



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL POR LINHAGENS RECOMBINANTES DE  
*Saccharomyces cerevisiae* E NOVAS ESPÉCIES DE *Spathaspora* A PARTIR DE  
HIDROLISADOS DA CASCA DE AVEIA E SOJA**

PAULO ROBERTO DALL CORTIVO

Orientador: Prof. Dr. MARCO ANTÔNIO ZÁCHIA AYUB

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> LILIAN RAQUEL HICKERT

Porto Alegre

ABRIL DE 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL POR LINHAGENS RECOMBINANTES  
DE *Saccharomyces cerevisiae* E NOVAS ESPÉCIES DE *Spathaspora* A  
PARTIR DE HIDROLISADOS DA CASCA DE AVEIA E SOJA**

PAULO ROBERTO DALL CORTIVO

Engenheiro Agrônomo - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Industrial

Orientador: Prof. Dr MARCO ANTÔNIO ZÁCHIA AYUB

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> LILIAN RAQUEL HICKERT

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil.

ABRIL de 2017

#### CIP - Catalogação na Publicação

Dall Cortivo, Paulo Roberto  
Produção de etanol e xilitol por linhagens  
recombinantes de *saccharomyces cerevisiae* e novas  
espécies de *spathaspora* a partir de hidrolisados da  
casca de aveia e soja / Paulo Roberto Dall Cortivo. -  
- 2017.  
114 f.

Orientador: Marco Antônio Zachia Ayub.  
Coorientadora: Lilian Raquel Hickert.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. metabolismo da xilose. 2. etanol e xilitol. I.  
Zachia Ayub, Marco Antônio, orient. II. Hickert,  
Lilian Raquel, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Se soubéssemos o que o  
amanhã nos traria, não precisaríamos de  
nossos sonhos, esperanças e planos”

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar quero agradecer a meus pais, Vicente e Santina, por todo apoio, ajuda e carinho. Este trabalho é dedicado a vocês.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, palco de grandes experiências de vida.

Ao meu orientador professor Marco A. Z. Ayub pelos desafios propostos e pela confiança depositada. Pela sua preocupação em sempre me oferecer as melhores condições possíveis de trabalho em laboratório.

A minha co orientadora professora Lilian Raquel Hickert pela paciência e auxílios em todos os momentos.

À professora Patrícia Valente da Silva, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pela atenção e disponibilidade. Também agradeço pela sua amizade e pelos muitos conselhos.

Aos colegas do BIOTECLAB os quais compartilhei meus dias de trabalho, em especial à Andreia Axelrud, à Lovaine Duarte e à Sabrina Gabardo pela cumplicidade nas (re) construções cotidianas.

Aos meus colegas e amigos Lucas L.C. Casagrande e Luiz Gustavo Denardin pela grande amizade de longa data. Por compartilharem comigo seus desafios e conquistas.

À Elisiane que há dois anos me escuta falando deste trabalho e de muitas outras coisas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro.

Aos amigos e as demais pessoas que de alguma maneira fazem parte da minha vida e contribuíram para que eu pudesse concretizar este sonho.

# PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL POR LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae* E NOVAS ESPÉCIES DE *Spathaspora* A PARTIR DE HIDROLISADOS DA CASCA DE AVEIA E SOJA<sup>1</sup>

Autor: Paulo Roberto Dall Cortivo

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Lilian Raquel Hickert

## RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos agroindustriais são substratos abundantes e de baixo custo para a produção de vários compostos de valor agregado como etanol e xilitol, por isso a importância de estudos para ampliar as formas de aproveitamento das pentoses e hexoses presentes nestas matérias primas. Em vista disso, o presente trabalho buscou estudar a composição e os processos de hidrólise ácida diluída e enzimática da casca de soja (*Glycine max*) e da casca de aveia (*Avena sativa* L), bem como avaliar a fisiologia e a capacidade de produção de metabólitos como etanol e xilitol por novas leveduras recombinantes e selvagens, a partir da fermentação destes hidrolisados. Na primeira etapa do estudo, testou-se diferentes concentrações de ácido sulfúrico em diferentes tempos de autoclave para o pré-tratamento e solubilização da fração de hemicelulose da mistura de casca de soja e casca de aveia, através do processo de hidrólise ácida diluída. A condição de 1 % de ácido em 40 minutos de autoclave foi escolhida para a obtenção do hidrolisado ácido para a fermentação. No sólido resultante do tratamento anterior, foram testadas duas enzimas, o extrato do fungo *Penicillium echinulatum* e a enzima comercial *novozymes* CELLUCLAST 1.5®, em três concentrações enzimáticas (10 FPU g<sup>-1</sup>, 15 FPU g<sup>-1</sup>, 20 FPU g<sup>-1</sup>). A enzima comercial *novozymes* CELLUCLAST 1.5®, na concentração de 15 FPU g<sup>-1</sup> foi escolhida para a obtenção do hidrolisado enzimático pela maior liberação de açúcares no meio. Em uma segunda etapa, os hidrolisados ácido e enzimático e a mistura destes foram testados como meio de fermentação para duas linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* YRH 396 e YRH 400 que foram recombinadas por integração cromossômica dos genes da xilose redutase (*XYL1*), xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *Pichia stipitis* e xiluloquinase (*XKS1*) de *S. cerevisiae* conferindo capacidade de metabolização da xilose. Nos ensaios em agitador orbital, a linhagem YRH 396 obteve parâmetros fermentativos ( $Y_{p/s}$  e  $Q_p$ ) superiores e teve seu metabolismo estudado em biorreator, apresentando valor de  $Y_{p/s}$  de 0,39 gg<sup>-1</sup> na fermentação do hidrolisado enzimático concentrado. Na fermentação do hidrolisado ácido em anaerobiose 71,2 % da xilose foi consumida com  $Y_{p/s}$  (etanol) de 0,33 gg<sup>-1</sup>. Na fermentação do hidrolisado ácido em um biorreator aerado com 1 vvm 64,3 % da xilose foi consumida com produção de 2,9 g L<sup>-1</sup> de etanol e 8,17 g L<sup>-1</sup> de xilitol. Em uma terceira etapa do trabalho, as novas espécies recentemente isoladas *Spathaspora girioi* e *Spathaspora hagerdaliae* foram testadas fermentando o hidrolisado ácido em anaerobiose e oxigênio limitado em agitador orbital. A fermentação pela espécie *S. hagerdaliae* foi escalonada em biorreator e apresentou  $Y_{p/s}$  (etanol) de 0,32 gg<sup>-1</sup> no cultivo em anaerobiose e  $Y_{x/x}$  (xilitol) de 0,31 gg<sup>-1</sup> em biorreator aerado.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (112p.) Abril, 2017

# ETHANOL AND XYLITOL PRODUCTION BY RECOMBINANT STRAINS OF *Saccharomyces cerevisiae* AND NEW SPECIES OF *Spathaspora* FROM HYDROLYSATES OF OAT AND SOYBEAN HULL

Author: Paulo Roberto Dall cortivo

Advisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup>. Lilian Raquel Hickert

## ABSTRACT

Agroindustrial lignocellulosic residues are abundant, low-cost substrates for the production of various value-added compounds such as ethanol and xylitol. Therefore, the importance of extensive studies to increase the uses of pentoses and hexoses present in these raw materials. In this context, the present study sought to study the composition and the processes of diluted acid and enzymatic hydrolysis of soybean hulls and oat hulls, and to evaluate the physiology and production of ethanol and xylitol by new wild and recombinant yeast strains during fermentation of these hydrolysates. In the first stage of the study, different concentrations of sulfuric acid were tested in different autoclave times for the pre-treatment and solubilization of the hemicellulose fraction of the soybean hull and oat bark mixture through the diluted acid hydrolysis process. The condition of 1% acid in 40 minutes of autoclaving was chosen to obtain the hydrolysate resulting from the acid treatment for fermentation. In the solid resulting from the previous treatment, two enzymes, an extract of the fungus *Penicillium echinulatum* and the commercial enzyme CELLUCLAST 1.5 ® Novozymes, were tested in three enzymatic concentrations (10 FPU g<sup>-1</sup>, 15 FPU g<sup>-1</sup>, 20 FPU g<sup>-1</sup>). The commercial enzyme Novozymes CELLUCLAST 1.5 ® in the concentration of 15 FPU g<sup>-1</sup> was chosen to obtain the enzymatic hydrolysate. In the second part, the acid and enzymatic hydrolysates and the mixture of these were tested as a fermentation medium for two recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* YRH 396 and YRH 400 that were recombined by chromosomal integration of the genes xylose reductase (*XYL1*), xylitol dehydrogenase (*XYL2*) di *Pichia stipitis* and xylulokinase (*XKS1*) genes of *S. cerevisiae* conferring capacity of xylose metabolism. In the orbital shaker assays the YRH 396 strain showed better fermentation parameters ( $Y_{p/s}$  and  $Q_P$ ) and had its metabolism studied in a bioreactor, showing an  $Y_{p/s}$  of 0.39 g g<sup>-1</sup> in the fermentation of the concentrated enzymatic hydrolysate and consumption of 71.2 % of xylose in the fermentation of the acid hydrolysate under anaerobiosis, with  $Y_{p/s}$  of 0.33 gg<sup>-1</sup>. In the fermentation of the acid hydrolysate in an aerated bioreactor with 1 vvm, 64.3% of xylose was consumed with production of 2.9 g L<sup>-1</sup> of ethanol and 8.17 g L<sup>-1</sup> of xylitol. In the third stage of the work, the species *Spathaspora girioi* and *Spathaspora hagerdaliae* were tested fermenting the acid hydrolysate in anaerobiosis and limited oxygen in orbital shaker. Fermentation by the *Spathaspora hagerdaliae* was staged in a bioreactor and presented  $Y_{p/s}$  (ethanol) of 0.32 gg<sup>-1</sup> under anaerobiosis and  $Y_{x/x}$  (xylitol) of 0.31 under microaerobiosis.

<sup>1</sup> Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (112p.) April, 2017

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos .....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1 Produção de combustíveis em biorrefinaria .....	20
3.2 Produção de etanol de primeira geração.....	22
3.3 Produção de etanol de segunda geração ou lignocelulósico.....	22
3.4 Casca de aveia ( <i>Avena sativa</i> ) e casca de soja ( <i>Glycine max</i> ) .....	24
3.5 Pré- tratamentos dos resíduos lignocelulósicos .....	25
3.6 Tratamento enzimático e estratégias de fermentação.....	29
3.7 Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos em etanol .....	31
3.8 Leveduras fermentadoras de pentoses .....	32
3.9 Construções de linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> .....	33
3.10 Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos em xilitol.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1 Resíduos lignocelulósicos .....	38
4.2 Micro-organismos .....	38
4.3 Determinação da composição dos resíduos lignocelulósicos.....	39
4.3.1 Determinação do teor de lignina.....	40
4.3.2 Determinação do teor de celulose e hemicelulose .....	40
4.3.3 Determinação da umidade .....	41
4.4 Hidrólise da casca de aveia e da casca de soja.....	41
4.4.1 Pré-tratamento da casca de aveia e casca de soja e obtenção do hidrolisado ácido.....	42
4.4.2 Hidrólise enzimática da mistura de casca de aveia e soja e obtenção do hidrolisados enzimático .....	43
4.5 Manutenções e inóculo.....	43
4.6 Meios sintéticos e hidrolisados.....	44
4.6.1 Meio sintético .....	44
4.6.2 Hidrolisado resultante do tratamento ácido. ....	44
4.6.3 Hidrolisado resultante do tratamento enzimático.....	45



4.6.4 Mistura de hidrolisados ácido e enzimático .....	45
4.7 Ensaio de fermentação.....	45
4.7.1 Fermentação de meio sintético por <i>S. cerevisiae</i> recombinante em agitador orbital.....	45
4.7.2 Fermentação de hidrolisado ácido e enzimático por <i>S. cerevisiae</i> recombinante em agitador orbital .....	46
4.7.3 Fermentação de hidrolisado ácido e enzimático por <i>S. cerevisiae</i> recombinante em biorreator.....	46
4.7.4 Ensaio em agitador orbital e em biorreator submerso com as espécies <i>S. girioi</i> e <i>S. hagerdaliae</i> .....	47
4.8 Métodos analíticos .....	47
4.8.1 Determinação das concentrações celulares.....	47
4.8.2 Determinações da concentração de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético .....	48
4.8.3 Determinações da concentração de furfural e hidroximetilfurfural.....	48
4.8.4 Determinação de pH e pressão osmótica.....	48
4.9 Determinação de parâmetros fermentativos e de hidrólise .....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Composição química da casca de aveia e da casca de soja .....	50
5.2 Hidrólise ácida diluída .....	54
5.2.1 Avaliação da liberação de açúcares da casca de aveia e casca de soja	54
5.2.2 Avaliação da liberação de açúcares da mistura casca de aveia e casca de soja.....	56
5.3 Sacarificação da fração de celulose da mistura de casca de aveia e casca de soja.....	58
5.4 Caracterizações dos hidrolisados da mistura de casca de aveia e soja.....	63
5.5 Avaliação da capacidade de conversão de pentoses e hexoses pelas linhagens recombinantes <i>S. cerevisiae</i> YRH 396 e YRH 400. ....	65
5.6 Ensaio em agitador orbital com as linhagens recombinantes <i>S. cerevisiae</i> YRH 396 e YRH 400 fermentando hidrolisados da casca de aveia e soja.....	69
5.7 Escalonamento da fermentação de hidrolisados da mistura de casca de aveia e soja pela levedura <i>S. cerevisiae</i> YRH 396 em biorreator.....	75
5.7.1 Fermentação da mistura de hidrolisado ácido e enzimático e do	

hidrolisado enzimático .....	76
5.7.2 Fermentação do hidrolisado ácido em biorreator em anaerobiose.....	81
5.7.3 Fermentação do hidrolisado ácido em biorreator aerado .....	83
5.8 Ensaio de fermentação com as espécies <i>Spathaspora girioi</i> e <i>Spathaspora hagerdaliae</i> .....	86
5.8.1 Ensaio preliminares de fermentação de meio sintético .....	86
5.8.2 Fermentação do hidrolisado ácido em agitador orbital .....	87
5.8.3 Fermentação por <i>S. hagerdaliae</i> de hidrolisado ácido em biorreator em anaerobiose.....	91
5.8.4 Fermentação por <i>S. hagerdaliae</i> de hidrolisado ácido em biorreator aerado. ....	94
6. CONCLUSÕES .....	98
7. PERSPECTIVAS .....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100
ANEXO 1.....	110

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica..	27
<b>Tabela 2.</b> Composição da casca de aveia obtida neste trabalho e comparada com a composição de outros resíduos lignocelulósicos.....	50
<b>Tabela 3.</b> Composição da casca de soja obtidas neste trabalho e comparada com outras referências.....	52
<b>Tabela 4.</b> Composição de açúcares da casca de aveia e da casca de soja obtida neste trabalho.....	53
<b>Tabela 5.</b> Caracterização dos hidrolisados testados nos ensaios de fermentação em agitador orbital e em biorreator.....	64
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros cinéticos da linhagem <i>S. cerevisiae</i> YRH 396 fermentando diferentes hidrolisados da mistura de casca de aveia e casca de soja em anaerobiose e oxigênio limitado. ....	70
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros cinéticos da linhagem <i>S. cerevisiae</i> YRH 400 fermentando diferentes hidrolisados da mistura de casca de aveia e casca de soja em anaerobiose e oxigênio limitado .....	71
<b>Tabela 8.</b> Ensaio de fermentação de meio sintético pelas espécies <i>S. girioi</i> e <i>S. hagerdaliae</i> .....	86
<b>Tabela 9.</b> Células viáveis após 30 h de cultivo de <i>S. girioi</i> e <i>S. hagerdaliae</i> nos hidrolisados I,II e V em anaerobiose .....	88
<b>Tabela 10.</b> Células viáveis após 30 h de cultivo de <i>S. girioi</i> e <i>S. hagerdaliae</i> nos hidrolisados I,II e V em oxigênio limitado .....	88
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros cinéticos das espécies <i>S. girioi</i> e <i>S. hagerdaliae</i> fermentando o hidrolisado ácido I .....	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de uma biorrefinaria e seus produtos..	20
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de uma biorrefinaria de fonte lignocelulósica.....	21
<b>Figura 3.</b> Estruturas da biomassa vegetal. .	23
<b>Figura 4.</b> Etapas de tratamento da biomassa lignocelulósica e fermentação dos açúcares a etanol. .	24
<b>Figura 5.</b> Formação de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos. .	28
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da ação catalítica das celulasas..	30
<b>Figura 7.</b> Vias de metabolismo de xilose em leveduras e bactérias .....	32
<b>Figura 8.</b> Sequência de tratamentos dos resíduos lignocelulósicos para a liberação dos monómeros de açúcares.....	42
<b>Figura 9.</b> Liberação de glicose, xilose e arabinose da casca de aveia em 40 minutos de autoclave (A) e 60 minutos de autoclave (B) .....	55
<b>Figura 10.</b> Liberação de glicose, xilose e arabinose da casca de soja em 40 minutos de autoclave (A) e 60 minutos de autoclave (B) .....	55
<b>Figura 11.</b> Liberação de glicose, xilose e arabinose variando a concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 1% , 2 % e 3 % (v/v) da mistura de casca de aveia e casca de soja. ....	57
<b>Figura12.</b> Liberação de glicose pelo extrato do fungo <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 em três concentrações de enzima por massa seca da mistura de casca de aveia e casca de soja. ....	59

