departamento de Engenharia química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006, 188 p. Tese (Doutorado).
- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, v.99, p. 5270-5295, 2008.
- SANCHEZ, R.G.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; NOGUE, V.S.; ALMEIRA, J.R.M.; LARSSON, C.U.; BENGTSSON, O.; BETTIGA, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels.*, v. 3, p. 11, 2010.
- SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.
- SANTOS, S.C.; DIONÍSIO, S.R.; DE ANDRADE, A.L.D.; ROQUE, L.R.; DA COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Fermentation of xylose and glucose mixture in intensified reactors by *Scheffersomyces stipitis* to produce ethanol. *Int. J. Biol., Veterinary Agricultural Engineering*, v. 9, n. 5, p. 482-487, 2015.
- SANTOS, S.C.; SOUSA, A.S.; DIONÍSIO, S.R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F.M.; ROSSELL, C.E.V.; DA COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. *Bioresour. Technol.*, v. 219, p. 319-329, 2016.
- SCHMIDELL, W.; Lima, U.A., Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo, 2001. v. 2, p. 123-178.
- SCISTYLE. Lignocellulose. Disponível em: <<http://portfolio.scistyle.com/Lignocellulose>>. Acesso em: 28 ago. 2018.
- SILVA, J.P.A. Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz. 144 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.
- SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renew. Energy*, v. 37, p. 259-265, 2012.

- SILVA, D.D.V.; DUSSÁN, K.J.; HERNÁNDEZ, V.; da SILVA, S.S.; CARDONA, C.A.; FELIPE, M.G.A.; Effect of volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) on ethanol production performance by *Scheffersomyces stipitis* on hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochem. Eng. J.*, v.112, p. 249-257, 2016
- SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, n. 11, p. 3389–3394, 1990.
- SLININGER, P.J.; SHEA-ANDERSH, M.A.; THOMPSON, S.R.; DIEN, B.S.; KURTZMAN, C.P.; BALAN, V.; SOUSA, L.C.; UPPUGUNDLA, N.; DALE, B.E.; COTTA, M.A. Evolved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid and base pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. *Biotechnol. Biofuels.*, v. 8, p. 1-27, 2015.
- SOARES, L. B. O efeito de inibidores do hidrolisado hemicelulósico e seu impacto no desempenho da fermentação etanólica de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (Dissertação de mestrado), 2018.
- SREENATH, H. K.; CHAPMAN, T. W.; JEFFRIES, T. W. Ethanol production from D-xylose in batch fermentations with *Candida shehatae*: Process variables. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 24, n. 4, p. 294–299, 1986.
- STAMBUK, B. U., ELEUTHERIO, E. C., FLOREZ-PRADO, M. L., SOUTO-MAIOR, A., & BON, E. P. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *J. Sci. Ind. Res.*, 67, 918-926, 2008.
- STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nat. Rev. Genet.*, Londres, v. 9. p. 433 – 443, 2008.
- SU Y.K.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 112, n. 3, p. 457-469, 2015.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.*, v. 83, p. 1-11, 2002.
- TANIGUCHI, M.; TOHMA, T.; ITAYA, T.; FUJII, M. Ethanol Production from a Mixture of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* and a Respiratory-Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Bioeng.*, v. 83, n. 4, p. 364-370, 1997.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Process*. Chapter 12 - Fermentation Inhibitors in Ethanol Process and Different Strategies to Reduce Their Effects, p. 287-311, 2011.

- TAI, M.; STEPHANOPOULOS, G.N. Metabolic engineering: enabling technology for biofuels production. *WIREs Energy Environ.*, v.1, p. 165-172; 2012.
- THANI, A.; LIN, Y-H; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Variation of fermentation redox potential during cell-recycling continuous ethanol operation. *J. Biotechnol.*, v. 239, p. 68-75, 2016.
- TRAMONTINA, R.; SOUSA, A.; COUTOUNÉ, N.; SOARES, L. B.; SANTOS, S. C.; RULLER, R.; HOFFMANN, Z. B., SQUINA, F. M.; IENCZAK, J.L. Deciphering physiological and novel processual parameters in *Spathaspora passalidarum* using hexose and pentose mixtures during batch fermentation. Trabalho em submissão.
- UNCTAD - United Nations Conference on Trade and Development. Second generation biofuel markets: state of play, trade and developing country perspectives. United Nations Publication; 2016.
- UNICA: Brazilian Union of sugarcane industry. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 15 de maio de 2018.
- VASCONCELOS, S.M.; SANTOS, A.M.P.; ROCHA, G J.M.; SOUTO-MAIOR, A.M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based. *Bioresour. Technol.*, v.135, p. 46-52, 2013.
- VENDRUSCO, F. Produção de pigmento vermelho a partir do pigmento laranja produzido por *Manascus ruber CCT 3802*. Florianópolis, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- VERAS, H.C.T.; PARACHIN, N.S.; ALMEIDA, J.R.M. Comparative assessment of fermentative capacity of diferente xylose-consuming yeasts. *Microb. Cell Factor.*, v.16, n. 01, 2017.
- WOHLBACH, D.J.; KUO, A.; SATO, T.K.; POTTS, K.M.; SALAMOV, A.A.; LABUTTI, K.M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGINILAN, J.L.; LINDQUIST, E.A. AND OTHERS. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.
- YAHASHI, Y.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. Production of xylitol from d-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of d-glucose feeding. *J. Fermentat. Bioeng.*, v. 81, p. 148-152, 1996.
- YU, Y.; Y.-H.; CHU, J.; ZHUANG, Y.-P.; ZHANG, S.-L. The Influence of Controlling Redox Potential on Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chinese J. Biotechnol.*, v. 23, p. 878-884. 2007.
- ZHANG, Z.; O'HARA, I. M.; DOHERTY, Q. O. S. Pretreatment of sugarcane bagasse by acid-catalysed process in aqueous ionic liquid solutions (Report) *Bioresour. Technol.*, v. 120 p. 149-156, 2012.

APÊNDICE A

Tabela A.1: Teste de Tukey realizado para os rendimentos em etanol das fermentações com diferentes valores k_{La} , para a levedura *S. passalidarum*.

Tukey HSD test; variable rendimento % (Spreadsheet1)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 1,1578, df = 4,0000				
k_{La}	{1} (36,75)	{2} (59,190)	{3} (62,200)	{4} (56,850)
0 h ⁻¹		0,000361	0,000313	0,000409
4,9 h ⁻¹	0,000361		0,158817	0,284630
8 h ⁻¹	0,000313	0,158817		0,027797
45 h ⁻¹	0,000409	0,284630	0,027797	

Tabela A.2: Teste de Tukey realizado para as produtividades volumétricas em etanol das fermentações com diferentes valores k_{La} , para a levedura *S. passalidarum*.

Tukey HSD test; variable QP (Spreadsheet1)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00005, df = 4,0000				
k_{La}	{1} (0,3800)	{2} (0,5848)	{3} (0,6221)	{4} (1,1178)
0h ⁻¹		0,000300	0,000293	0,000291
4,9h ⁻¹	0,000300		0,031071	0,000291
8h ⁻¹	0,000293	0,031071		0,000291
45h ⁻¹	0,000291	0,000291	0,000291	