<b>Figura 13.</b> Liberação de glicose pela enzima Novozymes CELLUCLAST 1.5 ® em três concentrações de enzima por massa seca da mistura de casca de aveia e casca de soja.....	61
<b>Figura 14.</b> Eficiência de hidrólise do extrato de <i>Penicillium echinulatum</i> S1M29 e da enzima Novozymes CELLUCLAST 1.5 ® .....	62
<b>Figura 15.</b> Crescimento celular e cinética de consumo de açúcares e formação de metabólitos pelas linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> YRH396 e YRH400 fermentando meio sintético em agitador orbital. (A) Crescimento celular (B) Cinética de consumo de açúcares e formação de metabólitos.....	68
<b>Figura 16.</b> (A) Células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> recombinante YRH 396 fermentando a mistura do hidrolisados ácido e enzimático. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos.....	76
<b>Figura 17.</b> (A) Células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> recombinante YRH 396 fermentando o hidrolisado enzimático concentrado. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos . .....	79
<b>Figura 18.</b> (A) Células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> recombinante YRH 396 fermentando o hidrolisado ácido em anaerobose. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos. ....	82
<b>Figura 19.</b> (A) Células viáveis de <i>S. cerevisiae</i> recombinante YRH 396 fermentando o hidrolisado ácido em biorreator aerado com 1 vvm. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos.....	84
<b>Figura 20.</b> (A) Células viáveis de <i>S. hagerdaliae</i> fermentando hidrolisado ácido em anerobiose. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos .....	92

**Figura 21.** (A) Células viáveis de *S. hagerdaliae* fermentando hidrolisado ácido em biorreator aerado com 1 vvm. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos. .... 95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DO	Densidade ótica
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
G <sub>20</sub> X <sub>30</sub>	Meio sintético 20 g L <sup>-1</sup> de glicose e 30 g L <sup>-1</sup> de xilose
h	Hora
HMF	5- hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
K <sub>m</sub>	Constante de afinidade enzimática
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
Q <sub>p</sub>	Produtividade volumétrica
RID	Detector de índice de refração
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SHF	<i>Separate hydrolysis and fermentation</i>
SSF	<i>Simultaneous saccharification and fermentation</i>
UFC	Unidade formadora de colônias
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Detector da radiação UV
vvm	Volume de ar por volume de meio de cultura
X <sub>30</sub>	Meio sintético com 30 g L <sup>-1</sup> de xilose
XHD	Xilose desidrogenase

<i>XI</i>	Xilose isomerase
<i>XKSI</i>	Xiloloquinase
<i>XR</i>	Xilose redutase
<i>XYL1</i> <i>cerevisiae</i>	Gene correspondente ao gene da xilose redutase em <i>S.</i>
<i>XYL2</i> <i>cerevisiae</i>	Gene correspondente ao gene de xilitol desidrogenase em <i>S.</i>
YP	Caldo de peptona e extrato de levedura
Y	Rendimento



## 1. INTRODUÇÃO

A produção de combustíveis atualmente é baseada na exploração das reservas fósseis, porém estes recursos são limitados e sua exploração tem causado vários problemas ambientais, como por exemplo, o efeito estufa. Neste contexto, as biomassas vegetais são as únicas fontes de carbono disponíveis no planeta capazes de suprirem a demanda para a produção de combustíveis. Em vista disso, o século 21 emergiu com um novo conceito de unidade produtora de combustíveis a partir de biomassa, as “Biorrefinarias”. Diferentes das refinarias de petróleo, as biorrefinarias são unidades menores, bem distribuídas geograficamente, com capacidade de revitalizar as áreas rurais, transformando biomassa em produtos químicos e combustíveis.

Biomassas amiláceas e sacaríneas podem ser utilizadas como substrato para a produção de etanol. Elas são provenientes de diferentes culturas como cana-de-açúcar no Brasil, beterraba na Europa e milho nos Estados Unidos. O etanol produzido por esta fonte é chamado de etanol de primeira geração, pois os açúcares são extraídos e convertidos diretamente em etanol. Muitos questionamentos éticos e ambientais têm surgido quanto ao uso destas biomassas para a produção de combustíveis, já que competem diretamente com a produção de alimentos.

As biomassas lignocelulósicas, que são resíduos das culturas agrícolas ou agroindustriais, são compostas basicamente por polímeros de carboidratos formados por celulose e hemicelulose, os quais, quando dissociados, liberam açúcares que podem ser fermentados em etanol. O etanol produzido a partir destas biomassas é chamado de etanol de segunda geração. Para a

viabilização deste processo, muitos desafios precisam ser superados, principalmente porque o caldo fermentativo do etanol de segunda geração possui composição diferente do caldo fermentativo do etanol de primeira geração, sendo este último composto basicamente por hexoses, facilmente fermentadas a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Já o caldo fermentativo do etanol de segunda geração é composto principalmente da mistura de hexoses e pentoses, com este último açúcar de difícil fermentação por micro-organismos selvagens.

Para um processo de produção de etanol de segunda geração ser viável economicamente, os substratos devem estar localmente disponíveis. Além disso, para permitir que os açúcares fermentescíveis sejam liberados das biomassas lignocelulósicas essas devem passar por um processo de pré-tratamento que pode ser químico ou físico, podendo ser seguido por processo enzimático – sacarificação - possibilitando a despolimerização da fração de celulose em monômeros de açúcares que são fermentados na etapa posterior. Para que todo este processo seja viável é necessário buscar a maximização na liberação de açúcares e o menor gasto de energia.

Neste contexto, o presente trabalho buscou estudar a composição química da casca de soja e da casca de aveia, juntamente com os processos de hidrólise ácida diluída e enzimática destes resíduos visando à máxima liberação de açúcares fermentescíveis. Além disso, as estratégias de fermentação destes hidrolisados por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* e por novas espécies de *Spathaspora* foram estudadas, visando principalmente o incremento da fermentação da xilose no hidrolisado, pois este é o maior desafio do etanol de segunda geração.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisados resultantes da mistura de casca de aveia e soja por leveduras recombinantes e selvagens capazes de fermentar xilose.

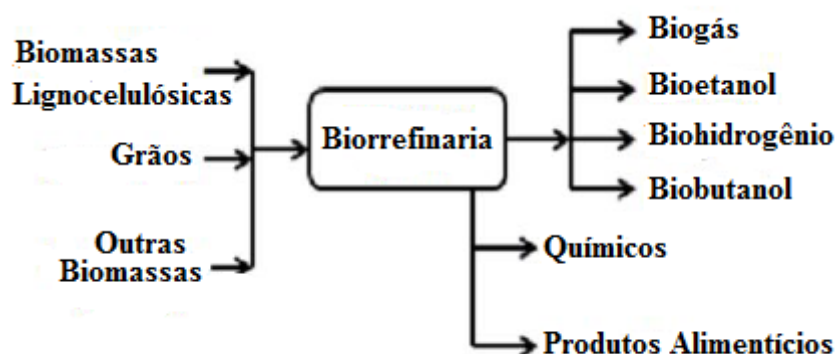
### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar condições de hidrólise ácida diluída e enzimática da mistura de cascas de aveia e da casca de soja visando à máxima liberação de açúcares fermentescíveis;
- ✓ Avaliar a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisados ácido e enzimático da mistura casca de aveia e soja por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* YRH 396 e YRH 400 com capacidade de fermentar xilose;
- ✓ Avaliar a produção de etanol e xilitol pelas novas espécies *Sphatasporas girioi* e *Sphatasporas hagerdaliae* fermentando o hidrolisado ácido da mistura casca de aveia e soja.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Produção de combustíveis em biorrefinaria

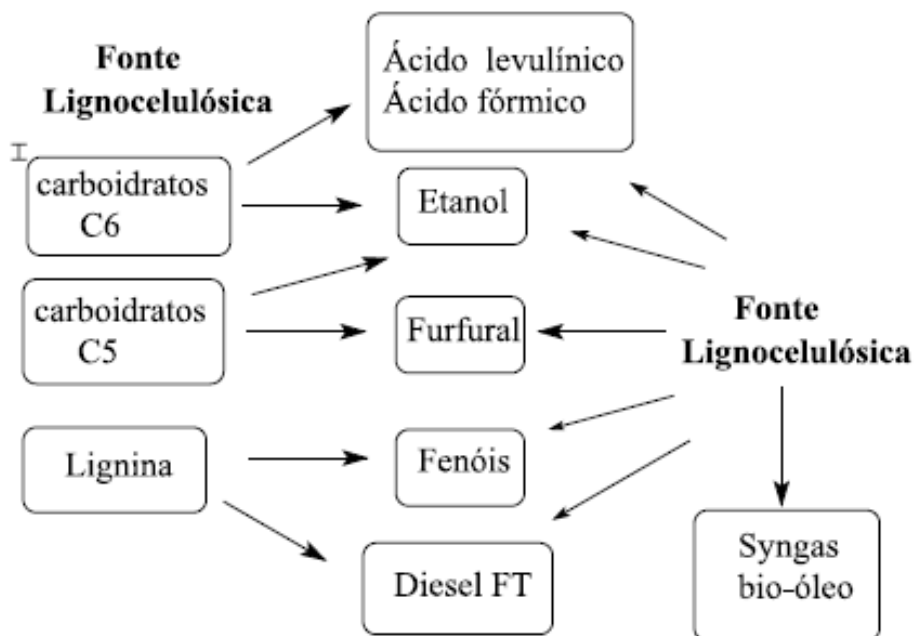
Atualmente, a matriz energética de muitos países está visando utilizar biocombustíveis. Com isso, desenvolveu-se um novo conceito de unidade produtora de combustíveis, a “biorrefinaria”. Esta unidade industrial é capaz de converter biomassa em combustíveis e outros produtos químicos especializados (Ogeda e Petri, 2010; Rodrigues 2011; Anwar *et al.*, 2014). A Figura 1 demonstra a representação esquemática de uma biorrefinaria e seus produtos.



**Figura 1. Representação esquemática de uma biorrefinaria e seus produtos. Adaptado de Suhag e Sharma (2015).**

Para viabilizar a produção de combustíveis de forma mais sustentável, a biorrefinaria deve exercer papel dominante no atual milênio (Rodrigues, 2011). Uma biorrefinaria é dita de primeira geração quando utiliza açúcares considerados como reserva metabólica da planta, como sacarose ou amido, e de segunda geração quando utiliza complexos lignocelulósicos como, por exemplo, cascas e caules (Hickert *et al.*, 2014; Rodrigues 2011; Das Néves *et*

al., 2007). A Figura 2 demonstra a representação esquemática de uma biorrefinaria a partir de fontes lignocelulósicas.



**Figura 2. Representação esquemática de uma biorrefinaria de fonte lignocelulósica. Adaptado de Rodrigues (2011).**

Os materiais lignocelulósicos são provenientes da atividade agrícola e agroindustrial são classificados como resíduos porque na maioria das vezes não possuem valor agregado. Uma estimativa feita por Kim e Yum (2006) relata que, mundialmente são gerados 1,5 trilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica por ano, o que é uma fonte importante de matéria-prima para a produção de produtos com valor agregado como etanol e xilitol. Outra estimativa feita por Jonnson *et al.*, (2007) mostra que 50 % das biomassa vegetal produzida no mundo é biomassa lignocelulósica.

### 3.2 Produção de etanol de primeira geração

O etanol pode ser produzido a partir da fração amilácea ou sacarínea de algumas culturas agrícolas, como milho, cana de açúcar e beterraba (Moyses *et al.*, 2016). A escolha da cultura agrícola é decorrente das condições edafoclimática locais, por isso nos Estados Unidos o milho é o principal substrato e na Europa a beterraba. No caso do Brasil, a cana-de-açúcar, gramínea do gênero *Saccharum L.* é o único substrato usado para a produção de álcool, pois ela acumula sacarose que é facilmente convertida a etanol por micro-organismos, dispensando tratamentos enzimáticos (Argueso *et al.*, 2016).

### 3.3 Produção de etanol de segunda geração ou lignocelulósico

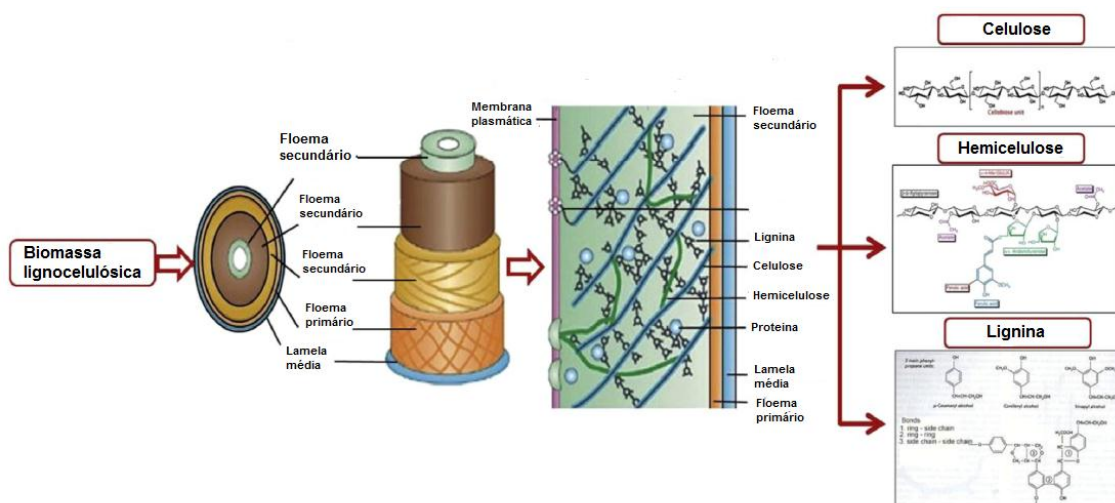
A biomassa lignocelulósica é responsável por dar suporte ao vegetal, sendo formada por carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) e pela fração de lignina (Kumar *et al.*, 2008). O complexo lignocelulósico é composto da fração de celulose, hemicelulose e lignina. A proporção destes componentes varia conforme a espécie, tempo de colheita, condições edafoclimáticas de cultivo e estágio de crescimento (Jeffries e Jin, 2009).

A celulose é um polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemicelulose, que são polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico, e ácido manurônico e lignina, que forma redes poliméricas tridimensionais compostas por unidades de fenilpropano

interligadas (Lora e Classer, 2001). As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa, representando em torno de 40-50% e 20-30 % do peso seco das plantas, respectivamente, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares e fermentados (Sánchez e Cardona, 2008).

As ligninas, quando degradadas a frações de massas molares menores, podem ser utilizadas na fabricação de espumas de poliuretanas, resinas fenólicas e epóxi, como fontes de fenol e etileno, ou também convertidas em fibras de carbono (Lora e Classer 2001; Kadla *et al.*, 2001; Clarck *et al.*, 2009).

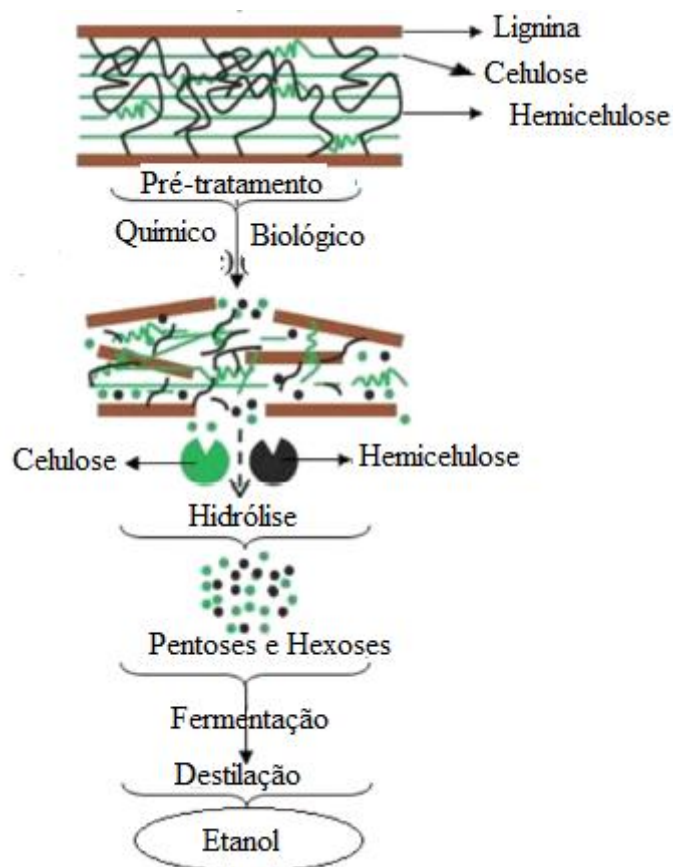
A Figura 3 representa as estruturas da biomassa vegetal.



**Figura 3. Estruturas da biomassa vegetal. Adaptado de Menon e Rao (2012).**

O etanol produzido por essa biomassa é chamado de etanol de segunda geração e para produção deste, a biomassa necessita ser exposta a um pré-tratamento, visando a liberação da fração de lignina e solubilização da fração hemicelulose. Em seguida, um tratamento enzimático pode ser utilizado para liberação dos monômeros de glicose presentes na fração de celulose, que

serão finalmente fermentados a etanol (Ogeda e Petri, 2010) como é mostrado na figura 4.



**Figura 4. Etapas de tratamento da biomassa lignocelulósica e fermentação dos açúcares a etanol. Adaptado de Jonsson et al., (2016).**

### 3.4 Casca de aveia (*Avena sativa*) e casca de soja (*Glycine max*)

Aveia branca (*Avena sativa*) é um cereal de inverno cultivado principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. A produção do Brasil deste grão na safra de 2016 foi de 739,6 mil toneladas. Na safra de 2016, a aveia branca no Rio Grande do Sul, teve maior aumento de



área semeada entre todas as culturas de inverno, de 118,4 mil hectares para 218,3 mil hectares.

A soja (*Glycine max*) é a oleaginosa mais cultivada no mundo. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja no mundo, sendo superado apenas pelos EUA. Segundo os dados históricos da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) o Rio Grande do sul é o terceiro estado com maior produção ficando atrás do estado de Mato Grosso e Paraná. No ano de 2016 foram colhidas 9543 milhões de toneladas de soja no Brasil.

A casca de aveia é o principal subproduto da moagem do grão representando cerca de 30 % do peso. A maior parte da casca da aveia tem sido descartada durante o processamento do grão, tornando-se um poluente para o meio ambiente, uma das poucas utilidades deste resíduo é a queima para geração de poder calorífero. A casca de soja é primeira camada que recobre o grão e é retirada durante a extração do óleo. O aproveitamento principal da casca de soja é na alimentação animal como alimento volumoso.

### **3.5 Pré- tratamentos dos resíduos lignocelulósicos**

Para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos na produção de etanol, estes devem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos de forma a liberar os açúcares fermentescíveis presentes na fração de hemicelulose e aumentar a suscetibilidade da fração de celulose à hidrólise enzimática (Lee, 1997). O pré-tratamento se faz necessário para aumentar a acessibilidade da área de superfície, redução da cristalização da

celulose, despolimerização parcial da celulose e solubilização das frações de hemicelulose e lignina (Margeot *et al.*, 2009).

Existe uma série de tratamentos químicos e físicos que podem ser aplicados no processamento inicial dos materiais lignocelulósicos (Tabela 1). Cada processo apresenta vantagens específicas bem como desvantagens, ficando a escolha do pré-tratamento usado relacionado à natureza do resíduo lignocelulósico escolhido e a finalidade de aproveitamento do caldo resultante.

Tabela 1. Métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Adaptado de Rodrigues (2011).

Método	Vantagens	Desvantagens
<i>Métodos diretos</i>		
Ácido concentrado	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Alto rendimento de glicose</li> <li>✓ Pouca formação de inibidores</li> <li>✓ Realizado à temperatura ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Alto custo do ácido ou na recuperação do ácido utilizado</li> <li>✓ Equipamento caro devido a problemas de corrosão</li> </ul>
Ácido diluído	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Menos problemas com corrosão quando comparado ao ácido concentrado</li> <li>✓ Método de duas etapas: bom rendimento de glicose e de açúcares de hemicelulose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Formação de produtos de degradação</li> <li>✓ Necessidade de reatores mais sofisticados para obtenção de altos rendimentos</li> <li>✓ Concentração baixa de açúcar no fluxo de saída</li> </ul>
<i>Pré-tratamentos Físicos</i>		
Moagem ou Vibração – seca ou úmida	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Diminui o tamanho da partícula, aumentando a área superficial</li> <li>✓ Em alguns casos, reduz o DP e a cristalinidade da celulose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Não é suficiente para aumentar a taxa de conversão de açúcar</li> <li>✓ Não retira lignina</li> </ul>
<i>Pré-tratamentos de Fracionamento por Solvente</i>		
Processo Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Solubiliza ligninas e hemiceluloses (dependendo do solvente utilizado)</li> <li>✓ Aumento da digestibilidade da biomassa celulósica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Alto custo dos solventes orgânicos, bem como na sua recuperação</li> <li>✓ Alto custo na recuperação de subprodutos</li> <li>✓ Taxa de líquido-sólido deve ser fixada com cuidado</li> </ul>
Fracionamento por Ácido Fosfórico	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Resulta em fibras de celulose amorfas</li> <li>✓ Opera a baixa temperatura e pressão</li> <li>✓ Altos rendimentos de glicose e xilose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Alto custo na recuperação e purificação do ácido fosfórico, acetona e ácido acético</li> </ul>
Líquidos Iônicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Reuso do líquido iônico após o processo</li> <li>✓ Substrato final com digestibilidade &gt;90%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ O líquido iônico deve ser completamente retirado antes da hidrólise (interfere na atividade hidrolítica das enzimas)</li> <li>✓ Alto custo dos líquidos iônicos</li> </ul>
<i>Pré-tratamentos Químicos</i>		
Explosão à Vapor (com/sem adição de ácido como catalisador)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Ótimo para madeira macia (na presença de um catalisador ácido)</li> <li>✓ Altos rendimentos de glicose e açúcares de hemicelulose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Formação de produtos de degradação</li> <li>✓ Uma etapa adicional é necessária para a remoção da lignina</li> </ul>
Expansão da fibra com amônia (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pouco gasto de energia: pré-tratamento realizado a temperaturas de 60-140 °C</li> <li>✓ Baixa formação de inibidores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Alto custo: grande quantidade de amônia necessária, recuperação da amônia</li> <li>✓ A fração da hemicelulose precisa ser hidrolisada por enzimas</li> <li>✓ Remoção desprezível de ligninas</li> </ul>
Oxidação Úmida Alcalina	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Formação mínima de inibidores</li> <li>✓ Remoção eficiente de lignina</li> <li>✓ Processo exotérmico: pouca energia necessária no processo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Custo de oxigênio e catalisador alcalino (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</li> </ul>
<i>Pré-tratamentos Biológicos</i>		
Uso de Fungos ( <i>white rot basidiomycetes</i> ) ou bactérias ( <i>Actinomicetes</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Remove quantidade considerável de lignina</li> <li>✓ Pré-tratamento brando (ótimo para materiais com alto conteúdo de carboidratos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Maior tempo de residência</li> <li>✓ Bactérias/fungos consomem o substrato.</li> </ul>

Dentre os pré-tratamentos, o realizado com ácido diluído e temperatura intermediária (60-160 ° C) é considerado um dos mais eficientes em relação à liberação dos açúcares, apesar de que a liberação de compostos secundários dos açúcares e da lignina podem ser gerados, inibindo o crescimento dos micro-organismos fermentadores (Mussato e Roberto, 2004), xilose e glicose podem se degradadas à furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente, (Figura 5), juntamente com outros compostos fenólicos oriundos da degradação da lignina.

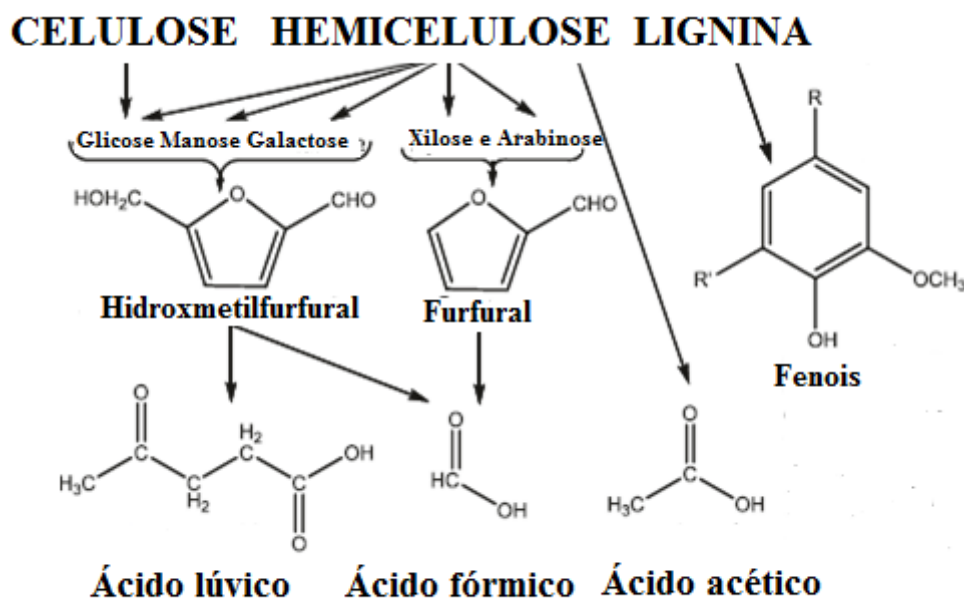


Figura 5. Formação de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos. Adaptado de Jonsson *et al.*, (2014).

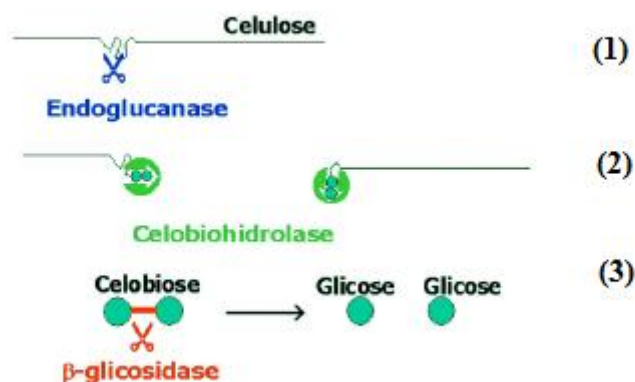
### 3.6 Tratamento enzimático e estratégias de fermentação

Após a realização do pré-tratamento para solubilizar a fração de hemicelulose e retirada da lignina solúvel, a fração de celulose precisa passar por um tratamento de sacarificação para a liberação de monômeros de glicose (Bond *et al.*, 2010). Normalmente, hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20 % sem a realização da etapa de pré-tratamento enquanto que, quando esta etapa é realizada, o rendimento pode alcançar mais de 90 % (Holm *et al.*, 2010). A hidrólise enzimática (sacarificação) pode ser realizada separadamente da fermentação alcóolica em um processo conhecido como fermentação e hidrólise separadas (do inglês SHF- *Separate Hydrolysis and Fermentation*), ou simultaneamente no processo denominado sacarificação e fermentação simultâneas (do inglês SSF- *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). No primeiro caso, a hidrólise e sacarificação SHF pode ser realizada em altas temperaturas como 50 °C, aproveitando a estabilidade das enzimas. Nesta temperatura a taxa de conversão é aumentada e é reduzido o risco de contaminação (OLOFSSON *et al.*, 2008). Após o processo de hidrólise, o caldo resultante é fermentado a etanol. Dentre as desvantagens deste sistema está o alto gasto de energia e a demanda de tempo para a realização do processo.

Na sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), a hidrólise enzimática e fermentação ocorrem no mesmo recipiente com atividade simultânea de enzima e micro-organismo, portanto este processo apresenta certos benefícios como aumento da produção de etanol, reduzindo a inibição exercida por produtos de sacarificação, e elimina a necessidade de reatores separados para sacarificação e a fermentação, que resulta em redução de

custos (Krishna *et al.*, 2000; Olofsson *et al.*, 2008). A grande desvantagem deste sistema é que a temperatura ótima de fermentação pela maioria dos micro-organismos (em torno de 30 ° C) é diferente da temperatura ótima das enzimas de hidrólise da celulose (em torno de 50 ° C ) o que dificulta a obtenção da eficiência total do sistema. Novos estudos estão sendo realizados para viabilizar o uso de micro-organismos termo tolerantes (Kádár *et al.*, 2004), além de estudos de concentrações de enzimas e de células microbianas balanceadas para minimizar o custo com micro-organismo e produção de enzima (Olofsson *et al.*, 2008).

Segundo Wyman (2005), as enzimas com complexo de celulasas são mais utilizadas na hidrólise da biomassa lignocelulósica, e atuam conforme a representação esquemática da Figura 6.



**Figura 6. Representação esquemática da ação catalítica das celulasas.**

**Disponível em Ogeda e Petry (2010).**

(1) endo-1,4-β-D-glúcanases ou endoglúcanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais;

(2) exo-1,4- $\beta$ -D-glúcanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose;

(3) 1,4- $\beta$ -D-glúcosidades que hidrolisam a celobiose à glicose.

Atividade catalítica deste complexo enzimático pode ser medida através da diminuição da viscosidade do meio, decorrente da diminuição de massa molar média de celulose ou derivados de celulose (Lynd e Wyman, 1999).

### **3.7 Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos em etanol**

O principal micro-organismo utilizado na produção de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por sua habilidade em produzir altas concentrações deste álcool, possuir alta tolerância ao etanol do meio, resistência aos inibidores presentes na biomassa hidrolisada (Bettiga *et al.*, 2008 ; Matsushika *et al.*, 2009 ; Girio *et al.*, 2010). Porém esta levedura somente tem capacidade de fermentar glicose; a xilose e outras pentoses também presentes nos hidrolisados de biomassa lignocelulósica não são fermentadas por essa levedura (Matsushika *et al.*, 2009). Ao mapear o genoma de *S cerevisiae* descobriu-se que ela, de uma forma surpreendente, possui todos os genes necessários para o metabolismo de xilose, porém estes são pouco expressos (Toivari *et al.*, 2004). A figura 7 mostra as vias de metabolismo de xilose de leveduras e bactérias que naturalmente fermentam este açúcar.

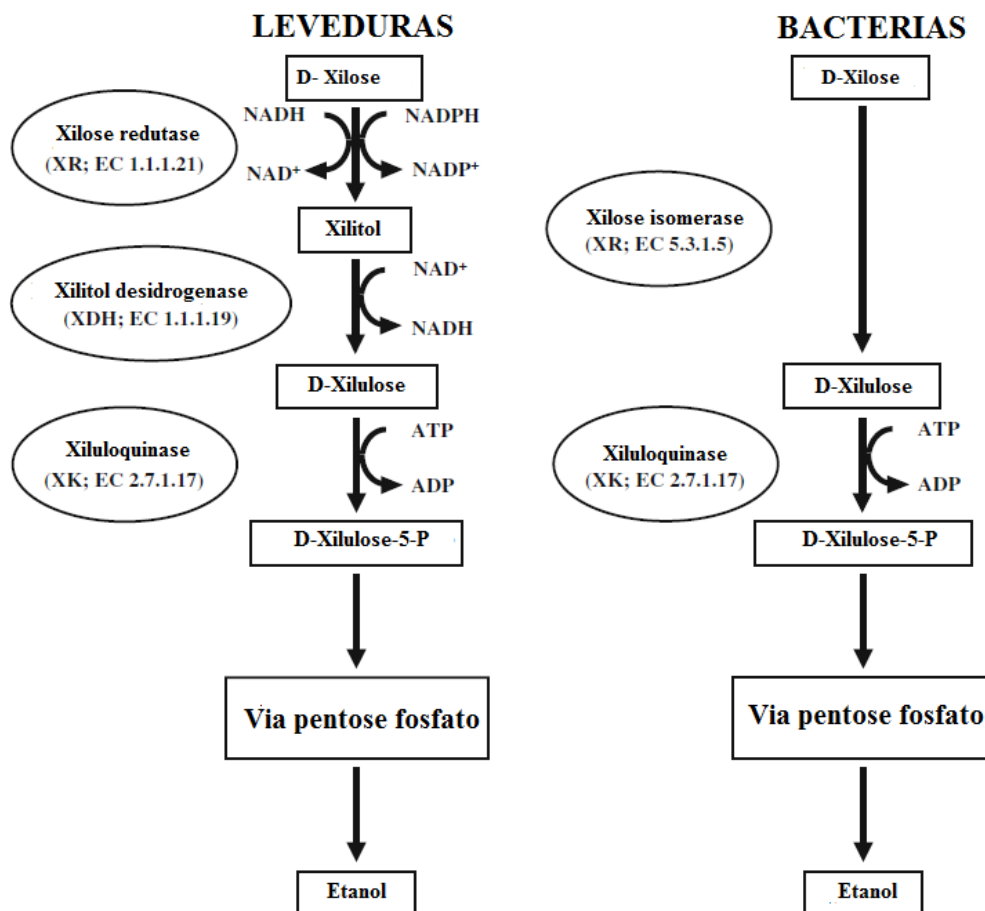


Figura 7. Vias de metabolismo de xilose em leveduras e bactérias (Matsushika *et al.*, 2009).

### 3.8 Leveduras fermentadoras de pentoses

Entre as espécies de leveduras fermentadoras de pentoses as mais conhecidas são: *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pachisolen tannophilus* e *Candida shehatae* (Matsushika *et al.*, 2009). Estas leveduras apresentam rendimento considerado baixo para uma aplicação industrial e poucas são tolerantes aos inibidores formados durante a hidrólise de resíduos lignocelulósicos (Margaritis e Bajpai, 1982; Tian *et al.*, 2009). Como estratégia de aproveitamento total dos açúcares presentes no hidrolisado, a utilização de co-cultivos para a produção de etanol combinando



uma levedura fermentadora de pentoses e um micro-organismo fermentador de glicose parece ter vantagens em relação ao uso de uma única cultura. As espécies *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae* são conhecidas pela habilidade em fermentar a xilose em etanol e pelo potencial na produção de etanol lignocelulósico (Cadete *et al.*, 2009; Hou, 2012). Nos trabalhos de Da Cunha-Pereira *et al.*, (2011) e Hickert *et al.*, (2013), a espécie *S. arborariae* foi testada em sistema de co-cultivo com *S. cerevisiae*, resultando em produtividade de etanol maior do que a atingida quando ambas as espécies foram avaliadas em fermentações isoladas. Além do bom rendimento, essas leveduras foram capazes de crescer e produzir etanol na presença de compostos tóxicos do hidrolisado de casca de arroz.

Nem todos os sistemas de co-cultivo são eficientes; em alguns casos as leveduras possuem fisiologias diferentes o que dificulta a obtenção de parâmetros fermentativos ótimos para ambas (Hickert *et al.*, 2013). A estratégia que vem sendo adotada é o desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com genes de leveduras fermentadoras de xilose que é a principal pentose presente na biomassa vegetal (Hahn e Hagerdal, 2007). Esta é uma estratégia que vem evoluindo, onde novos estudos estão sendo feitos para a inserção de transportadores exógenos de pentoses de leveduras selvagens que naturalmente fermentem este açúcar nas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* (Harner *et al.*, 2015).

### **3.9 Construções de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae***

O primeiro relato de fermentação anaeróbia de xilose em *S. cerevisiae* é da década de 80, no qual genes de utilização de xilose foram superexpressos

(Rizzi *et al.*, 1988). Desde então, diversas abordagens têm sido testadas mudando a expressão de um ou mais genes envolvidos nas vias de metabolismo de xilose. Inúmeras tentativas de construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* são relatadas na literatura utilizando vias de metabolismo de xilose de bactérias e leveduras (Matsushika *et al.*, 2009).

Algumas abordagens aproveitam que *S. cerevisiae* é capaz de metabolizar xilulose em baixa eficiência, em vista disso, tenta-se a inserção de genes codificadores da xilose isomerase de bactérias (XI) capazes de converter xilose em xilulose, porém esta estratégia mostrou resultados insatisfatórios (Gardonyi e Hahn Hagerdal, 2003). As leveduras com esta modificação mostraram baixos níveis de atividade enzimática, o que foi atribuído a modelação incorreta das proteínas, como modificações pós-transcricionais incorretas e formação de pontes de dissulfeto e alteração do pH intracelular. A introdução da enzima xilose isomerase (XI), do fungo *Piromyces* sp., por exemplo, promoveu uma alta atividade da enzima e, conseqüentemente, a conversão da xilose a etanol. Porém, o crescimento em xilose sob condições aeróbias é baixo e nenhum crescimento é obtido sob anaerobiose (Kuyper *et al.*, 2003; Diao *et al.*, 2013). Diversos outros trabalhos sob condições anaeróbias usando XI de bactérias vêm sendo relatados recentemente (Karhumaa *et al.*, 2007; Brat *et al.*, 2009 ; Demeke *et al.*, 2013). Um trabalho relatou pela primeira vez a co-expressão de do gene XI da bactéria do rúmem *Prevotella ruminicola* juntamente com a superexpressão do gene da xiluloquinase de *S. cerevisiae* (Hector *et al.*, 2013), seguido de um processo de evolução adaptativa, a levedura, neste estudo, obteve uma boa

taxa de crescimento em xilose, além de boa produtividade de etanol (82,9% de produtividade teórica).

A via oxi-redutora da xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XHD) de *Pichia stipitis* correspondente aos genes *XYL1* e *XYL2* e *S. cerevisiae* foi funcionalmente expresso em *S. cerevisiae* possibilitando esta levedura metabolizar xilose; esta é a via mais utilizada para criar leveduras capazes de metabolizar este açúcar, porém um dos problemas identificados nesta via é o acúmulo de xilitol devido ao desequilíbrio redox gerado pela diferença de especificidade de cofatores das enzimas que metabolizam a xilose (Matsushika *et al.*, 2009). A xilose redutase (XR), enzima responsável pela redução da D-xilose a D-xilitol utiliza principalmente NADPH como cofator, enquanto que a xilitol desidrogenase (XDH) utiliza somente  $\text{NAD}^+$  para converter D-xilitol a D-xilulose. A D-xilulose é convertida a D-xilulose-5P pela xiluloquinase (XK) para entrar na via das pentoses fosfato (PPP). A regeneração de  $\text{NAD}^+$  e de NADPH ocorre em um processo metabólico diferente, portanto, o equilíbrio redox é algo relevante para a engenharia metabólica. Mudanças na seletividade de XR para maior utilização de NADH em detrimento de NADPH tem resultado em efeitos positivos sobre o rendimento de etanol (Watanabe *et al.*, 2007).

Tentando resolver este desbalanço, desenvolveu-se linhagens que super expressam o gene da xiluloquinase (XK terceira enzima na via do metabolismo da xilose) que é apresentado naturalmente nas linhagens de *S. cerevisiae* selvagens, porém pouco expresso. Em geral, as linhagens recombinantes que expressam essa enzima comparada com as linhagens com expressão basal, aumentam drasticamente o nível de captação da xilose, além

de aumentar o nível de produção de etanol e diminuição da produção de xilitol (Toivari *et al.*, 2001)

### **3.10 Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos em xilitol**

Xilitol é um álcool de açúcar natural de cinco carbonos e devido ao seu poder adoçante (como a sacarose) tem sido altamente valorizado pelas indústrias de alimentos e farmacêutica (Musatto *et al.*, 2006). O valor de mercado do xilitol é alto, com aplicações em pastas de dente, gomas de mascar, além de alimentos com fins dietéticos. Possui propriedades anticariogênicas, uma vez que não é fermentado por micro-organismos da microbiota bucal (Maikinen, 1979).

O xilitol é produzido em escala comercial por um processo químico, a hidrogenação catalítica da xilose. Devido ao seu alto custo de produção, dificuldade de purificação e impacto ao meio ambiente, o uso de xilitol como adoçante é algo limitado fato que encoraja a produção alternativa, como é o caso da produção biotecnológica (Martínez *et al.*, 2012).

Dentre os micro-organismos, as leveduras são as melhores produtoras de xilitol, sendo as leveduras do gênero *Candida* as melhores (Winkelhausen e Kuzmanova, 1998). Em condições de oxigênio limitado não há completa reoxidação de NADH a NAD<sup>+</sup>, promovendo um desequilíbrio redox. A baixa concentração de NAD<sup>+</sup> diminui a oxidação do xilitol a xilulose, induzindo a liberação de xilitol no meio de cultura (Du preez *et al.*, 1989). Em uma limitação de oxigênio, pode ocorrer não só a formação de xilitol, mas também de etanol ou de ambos, dependendo dos cofatores envolvidos na reação. De uma maneira geral, o fornecimento de oxigênio é o parâmetro chave que

determinará se ocorrerá maior produção de xilitol, etanol ou maior crescimento celular (Roberto *et al.*, 1999).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos utilizados para a obtenção dos hidrolisados foram casca de soja (*Glycine max*) e casca de aveia (*Avena sativa*). A casca de soja foi adquirida da companhia Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos, localizada no município de Esteio, RS. Já a casca de aveia foi gentilmente doada pela empresa Natura, localizada no município de Cruz Alta - RS. Os resíduos foram moídos e passados em peneira de 1 mm e armazenados à temperatura ambiente até a realização da hidrólise.

### 4.2 Micro-organismos

Quatro leveduras com capacidade de fermentar xilose foram utilizadas no trabalho. Duas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com capacidade de fermentar xilose em etanol e duas novas espécies *Spathaspora* que recentemente foram descritas e mostram capacidade de fermentar xilose em meio sintético.

As linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* YRH 396 e YRH 400 foram transformadas por integração cromossômica dos genes *XYL1* xilose redutase e *XYL2* xilitol desidrogenase de *Pichia stipitis* e super expressão do gene *XKS1* xiluloquinase de *S. cerevisiae* conferindo capacidade de metabolizar xilose (Hector *et al.* 2011). Elas foram doadas ao BiotecLab pelo Dr. Ronald Hector do *National Center for Agriculture Utilization Research*. A linhagem parental (YB 2625) da recombinante YRH 396 foi isolada do bagaço-da-cana-de-açúcar, já a linhagem parental (D54) da recombinante YRH 400 foi isolada

do soro de queijo. Ambas as linhagens parentais são de aplicação industrial nos Estados Unidos. A descrição completa sobre a construção da linhagem está disponível em Hector *et al.*, (2011).

As novas espécies *Spathaspora*: *Spathaspora girioi* e *Spathaspora hagerdaliae*, recentemente isoladas de amostras de madeira em decomposição recolhidas na reserva de Patrimônio Natural de Serra Bonita, foram doadas ao BiotecLab pelo Dr. Carlos Augusto Rosa da UFMG. Estas leveduras mostraram boa capacidade de fermentar xilose em ensaios de fermentação de meio sintético, podendo ser comparadas às melhores espécies de *Spathaspora* já descritas na literatura. A descrição detalhada destas linhagens se encontra em Lopes *et al.*, (2016).

#### **4.3 Determinação da composição dos resíduos lignocelulósicos**

A composição de açúcares fermentescíveis, lignina solúvel e insolúvel, foram determinadas pela metodologia descrita por Duning e Dallas (1947), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias primas vegetais. Para análise da composição foram pesadas 2 g (massa seca) e transferidas para um becker, ao qual foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 72 % (p/p). A mistura foi agitada continuamente com um bastão de vidro e climatizado em banho-maria a 50 °C por 7 min. Nesta etapa, denominada hidrólise principal, ocorre o rompimento das fibras de celulose em oligômeros. Após completar o tempo de hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 275 mL de água destiladas e o conteúdo foi transferido para um frasco de frasco de erlenmeyer de 500 mL. Em uma etapa pós hidrólise, a suspensão foi autoclavada a 121 ° C por 15 min. Após o resfriamento, a

suspensão foi filtrada em papel de filtro, transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi completado com água destilada (após várias lavagens). O resíduo sólido foi seco em estufa a 105 °C e pesado até massa constante. A diferença entre a massa seca do resíduo e a massa seca da amostra foi utilizada para determinar a percentagem de lignina presente nas cascas. A fração líquida obtida foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para determinar a concentração dos componentes dos materiais lignocelulósicos (celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético) utilizados para o cálculo da percentagem de celulose e hemicelulose da casca de soja e da casca de aveia.

#### 4.3.1 Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi calculado conforme descrito por Rocha (2000), Eq. (1):

$$\% \text{ lignina} = \left[ \frac{\text{massa de lignina (g)} \times 10000}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra (g)}} \right] \quad (1)$$

#### 4.3.2 Determinação do teor de celulose e hemicelulose

O teor de celulose e hemicelulose foi calculado conforme descrito por IRICK *et al.* (1988), Eq. 2 e 3:

$$\% \text{ celulose} = \left[ \frac{\text{glicose (g/L)} \times 50 \times 100 \times \text{FC} \times \text{FP}}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra (\%)}} \right] \quad (2)$$



Onde: FC = fator de conversão de celulose (0,9); FP= fator de perda por hidrólise para celulose (1,06)

$$\% \text{ hemicelulose} = \left[ \frac{(\text{xilose (g/L)} \times 50 + \text{arabinose (g/L)} \times 50) \times 100 \times \text{FC} \times \text{FP}}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra (g)}} \right] \quad (3)$$

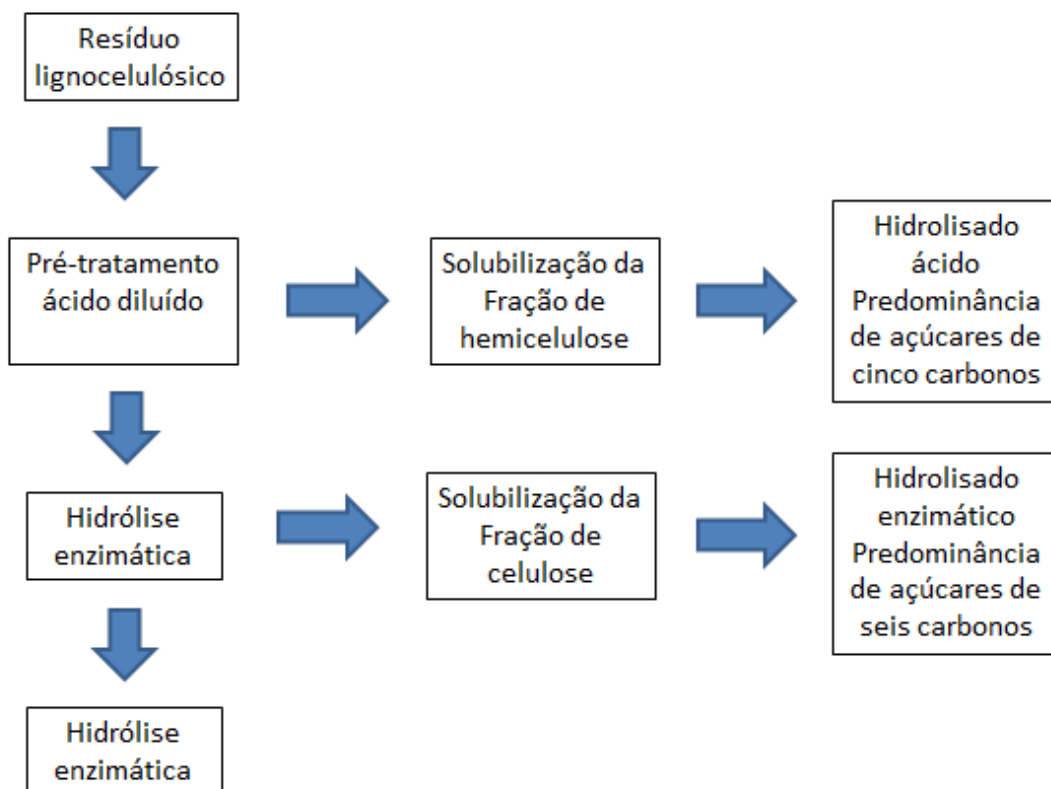
Onde: FC = fator de conversão da hemicelulose (0,88); FP = fator de perda por hidrólise para hemicelulose (1,15).

#### 4.3.3 Determinação da umidade

A umidade das cascas de soja e aveia foi determinada em balança de infravermelho (OHAUS) por 30 minutos a 105 °C.

#### 4.4 Hidrólise da casca de aveia e da casca de soja

A casca de aveia e a casca de soja passaram por etapas de hidrólise como mostrada no fluxograma abaixo (Figura 8) objetivando a liberação dos açúcares contidos nas frações de hemicelulose e celulose. Testou-se diferentes concentrações de ácido sulfúrico (1 %, 2 % e 3 %) (v/v) e dois tempos de autoclave (40 min e 60 min) na etapa de hidrólise ácida diluída. Na etapa de hidrólise enzimática testou-se três concentrações de enzima por grama de resíduo em massa seca (10 FPU g<sup>-1</sup>, 15 FPU g<sup>-1</sup> e 20 FPU g<sup>-1</sup>) do extrato do fungo *Penicillium echinulatum* e da enzima comercial CELLUCLAST<sup>®</sup> 1.5. Buscou-se definir uma combinação de condições de hidrólise que liberasse a maior quantidade de monômeros de açúcares.



**Figura 8. Sequência de tratamentos dos resíduos lignocelulósicos para a liberação dos monômeros de açúcares**

#### **4.4.1 Pré-tratamento da casca de aveia e casca de soja e obtenção do hidrolisado ácido**

Para solubilizar a fração de hemicelulose e tornar a fração de celulose suscetível à ação das enzimas, realizou-se pré-tratamento ácido diluído das cascas de aveia e soja. Com o objetivo de verificar o melhor tempo para a liberação de açúcares, inicialmente testou-se os resíduos separadamente em dois tempos de autoclave, 40 min e 60 min, estes tempos de autoclavagem já foram indicados por Hickert (2011) e Cassales (2010) para resíduos lignocelulósicos com composição semelhante, em três concentrações de ácido sulfúrico, 1 %, 2 % e 3 %, na relação sólido/líquido 1/10 em de frasco de

erlenmeyer de 3 L. Após, testou-se a mistura de 50 % de casca de aveia e 50 % de casca de soja, também na relação 1/10 nas condições de 1% , 2 % e 3 % de ácido sulfúrico em 40 min de autoclave . O hidrolisado resultante teve sua caracterização de açúcares, ácido acético, furfural e hidoximetilfurfural por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HLPC) e pressão osmótica por osmômetro.

#### **4.4.2 Hidrólise enzimática da mistura de casca de aveia e soja e obtenção do hidrolisados enzimático**

O sólido resultante do tratamento ácido foi lavado em água corrente até o pH atingir a neutralidade (7,0). Para a hidrólise da fração celulose foram testadas a ação de duas enzimas, o extrato do fungo *Penicillium echinulatum* S1M29, descrito em Dillon *et al.* 2011, e a enzima comercial *Novozymes CELLUCLAST*® 1.5L (laudo detalhado disponível no anexo 1). O sobrenadante foi incubado em frasco de erlenmeyer de 2 L em agitador orbital a 50 °C e 120 rpm, na relação sólido/líquido de 1/20, utilizando o tampão de citrato de sódio 0,1 M. Testou-se três concentrações enzimáticas por grama seca de resíduo: 10,15, e 20 FPU g<sup>-1</sup>. A liberação dos açúcares foi monitorada a cada 24 h durante 120 h e quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

#### **4.5 Manutenções e inóculo**

As leveduras foram conservadas em estoque de glicerol em ultrafreezer a - 80 C°, também foram mantidas em estrias em placas de meio YP (1 % de extrato de levedura e 2 % de peptona) com 2 % de glicose. Dois meios líquidos foram usados para o preparo do inóculo, uma contendo o meio basal YP com 2

% de glicose e outro com o meio basal YP e 2 % de xilose. Em ambos, os açúcares eram autoclavados separadamente. As colônias foram retiradas da placa e colocadas no meio líquido para o preparo dos pré-inóculos em frascos com 100 mL de meio, e cultivadas em agitador orbital (Marconi , MA 830, Brasil) a 180 rpm e 28 °C por 24 h. Em seguida as células eram recolhidas por centrifugação a 3.000 g por 15 min. O *pellet* formado foi lavado com solução salina e ressuspensão diretamente no mesmo meio de fermentação. Os inóculos dos cultivos foram padronizados para que a suspensão celular atingisse densidade ótica igual a 1,0. O volume do inóculo perfazia 10 % do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados no experimento.

#### **4.6 Meios sintéticos e hidrolisados**

##### **4.6.1 Meio sintético**

Foram realizados ensaios de fermentação em meio sintético de solução de açúcares, simulando as concentrações dos hidrolisados de biomassas, porém com menor pressão osmótica e ausência de compostos inibidores da fermentação. Os meios sintéticos utilizados nos ensaios foram denominados G<sub>20</sub>X<sub>30</sub> e X<sub>30</sub>. O meio G<sub>20</sub>X<sub>30</sub> composto por (em g L<sup>-1</sup>): 20 de glicose e 30 de xilose, já o meio X<sub>30</sub> era composto por 30 g L<sup>-1</sup> de xilose, ambos suplementados com o meio basal YP (1 % de extrato de levedura e 2 % de peptona) que era autoclavado separadamente da solução de açúcares.

##### **4.6.2 Hidrolisado resultante do tratamento ácido.**

O hidrolisado ácido obtido do pré-tratamento das cascas de aveia e soja com 1 % de ácido sulfúrico em 40 min de autoclave foi concentrado por

rotaevaporação a vácuo até atingir a concentração aproximada de 30 g L<sup>-1</sup> de xilose, 60 g L<sup>-1</sup> de xilose. O pH foi corrigido com NaOH até atingir 5,5 e o hidrolisado foi centrifugado 3000 g para a deposição dos sólidos e armazenado a 2 °C.

#### **4.6.3 Hidrolisado resultante do tratamento enzimático**

O hidrolisado enzimático foi obtido pelo uso da enzima CELLUCLAST<sup>®</sup> 1.5L na carga enzimática de 15 FPU g<sup>-1</sup> incubado a 50 °C por 96 h. O caldo resultante foi concentrado por rotaevaporação a vácuo até atingir 60 g L<sup>-1</sup>, o pH foi corrigido com NaOH até atingir 5,5 e o hidrolisado foi centrifugado a 3000 g para a deposição dos sólidos e armazenado a 2 °C.

#### **4.6.4 Mistura de hidrolisados ácido e enzimático**

Misturou-se os hidrolisados ácido e enzimático concentrados obtendo um caldo com concentração equivalente de glicose e xilose (30 g L<sup>-1</sup> de glicose e 30 g L<sup>-1</sup> de xilose).

### **4.7 Ensaio de fermentação**

#### **4.7.1 Fermentação de meio sintético por *S. cerevisiae* recombinante em agitador orbital**

Com o objetivo de estudar o metabolismo das linhagens recombinantes *S. cerevisiae* YRH 396 E YRH 400 em meio sintético de açúcares simulando a concentração dos açúcares da biomassa lignocelulósica hidrolisada, realizou-se testes em frasco agitado (Marconi MA 830, Brasil) com meio sintéticos G<sub>20</sub>X<sub>20</sub> e X<sub>30</sub> suplementado com o meio basal em anaerobiose em frasco de

erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura que foi vedado por rolha de silicone. O consumo de açúcares e formação de produtos foi monitorado a cada 12 h por 96 h sacrificando uma duplicata de frasco de erlenmeyer a cada ponto. Todos os ensaios foram conduzidos na temperatura de 28 °C e 180 rpm de rotação. Uma alíquota de 10 mL era utilizada em cada amostragem para avaliar a concentração celular por peso seco, após 1 ml era retirado e acondicionado para avaliar o consumo de açúcares e formação de produtos por HPLC, o líquido restante era descartado.

#### **4.7.2 Fermentação de hidrolisado ácido e enzimático por *S. cerevisiae* recombinante em agitador orbital**

As leveduras foram testadas fermentando o hidrolisado ácido e enzimático e a mistura destes na condição de anaerobiose com a mesma metodologia descrita nos ensaios de fermentação de meio sintético. Também foram realizados testes em uma condição mais moderada de oxigenação dos meios simulando uma microaerofilia para verificar se ocorria maior produção de xilitol, neste caso, os frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio de cultura foram vedados com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio. Todos os ensaios foram conduzidos na temperatura de 28 °C e 180 rpm de rotação.

#### **4.7.3 Fermentação de hidrolisado ácido e enzimático por *S. cerevisiae* recombinante em biorreator**

Os ensaios de fermentação dos hidrolisados ácido e enzimático e a mistura destes foi realizado em biorreator de cultivo submerso (Biostat B model, Braum Biotech International, Alemanha) contendo 1 L de hidrolisado

com pH controlado pela adição de controlado pela adição de NaOH e HCl, ambos a 1 M. Os ensaios foram realizados na temperatura de 28 ° C e agitação de 180 rpm para os cultivos em anaerobiose, no caso do cultivo em biorreator com oxigenação utilizou-se a aeração de 1 vvm com agitação de 300 rpm visando a melhor transferência de oxigênio para os meios de cultura.

#### **4.7.4 Ensaios em agitador orbital e em biorreator submerso com as espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae***

Os ensaios de fermentação com *S. girioi* e *S. hagerdaliae* de meio sintético e hidrolisado ácido seguiram a mesma metodologia descrita nos itens 4.8.1, 4.8.2 e 4.8.3.

### **4.8 Métodos analíticos**

#### **4.8.1 Determinação das concentrações celulares**

Para o preparo do inóculo, foi adotado o método de espectrofotometria. As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotometro (Ultrospec 3100 pro) no comprimento de onda de 600 nm. A avaliação do crescimento celular (células mL<sup>-1</sup>) dos experimentos realizados em frasco agitado com meio sintético foi feito por biomassa seca utilizando estufa a 75 °C até obter o peso constante. A avaliação celular (células mL<sup>-1</sup>) nos experimentos realizados em frasco agitado e biorreator com hidrolisado foi determinado através do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), através da diluição seriada em solução salina (1% de NaCl).

#### **4.8.2 Determinações da concentração de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético**

Os teores de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético foram determinados por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), em equipamento Shimadzu, empregando coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45 °C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mM) como eluente, com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e detector de índice de refração. O volume de amostras injetadas foi de 20 microlitros. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro Sep-Pack C18 (Millipore).

#### **4.8.3 Determinações da concentração de furfural e hidroximetilfurfural**

As concentrações de furfural e HMF foram determinadas por HPLC com coluna Nucleosil C18 mantida a 25 °C ; detector ultravioleta / visível SPD M20A a 276 nm tendo acetonitrila e água na proporção (2:8) com 1 % de ácido acético como eluente em fluxo de 1,1 mL min<sup>-1</sup>. O volume de amostras injetada foi de 20 microlitros. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ME25 com 0.45 mL e D13 mm.

#### **4.8.4 Determinação de pH e Pressão osmótica**

O pH foi determinado por potenciômetro (PHTEK, PHS 3B) e a pressão osmótica foi determinada em osmômetro (VAPRO 5520)



#### 4.9 Determinação de Parâmetros Fermentativos e de Hidrólise

A conversão de açúcares em produtos ( $Y_{p/s}$  g g<sup>-1</sup>) e a eficiência de hidrólise ( $\eta$ , %) foram calculadas pelas equações (4) e (5):

$$YS = (CV / M) \times 100 \quad (4)$$

$$\eta = (YS / Y_{\max}) \times 100 \quad (5)$$

Onde:  $C$  = concentração dos componentes da fase líquida (g L<sup>-1</sup>);

$M$  = massa seca de casca de soja e aveia utilizada no experimento (g);

$V$  = volume da solução líquida (L);

$Y_{\max}$  = conversão máxima de açúcares (g por 100 g matéria seca).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química da casca de aveia e da casca de soja

A Tabela 2 demonstra a composição de celulose, hemicelulose e lignina da casca de aveia utilizada neste trabalho e comparada com os resultados de composição mostrados em outros trabalhos com resíduos lignocelulósicos.

**Tabela 2. Composição da casca de aveia obtida neste trabalho e comparada com a composição de outros resíduos lignocelulósicos.**

Resíduo	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Lignocelulósico	(%)	(%)	Total (%)	Referência Bibliográfica
Casca de aveia	32	26	34	Este trabalho
Casca de aveia	26	28	22	Tamanini <i>et al.</i> , 2004
Casca de arroz	34	13	29	Hickert, 2011
Bagaço-da-cana	39	26	24	Laser <i>et al.</i> , 2002
Palha de trigo	31	26	24	Canilha, <i>et al.</i> , 2006
Palha de arroz	39	26	24	Roberto <i>et al.</i> , 2003

O teor de hemicelulose para a casca de aveia encontrados neste trabalho foi semelhante ao encontrado por Tamanini *et al.*,(2004) porém os teores de celulose e lignina foram superiores, pois são influenciados por várias características como as condições edafoclimáticas de cultivo, a maturidade na colheita e a cultivar plantada.

Com o uso de outra metodologia, que consiste na utilização de enzimas e diferentes soluções de extração para separar as frações de celulose, hemicelulose, lignina e substâncias pécticas insolúveis, Claye *et al*, (1995) obtiveram os seguintes resultados para a composição da casca de aveia em percentagem: celulose (48,09), hemicelulose (29,45), lignina (6,53), substâncias pécticas insolúveis (3,98) e cinzas (3,50). O teor de hemicelulose mostrado por Claye e autores, foi semelhante ao obtido neste trabalho, o teor de celulose foi superior e o de lignina inferior. Esta diferença pode estar relacionada, além dos fatores discutidos, ao uso de outra metodologia. Quando comparado com outros resíduos lignocelulósicos, o teor de hemicelulose da casca de aveia é semelhante ao do bagaço-da-cana e palha de trigo e muito maior que o da casca de arroz. Quanto ao teor de celulose ele é inferior ao da palha de arroz e do bagaço-da-cana.

A casca de aveia possui um elevado teor de lignina, o que após a hidrólise ácida diluída, poderá gerar o aparecimento de compostos fenólicos oriundos da degradação desta molécula, que são inibidores dos processos fermentativos e prejudicarão a fermentação dos açúcares em etanol.

Também foi realizada a análise da composição química da casca de soja, a Tabela 3 mostra a composição de celulose, hemicelulose e lignina obtida neste trabalho e está comparada com outros resultados de composição química para o mesmo resíduo mostrado em outros estudos.

**Tabela 3 Composição da casca de soja obtidas neste trabalho e comparada com outras referências**

<b>Resíduo</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Lignina</b>	
<b>Lignocelulósico</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>Total</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
			<b>(%)</b>	
Casca de soja	39	24	12	Este trabalho
Casca de soja	40	25	9	Cassales <i>et al.</i> , 2011
Casca de soja	51	16	ND	Miron <i>et al.</i> , 2001
Casca de soja	36	12	18	Corredor <i>et al.</i> , 2006
Casca de soja	38	10	2.8	Mielenz <i>et al.</i> , 2009

O fato de a casca de soja possuir um baixo teor de lignina quando comparada com os outros resíduos a torna um bom substrato para a produção de etanol de segunda geração, o baixo teor de lignina facilita o processo de hidrólise ácida diluída, uma vez que torna a celulose e a hemicelulose mais disponível ao ataque de ácidos e diminui a quantidade de produtos tóxicos da degradação da lignina (Cassales *et al.*, 2011).

A composição de monômeros de açúcares presentes na fração de celulose e hemicelulose da casca de aveia e da casca de soja utilizada neste trabalho é mostrada na Tabela 4. Glicose é o principal açúcar da casca de aveia seguido por xilose e arabinose, como na maioria dos resíduos lignocelulósicos (Howard *et al.*, 2003).

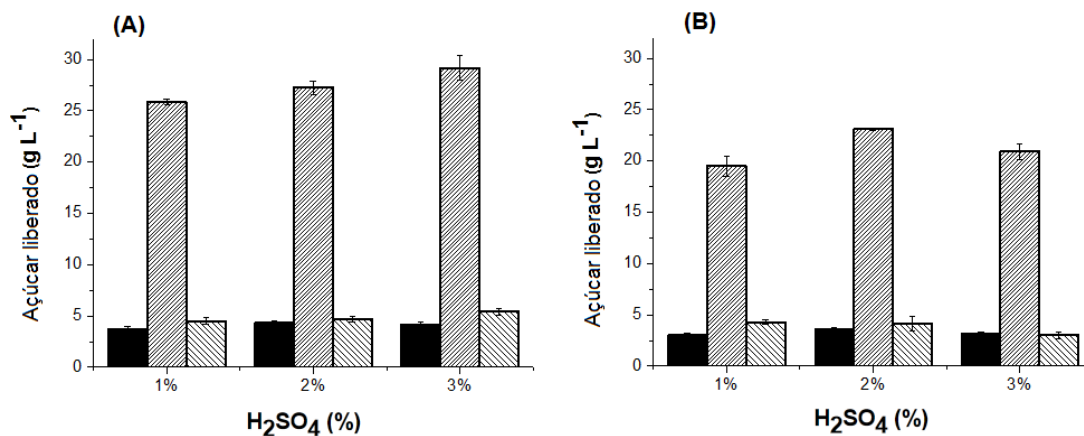
**Tabela 4. Composição de açúcares da casca de aveia e da casca de soja obtida neste trabalho.**

<b>Açúcar</b>	<b>% Composição Total</b>	
	<b>Casca de aveia</b>	<b>Casca de soja</b>
Glicose	31,95	38,95
Xilose	21,43	19,05
Arabinose	4,39	5,08

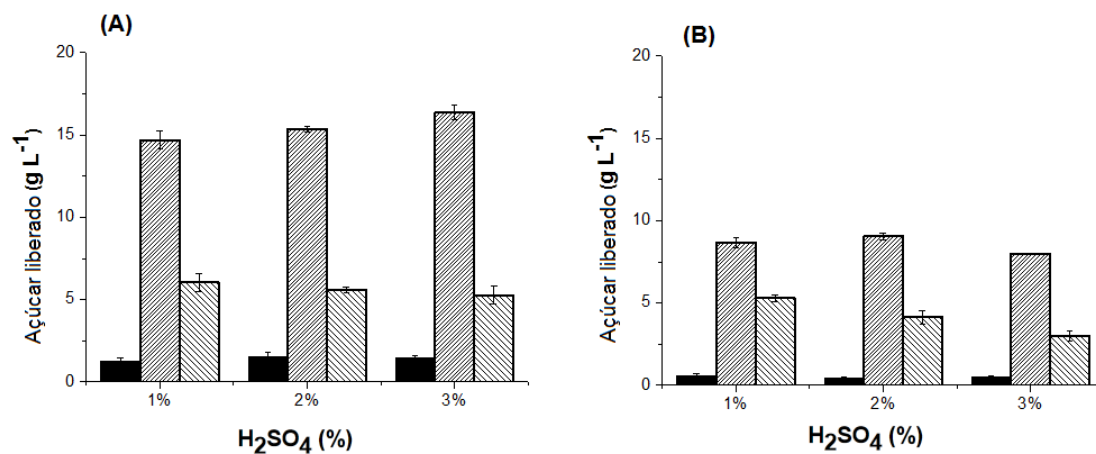
## **5.2 Hidrólise ácida diluída**

### **5.2.1 Avaliação da liberação de açúcares da casca de aveia e casca de soja**

A hidrólise ácida diluída da casca de soja e da casca de arroz foi otimizada por Cassales (2010) e Hickert (2011), que determinaram que os tempos de 40 e 60 minutos de autoclave a 121 ° C são aqueles onde ocorrem a maior probabilidade de liberação de açúcares e menor degradação destes. Estes resíduos possuem composição semelhante à da casca de soja e à casca de aveia deste trabalho, então testou-se estes tempos de autoclave nos resíduos separadamente para verificar a liberação individual de açúcares. A liberação dos açúcares em 40 e 60 minutos de autoclave, na presença de catalizador ácido pode ser visualizada Figura 9 para a casca de aveia e na Figura 10 para a casca de soja.



**Figura 9. Liberação de glicose, xilose e arabinose da casca de aveia em 40 minutos de autoclave (A) e 60 minutos de autoclave (B) a 121 ° C e 1,1 atm na condição de 1 % , 2 % e 3% de ácido sulfúrico (V/V) .** ■ Glucose ▨ Xilose ▩ Arabinose



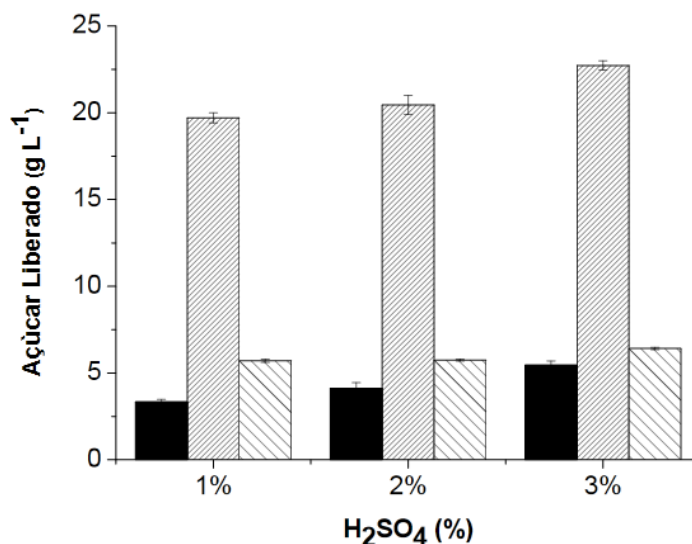
**Figura 10. Liberação de glicose, xilose e arabinose da casca de soja em 40 minutos de autoclave (A) e 60 minutos de autoclave (b) a 121 ° C na condição de 1 % , 2 % e 3% de ácido sulfúrico (V/V)** ■ Glucose ▨ Xilose ▩ Arabinose

O tempo de 40 minutos de autoclave mostrou-se mais favorável, pois ocorreu maior liberação de pentoses e hexoses. Observa-se que no tempo de 60 minutos ocorre degradação de todos os açúcares dos dois resíduos, tendo possivelmente ocorrido formação de produtos da degradação como furfural e HMF. Os trabalhos de Schirmer-Michel (2008) também demonstram que o tratamento ácido diluído foi eficiente na solubilização da fração de hemicelulose da casca de soja. Nos processos de hidrólise ácida diluída, a fração de hemicelulose é mais facilmente despolarizada em temperaturas mais baixas do que as empregadas nos processos de liberação da fração de celulose (Karin *et al.*, 2006). A hidrólise em altas temperaturas pode gerar inibidores dos processos fermentativos como ácidos fracos, compostos fenólicos e furanos (furfural e HMF), sendo que os dois últimos são formados pela desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente (Taherzadeh, 1999).

### **5.2.2 Avaliação da liberação de açúcares da mistura casca de aveia e casca de soja**

Misturou-se 50 % de casca de soja e 50 % de casca de aveia para a obtenção do hidrolisado final para posterior fermentação. O tempo de 40 min de autoclave a 121 ° C e 1,1 atm de pressão foi fixado para a hidrólise ácida diluída da mistura de casca de aveia e casca de soja, já que houve melhor a liberação individual de açúcares nesta condição. Esta mistura foi testada variando a concentrações de ácido sulfúrico em 1%, 2 % e 3 %, na relação sólido/líquido 1/10. A liberação dos três açúcares (glicose, xilose e arabinose) pode ser visualizada na figura 11.





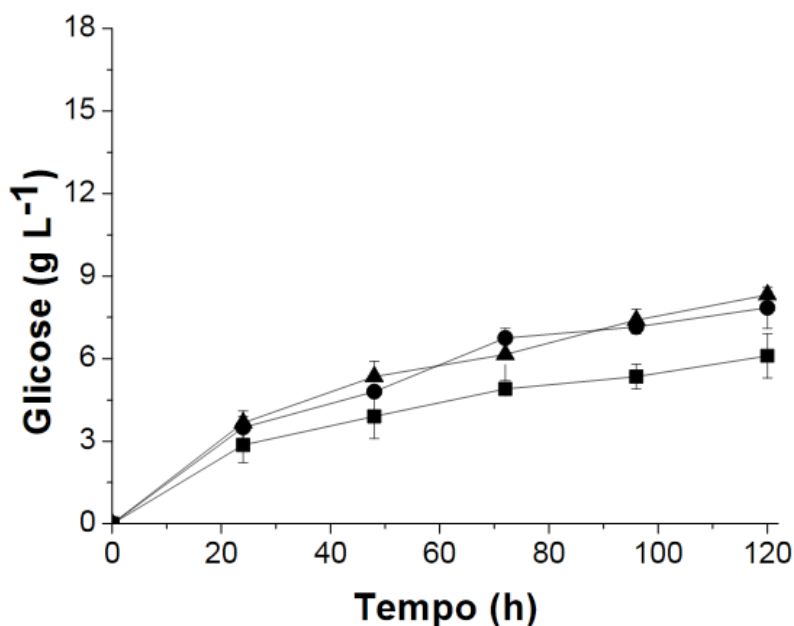
**Figura 11. Liberação de glicose, xilose e arabinose variando a concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 1 %, 2 % e 3 % (V/V) da mistura de casca de aveia e casca de soja. ■ Glicose ▨ Xilose ▩ Arabinose**

À medida que houve o aumento da concentração de ácido ocorreu uma liberação maior dos três açúcares, porém esta liberação não foi proporcional ao gasto de ácido usado na hidrólise, além de que, um aumento na concentração de ácido pode gerar um aumento na formação de furfural, HMF e ácido acético (Cassales *et al.*, 2011) Por isso, para a obtenção dos hidrolisados ácido da mistura de casca de aveia e casca de soja para os ensaios de fermentação optou-se por fixar a condição de 1 % de ácido na hidrólise por 40 minutos.

### **5.3 Sacarificação da fração de celulose da mistura de casca de aveia e casca de soja**

Após os resíduos lignocelulósicos serem submetidos a um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a fração de hemicelulose, é necessário que a celulose passe por um tratamento específico para a obtenção de glicose (Ojeda e Petry, 2010).

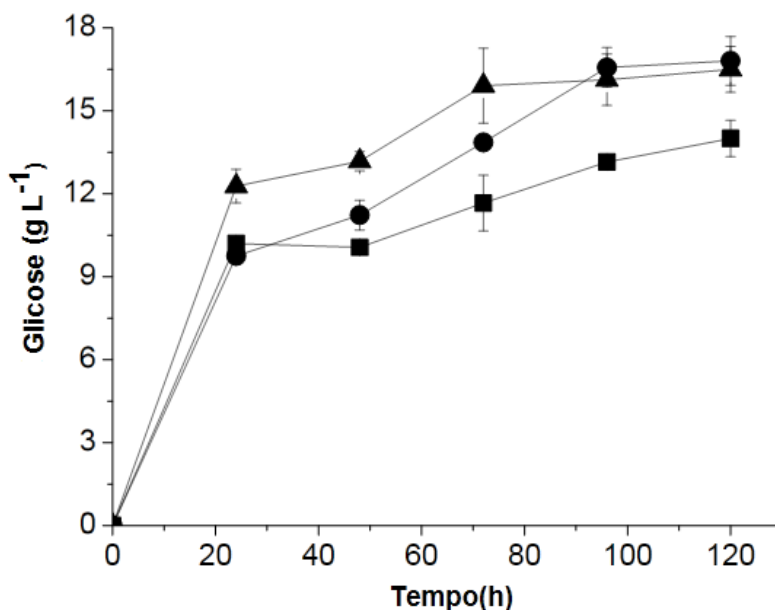
Para a hidrólise da fração celulose, testou-se o extrato do fungo *Penicillium echinulatum*, sendo este extrato obtido utilizando um mutante da linhagem 9A02S1 resultando em alta produção de celulasas (Dilon *et al.*, 2011). A linhagem mutante recebeu a denominação de S1M29. Este extrato já foi testado por Hickert *et al.*, (2013) na casca de soja pós hidrólise ácida e com resultados de liberação de até 72 % da glicose e celobiose presente na fração de celulose. Para estes autores, houve pouco acúmulo de celobiose, o que demonstra a eficiência do complexo endoglúcanases e  $\beta$ -glicosidase para a hidrólise completa da celulose. A cinética de liberação ao longo de 120 h em três concentrações enzimáticas por grama de resíduo (FPU g<sup>-1</sup>), da mistura de casca de aveia e soja, pode ser visualizada na Figura 12.



**Figura12. Liberação de glicose pelo extrato do fungo *Penicillium echinulatum* S1M29 em três concentrações de enzima por massa seca da mistura de casca de aveia e casca de soja. ■ 10 FPU g<sup>-1</sup>, ● 15 FPU g<sup>-1</sup>, ▲ 20 FPU g<sup>-1</sup>.**

Complexos de celulase comercialmente disponíveis, em geral, contendo baixos níveis de  $\beta$ -glicosidase levam a uma hidrólise de celulose incompleta, libertando celobiose no meio, que não pode ser metabolizado por leveduras industriais fermentadoras de glicose, afetando assim as conversões ao etanol (Hickert *et al.*, 2013). No caso deste extrato de *Penicillium echinulatum* S1M29, houve uma liberação significativa de glicose da mistura casca de soja e aveia, considerando a baixa purificação da enzima e com pouca permanência de celobiose no meio, variando de 3,3 g L<sup>-1</sup> até 1,2 g L<sup>-1</sup>. Houve pouca diferença de liberação de glicose principalmente, entre as cargas de 15 FPU g L<sup>-1</sup> e 20 FPU g L<sup>-1</sup> nos tempos finais da cinética, a partir de 72 horas, sendo os mais indicados para a finalização do processo de hidrólise.

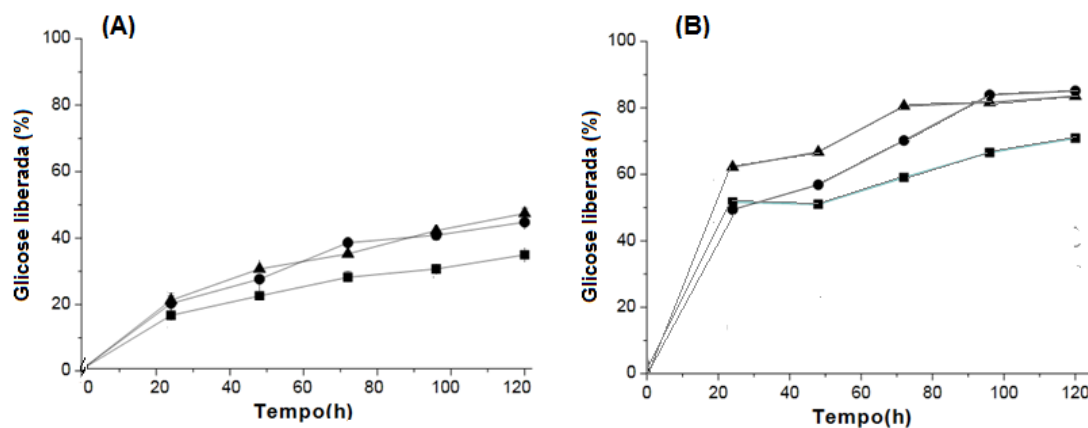
Testou-se também a enzima comercial *Novozymes CELLUCLAST 1.5*® neste mesmo resíduo. Esta enzima é amplamente descrita na literatura mundial como eficiente na liberação de glicose da fração de celulose, contendo complexos enzimáticos de endoglucanases e  $\beta$ -glicosidase, com eficiência completa de conversão da celulose. As características da enzima especificadas pelo fabricante encontram-se no Anexo 1, sendo esta uma celulase ativa do fungo *Trichoderma reesei* (Ojeda e Petry, 2010). Segundo estes autores, a enzima deste fungo possui no mínimo cinco endoglucanases e duas  $\beta$ -glicosidades. Nos testes realizados neste trabalho, investigaram-se três concentrações enzimáticas ( $\text{FPU g}^{-1}$ ) da enzima por grama de resíduo seco recuperado pós hidrólise ácida e a liberação de açúcares foi monitorada por 120 h (Figura 13).



**Figura 13. Liberação de glicose pela enzima Novozymes CELLUCLAST 1.5**  
 ® em três concentrações de enzima por massa seca da mistura  
 de casca de aveia e casca de soja. ■ 10 FPU g<sup>-1</sup>, ● 15 FPU  
 g<sup>-1</sup>, ▲ 20 FPU g<sup>-1</sup>.

A carga de 15 FPU g<sup>-1</sup> demonstrou mais vantajosa na relação gasto de enzima e liberação de glicose para a enzima CELLUCLAST 1.5 L<sup>®</sup>. Embora com a carga de 20 FPU g<sup>-1</sup> ocorra uma liberação inicial maior de glicose esta se equivale à carga de 15 FPU g<sup>-1</sup> no final da cinética (aproximadamente 17 g L<sup>-1</sup>). A liberação inicial maior de glicose e uma diminuição crescente ao longo do tempo de cinética também é mostrado por Hongming e Zhu (2011) o que é explicado pela inibição da atividade da celulase pela glicose. Ao longo da cinética, baixa concentração de celobiose foi observada (< 2 g L<sup>-1</sup>), o que demonstra a sinergia do complexo endoglucanases e β-glicosidase. O tempo de 96 h é o mais indicado para a finalização do processo de hidrólise, já que não houve diferença de liberação de açúcar a partir deste tempo para as cargas de 15 FPU g<sup>-1</sup> e 20 FPU g<sup>-1</sup>.

Embora Martins *et al.*, (2008) relatararem que a atividade de  $\beta$ -glicosidase é maior em complexos de celulase produzidos por fungos do gênero *Penicillium*, na comparação com *Trichoderma*, a enzima CELLUCLAST 1.5<sup>®</sup> mostrou-se um complexo purificado possivelmente, por isso apresenta alta eficiência. A Figura 14 mostra a comparação de eficiência de hidrólise do extrato de *Penicillium echinulatum* S1M29 e da enzima *Novozymes CELLUCLAST 1.5<sup>®</sup>* considerando a média de composição de glicose da mistura de casca de aveia e casca de soja.



**Figura 14. Eficiência de hidrólise do extrato de *Penicillium echinulatum* S1M29 (A) e da enzima Novozymes CELLUCLAST 1.5<sup>®</sup> (B) ■ 10 FPU g<sup>-1</sup>, ● 15 FPU g<sup>-1</sup>, ▲ 20 FPU g<sup>-1</sup>.**

Apesar de o extrato de *P. echinulatum* mostrar resultados interessantes, a enzima CELLUCLAST 1.5<sup>®</sup> foi escolhida para a obtenção do hidrolisado para a fermentação na carga de 15 FPU g<sup>-1</sup>, devido a maior eficiência de hidrólise da fração de celulose e conseqüentemente maior liberação de glicose.

#### **5.4 Caracterizações dos hidrolisados da mistura de casca de aveia e soja**

A Tabela 6 mostra a caracterização dos hidrolisados utilizados nos ensaios de fermentação em agitador orbital e em biorreator. Os hidrolisados I, II e V são caldos resultantes do tratamento ácido, sendo a xilose o açúcar predominante. O hidrolisado III é um hidrolisado resultante do tratamento enzimático, sendo a glicose o açúcar predominante e o hidrolisado IV é a mistura dos caldos resultantes do tratamento ácido e enzimático com concentração equivalente de glicose e xilose. As pressões osmóticas são altas, consequência do processo de concentração do hidrolisado (Zhão E Bai, 2009). As concentrações de furfural e HMF são semelhantes as do hidrolisado da casca de arroz reportado no trabalho de Zahed *et al.* (2015) e as do hidrolisado de sabugo de milho mostradas na pesquisa de Cheng *et al.*, (2014). A baixa concentração de furfural pode ser explicada pelo fato de que este composto pode ser volatilizado durante o processo de concentração do hidrolisado (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000).

**Tabela 5. Caracterização dos hidrolisados testados nos ensaios de fermentação em agitador orbital e em biorreator**

<b>Hidrolisado</b>	<b>Glicose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Xilose (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ácido acético (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pressão osmótica ( Osm kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Furfural (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>HMF (g L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Hidrolisado I</b>	3,2±0,2	28,3±1,1	1.0±0,3	1385±29	0,081±0,002	0,27±0,03
<b>Hidrolisado II</b>	5,4±0,8	57,1±2,1	2,4±0,5	3645±57	0,19±0,01	0,47±0,02
<b>Hidrolisado III</b>	60,1±2,0	18,0±2,2	0,7±0,1	2235±21	0,006±0,001	0,38±0,04
<b>Hidrolisado IV</b>	28,1±1,7	30,4±1,9	1,3±0,1	1987±69	0,07±0,01	0,37±0,06
<b>Hidrolisado IV</b>	7,0±0,8	80,1±4,8	3,1±0,2	>4000	NQ	NQ

Valores representam as concentrações no tempo zero (concentração inicial)

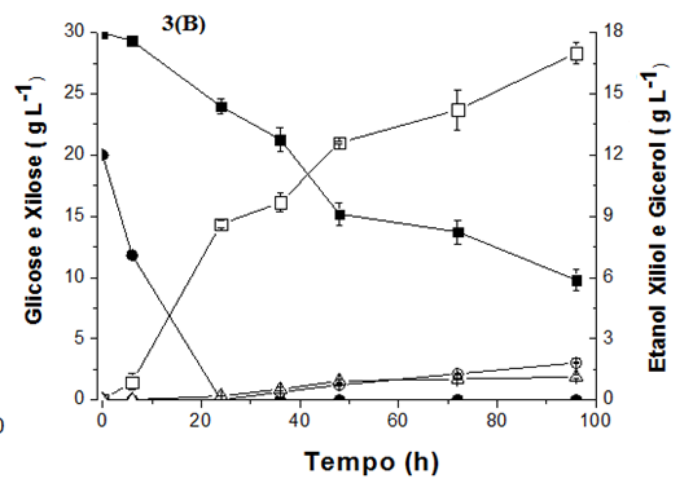
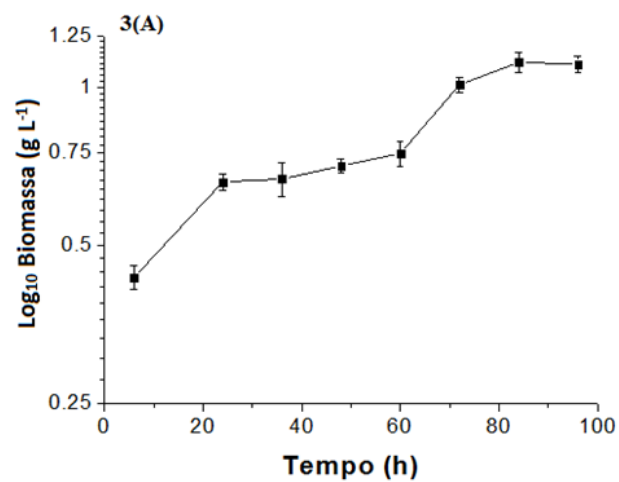
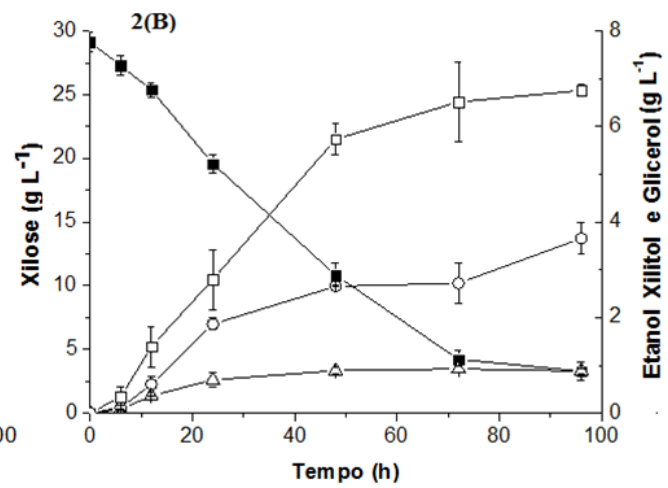
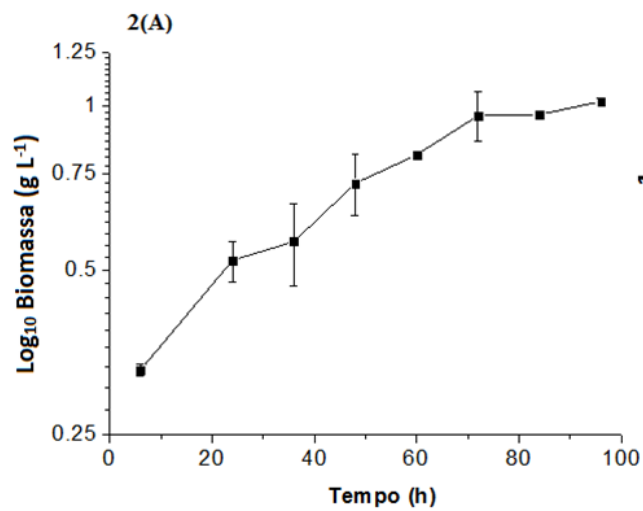
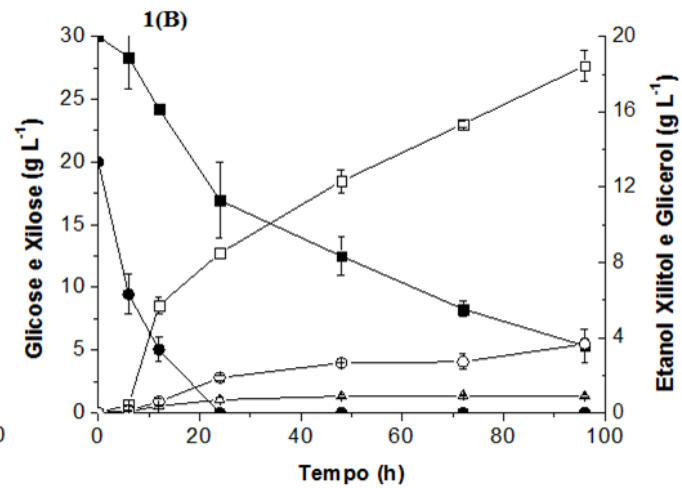
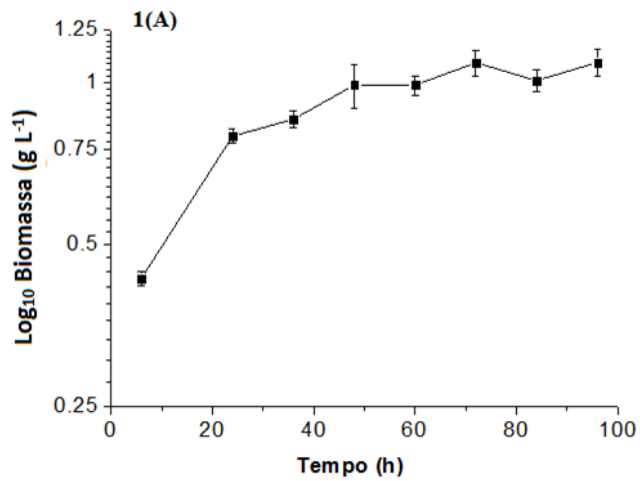
NQ- não quantificado

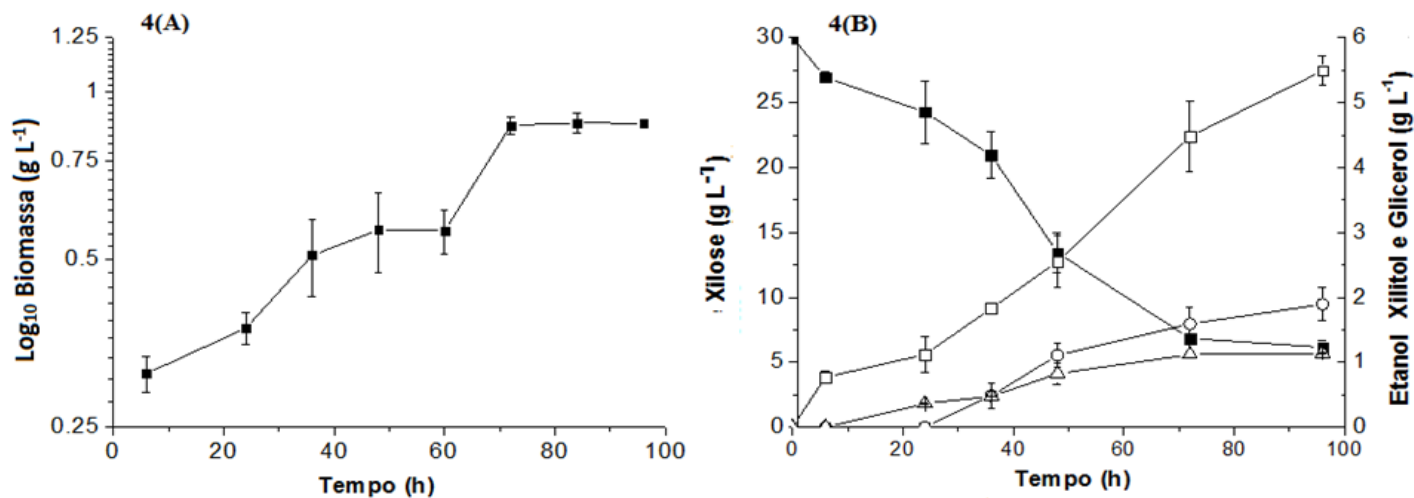


### **5.5 Avaliação da capacidade de conversão de pentoses e hexoses pelas linhagens recombinantes *S. cerevisiae* YRH 396 e YRH 400**

As linhagens recombinantes *S. cerevisiae* YRH 396 e YRH 400, com integração cromossômica dos genes de metabolismo da xilose, foram inicialmente testadas em agitador orbital fermentando uma solução sintética de açúcares suplementada com o meio YP. Os meios denominados X<sub>30</sub> e G<sub>20</sub>X<sub>30</sub> possuem menor pressão osmótica (402 e 697 mOsm kg<sup>-1</sup>) que os hidrolisados de casca de aveia e soja (> 1000 mOsm kg<sup>-1</sup>) e ausência de compostos inibidores da fermentação oriundos da hidrólise de resíduos lignocelulósicos em altas temperaturas.

Testou-se uma condição de anaerobiose, esta condição é a fisiologicamente mais favorável à produção de etanol por *S. cerevisiae* e estas linhagens recombinantes já haviam sido testadas por Hector *et al.*, (2011), nesta condição de oxigenação. O crescimento celular (g L<sup>-1</sup>) e a cinética de consumo de açúcares e formação de metabólitos podem ser visualizados na Figura 15.





**Figura 15. Crescimento celular (A) e cinética de consumo de açúcares e formação de metabólitos (B) pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* fermentando meio sintético em agitador orbital. Crescimento celular (g L<sup>-1</sup>) (1) YRH 396 G20X30 (2) YRH 396 X30 (3) YRH 400 (●) Glicose, (■) xilose, (□) etanol (○) xilitol e (Δ) glicerol.**

A fermentação da xilose e a co-fermentação da mistura de glicose e xilose realizadas em anaerobiose demonstram a capacidade de ambas as linhagens de fermentarem os açúcares, xilose e glicose, em etanol. No caso do meio contendo glicose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e xilose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) as linhagens YRH 396 e YRH 400 apresentaram valores de  $Y_{p/s}$  de  $0,41 \text{ gg}^{-1}$  e  $0,42 \text{ gg}^{-1}$  respectivamente. A linhagem YRH 396 apresentou um crescimento maior em biomassa e uma maior produção de xilitol quando comparada com a YRH 400. Em ambas as linhagens uma assimilação lenta de xilose ocorreu enquanto a glicose estava presente no meio. Em geral, glicose, manose e xilose compartilham os mesmos transportadores inespecíficos e os sistemas de transporte ativo são reprimidos tanto pela glicose como por altas concentrações de substrato (Gírio *et al.* 2010), a glicose foi totalmente fermentada nas 24 horas iniciais de cultivo.

Para a fermentação do meio com somente xilose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono as linhagens YRH 396 e YRH 400 apresentaram  $Y_{p/s}$  de  $0,25 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,23 \text{ g g}^{-1}$ , respectivamente. Hector *et al.*, (2011) reportou valores de  $0,27 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,23 \text{ g g}^{-1}$  para as mesmas linhagens, em um meio com  $50 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. A pequena diferença nos parâmetros cinéticos pode estar relacionada à concentração inicial de açúcares. A concentração de xilitol no meio indica que a rota de produção de etanol deve ter sido reprimida, desta forma o xilitol foi excretado para fora da célula, o que pode ser relacionado a um desequilíbrio redox ou a diferentes atividades enzimáticas.

A capacidade das linhagens em metabolizar xilose já havia sido demonstrada por Hector *et al.*, (2011) e comprovada neste experimento. Arabinose, açúcar liberado pelas biomassas hidrolisadas, é incapaz de ser

metabolizado por linhagens selvagens de *S. cerevisiae* (Da Cunha Pereira *et al.*, 2011). Neste estudo, as linhagens recombinantes foram testadas em um meio contendo glicose, xilose e arabinose e em outro contendo somente arabinose ambos suplementados com YP. Em nenhum destes meios houve consumo de arabinose e formação de etanol, o que demonstra a ausência de vias metabólicas para a fermentação deste açúcar, ou ao fato destas vias de metabolismo serem pouco expressas.

#### **5.6 Ensaio em agitador orbital com as linhagens recombinantes *S. cerevisiae* YRH 396 e YRH 400 fermentando hidrolisados da mistura casca de aveia e soja**

As linhagens recombinantes YRH 396 e YRH 400 foram testadas em agitador orbital nos hidrolisados I, II, III, e IV com diferentes concentrações de açúcar visando avaliar a capacidade de bioconversão de açúcares em etanol e xilitol, bem como a adaptação a estes meios de cultivo. Testou-se a condição de anaerobiose para induzir a produção de etanol e uma condição de oxigenação limitada, que seria determinante para o maior consumo de xilose e equilíbrio dos cofatores (Hou, 2009). Os resultados estão apresentados na Tabela 6 e Tabela 7.

**Tabela 6. Parâmetros cinéticos da linhagem *S. cerevisiae* YRH 396 fermentando diferentes hidrolisados da mistura de casca de aveia e casca de soja em anaerobiose e oxigênio limitado.**

Aeração	Hidr.	Linhagem	Glicose Consumida (%)	Xilose Consumida (%)	Etanol Máximo (g L <sup>-1</sup> )	Xilitol Máximo (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> ET (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> XIL (g g <sup>-1</sup> )	Células Viáveis (UFC mL <sup>-1</sup> )
<b>Anaerobiose</b>	I	YRH 396	100	71,2 ± 4,5	5,4±0,4	1,92±0,05	0,23	0,03	0,09	10 <sup>5</sup>
	II	YRH 396	0	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	III	YRH 396	100	20,2±2,6	24,2±,2,1	0	0,38	0,10	-----	10 <sup>7</sup>
	IV	YRH 396	100	29,1±2,8	15,6±1,1	0	0,41	0,07	-----	10 <sup>7</sup>
<b>Oxigênio Limitado</b>	I	YRH 396	100	83,2±3,1	2,8±0,3	10,6±1,3	0,10	0,04	0,43	10 <sup>6</sup>
	II	YRH 396	0	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	III	YRH 396	100	29,3±0,8	18,9±0,6	2,1 ± 0,2	0,29	0,10	0,45	10 <sup>8</sup>
	IV	YRH 396	100	46,0± 3,0	11,7±0,8	3,2±0,6	0,27	0,08	0,22	10 <sup>8</sup>

**Tabela 7. Parâmetros cinéticos da linhagem *S. cerevisiae* YRH 400 fermentando diferentes hidrolisados da mistura de casca de aveia e casca de soja em anaerobiose e oxigênio limitado**

Aeração	Hidr.	Linhagem	Glicose Consumida (%)	Xilose Consumida (%)	Etanol Máximo (g L <sup>-1</sup> )	Xilitol Máximo (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> ET (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> XIL (g g <sup>-1</sup> )	Células Viáveis (UFC mL <sup>-1</sup> )
<b>Anaerobiose</b>	I	YRH 400	100	60,4±2,4	4,8±0,3	2,09±0,06	0,23	0,03	0,12	10 <sup>5</sup>
	II	YRH 400	0	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	III	YRH 400	100	12,0 ±1,6	19,8±0,8	-----	0,32	0,07	-----	10 <sup>7</sup>
	IV	YRH 400	100	23,1±2,0	13,0±0,5	-----	0,34	0,04	-----	10 <sup>7</sup>
<b>Oxigênio Limitado</b>	I	YRH 400	100	66,5±3,9	2,3±0,4	7,7 ±0,5	0,11	0,03	0,41	10 <sup>5</sup>
	II	YRH 400	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	III	YRH 400	100	20,3±2,6	15,1± 0,4	2,0±0,1	0,23	0,08	0,57	10 <sup>8</sup>
	IV	YRH 400	100	38,6±1,3	11,0±0,8	4,7±0,3	0,26	0,07	0,42	10 <sup>7</sup>

Foi observado crescimento celular nos hidrolisados I, III e IV, porém no hidrolisado II, que era um hidrolisado ácido concentrado com pressão osmótica de 3828 mOsm kg<sup>-1</sup>, não houve crescimento celular. A alta pressão osmótica somado com a presença de compostos tóxicos (furfural e HMF), provavelmente foram os motivos da não viabilidade celular neste substrato. Baixa viabilidade celular em hidrolisados com alta pressão osmótica também foi relatado por Hickert *et al.*, (2013) onde as espécies *S. cerevisiae*, *S. arborariae* e *C. shehatae* mostraram baixa viabilidade celular em um hidrolisado de casca de soja com pressão osmótica de 2 916 mOsm kg<sup>-1</sup>. Liu *et al.*, (2006) reportam que várias leveduras tiveram crescimento prejudicado em um hidrolisado com pressão osmótica de 2108 mOsm kg<sup>-1</sup> incluindo a cepa osmotolerante *C. krusei*.

Ambas as leveduras mostraram melhores parâmetros de produção de etanol no hidrolisado enzimático concentrado (III) e na mistura de hidrolisados (IV) nas duas condições de oxigenação, embora pouca xilose tenha sido consumida (20-30 %) nestes meios. Isto possivelmente se mostre como uma limitação na fisiologia das linhagens recombinantes devido à repressão de genes causado pela presença de glicose em maior quantidade e a ausência de transportadores específicos para a xilose.

O cultivo em oxigênio limitado demonstrou redução dos rendimentos de produção de etanol para ambas as leveduras, condição já esperada, pois há um maior crescimento em biomassa, já que a oxigenação dos meios pode provocar uma atividade enzimática diferenciada. A xilose é reduzida a xilitol utilizando - preferencialmente ou exclusivamente - NADPH, que é então oxidado a xilulose de uma forma estritamente NAD<sup>+</sup> dependente. Cada etapa



utiliza diferentes fatores redox, levando ao acúmulo de NADH, que não pode ser reciclado, induzindo assim a acumulação de xilitol, que é excretado para fora da célula (Hou *et al.*, 2009).

A origem genética da linhagem parental está relacionada diretamente com o metabolismo da xilose, isto já havia sido relatado por Hector *et al.*, (2011), em um estudo onde seis linhagens recombinantes, com linhagens parentais de origens genéticas diferentes mostram perfil de consumo de açúcar diferenciado. Neste trabalho, as duas linhagens utilizadas YRH 396 e YRH 400 mostraram capacidade diferenciada de metabolização dos açúcares nas diferentes condições de oxigenação dos meios, mas a linhagem YRH 396 demonstrou parâmetros de produção de etanol e xilitol superiores que a linhagem YRH 400.

Os melhores parâmetros de produção de etanol e xilitol e consumo da xilose da linhagem YRH 396 possivelmente estão relacionados à origem genética da linhagem parental. A parental da linhagem YRH 396 (YB-2625) havia sido isolada do bagaço, que é um meio de fermentação mais semelhante aos meios utilizados nesta pesquisa. Já a parental da linhagem YRH 400 (D5A) foi isolada do soro de queijo que é um meio de cultura menos hostil quando comparado com os hidrolisados de biomassa lignocelulósica, houve um valor maior de valor de  $Y_{x/x}$  (xilitol) da linhagem YRH 400, o que pode estar relacionada à incapacidade de fermentação completa da xilose em etanol em meios com presença de furanos e maiores pressões osmóticas. No teste preliminar, no meio sintético contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 30 g L<sup>-1</sup> de xilose, suplementado com um meio basal com peptona e extrato de levedura as linhagens YRH 396 e YRH 400 mostraram parâmetros de produção de etanol

$Y_{p/s}$  ( $0,41 \text{ gg}^{-1}$  e  $0,42 \text{ gg}^{-1}$ ) e  $Q_p$  ( $0,18 \text{ g (L h)}^{-1}$  e  $0,17 \text{ g (L h)}^{-1}$ ) respectivamente. Estes valores foram semelhantes para ambas as leveduras, sugerindo que as altas pressões osmóticas, furanos e ácidos orgânicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos causam divergências entre as linhagens no consumo de açúcares e formação de metabólitos.

A linhagem YRH 400 já havia sido testada por Nichol *et al.*, (2014) em hidrolisados da casca de arroz, no intervalo de pH entre 4,5 até 5,5. Segundo estes autores, o melhor metabolismo da xilose aconteceu em pH 5,5 porém não houve significativo incremento na produção de etanol. Esta linhagem também foi testada em hidrolisados de biomassa nos trabalhos de Bruce *et al.*, (2011), Bruce *et al.*, (2013), Zhou *et al.*, (2014) porém estes estudos eram de sacarificação e fermentação simultânea, onde o meio fermentativo, em geral, tem baixa pressão osmótica. A linhagem YRH 400 também mostrou bons resultados no trabalho de Hector *et al.*, (2011) em um ensaio de sacarificação e fermentação simultânea de um hidrolisado de *switchgrass* produzindo  $17,1 \text{ g L}^{-1}$  de etanol. A linhagem YRH 396 produziu  $16,8 \text{ g L}^{-1}$  de etanol no mesmo estudo.

Na pesquisa de Zhou *et al.* (2014) a linhagem YRH 400 foi inoculada em três hidrolisados com diferentes níveis de tóxicos inibidores da fermentação: um hidrolisado considerado sem inibidores dos processos fermentativos, um intermediário e outro com alta presença de tóxicos. Houve crescimento em todos os hidrolisados, porém a eficiência no metabolismo da xilose diminuiu com o aumento do nível de toxicidade.

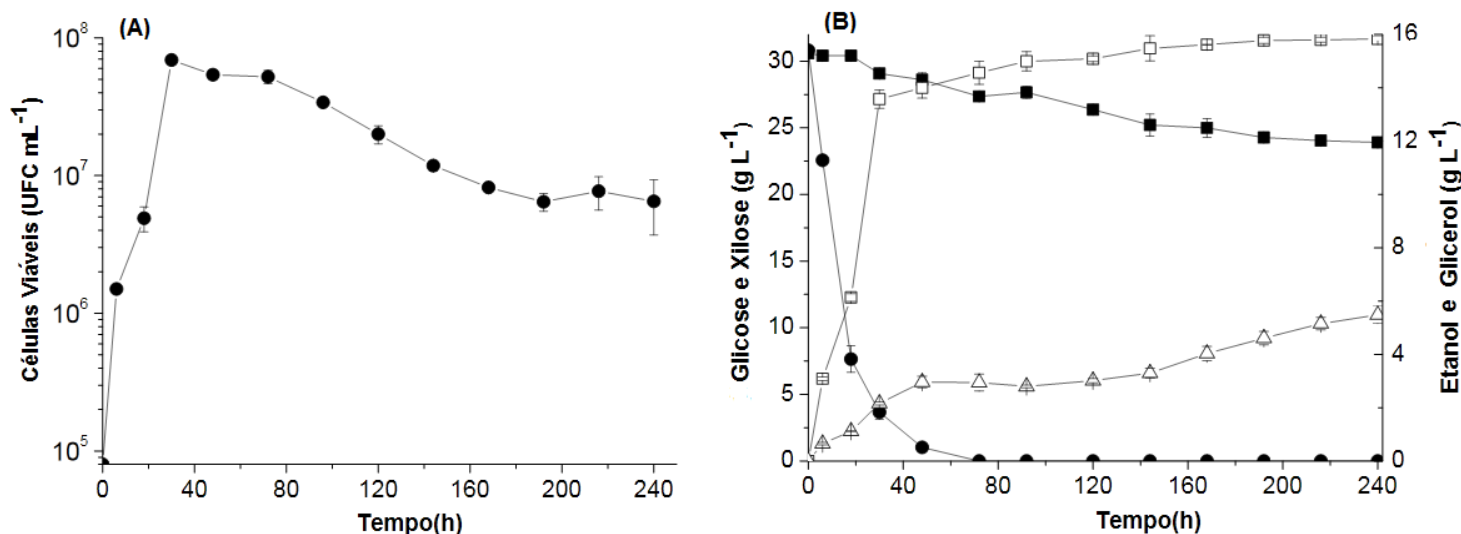
Embora não exista na literatura outros resultados para a linhagem YRH 396 além dos mostrados no estudo preliminar de Hector *et al.*, (2011) e os obtidos neste estudo, esta linhagem mostrou melhor capacidade de adaptação aos hidrolisados de biomassa lignocelulósica e melhor captação da xilose que a linhagem YRH 400. Isso pode ser correlacionado à genética da linhagem parental, já que ambas as linhagens possuem os mesmos genes de metabolismo de xilose. Complementando esta discussão, no estudo de Hector *et al.*, (2011) foram medidas atividades de XR e XDH e não houve correlação entre o nível de atividade enzimática e a taxa ou a extensão do consumo de xilose. Esta observação sugere que fatores independentes da atividade XR e XDH são responsáveis pelas diferenças na utilização de xilose pelas linhagens. A diferença de metabolismo pode estar relacionada a diferentes capacidades de transporte da xilose para dentro da célula, consequência das diferenças genéticas das linhagens parentais, porém Hector *et al.*, (2011) sugerem que esta hipótese precisa ser investigada mais a fundo para uma afirmação mais precisa.

### **5.7 Escalonamento da fermentação de hidrolisados da mistura de casca de aveia e soja pela levedura *S. cerevisiae* YRH 396 em biorreator**

O escalonamento do processo fermentativo em biorreator é importante no sentido de que possibilita uma aproximação de uma planta industrial, além de melhor padronização das condições de cultivo como temperatura, agitação, aeração e pH. Neste estudo a fermentação com a linhagem YRH 396, por apresentar melhor resultados de produção de etanol nos ensaios em agitador orbital, foi escalonada para biorreator para uma compreensão mais precisa do consumo de açúcares e formação de metabólitos.

### 5.7.1 Fermentação da mistura de hidrolisado ácido e enzimático e do hidrolisado enzimático

Ensaio com a levedura *S. cerevisiae* YRH 396 foram realizados em biorreator fermentando a mistura dos hidrolisados concentrados. As células viáveis ao longo da cinética e o consumo de substrato e de formação de metabólitos podem ser visualizados na figura 16.



**Figura 16. (A) Células viáveis de *S. cerevisiae* recombinante YRH 396 fermentando a mistura do hidrolisados ácido e enzimático. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos (●) glicose, (■) xilose, (□) etanol e (Δ) glicerol.**

O cultivo em biorreator ( $Y_{p/s}$  0,44  $g\ g^{-1}$ ) demonstrou parâmetros cinéticos ligeiramente superiores ao cultivo em agitador orbital ( $Y_{p/s}$  0,41  $g\ g^{-1}$ ), o que pode estar relacionado ao efeito do pH fixado em 5,5 no biorreator, considerado ótimo para o crescimento de leveduras em geral. Nos estudos anteriores, em agitador orbital, este parâmetro não pode ser monitorado em toda a cinética, porém manteve-se em 4,9 no final do cultivo. Nos cultivos em agitador orbital, embora o pH inicial dos meios fossem corrigidos para 5,5 uma

acidificação decorrente da evolução do processo fermentativo é esperada, isto talvez influencie nos parâmetros fermentativos da levedura.

A glicose foi metabolizada nas 70 horas iniciais de cultivo com produção relevante de etanol neste período e apenas uma pequena quantidade de xilose foi metabolizada, evidenciando a repressão catabólica dos genes de metabolismo da xilose em presença da glicose, fato já observado na co-fermentação de meio sintético contendo glicose e xilose. Embora no hidrolisado a metabolização dos açúcares seja mais lenta, esta diminuição aparente no metabolismo demonstra o possível efeito causado pelos furanos e altas pressões osmóticas dos hidrolisados.

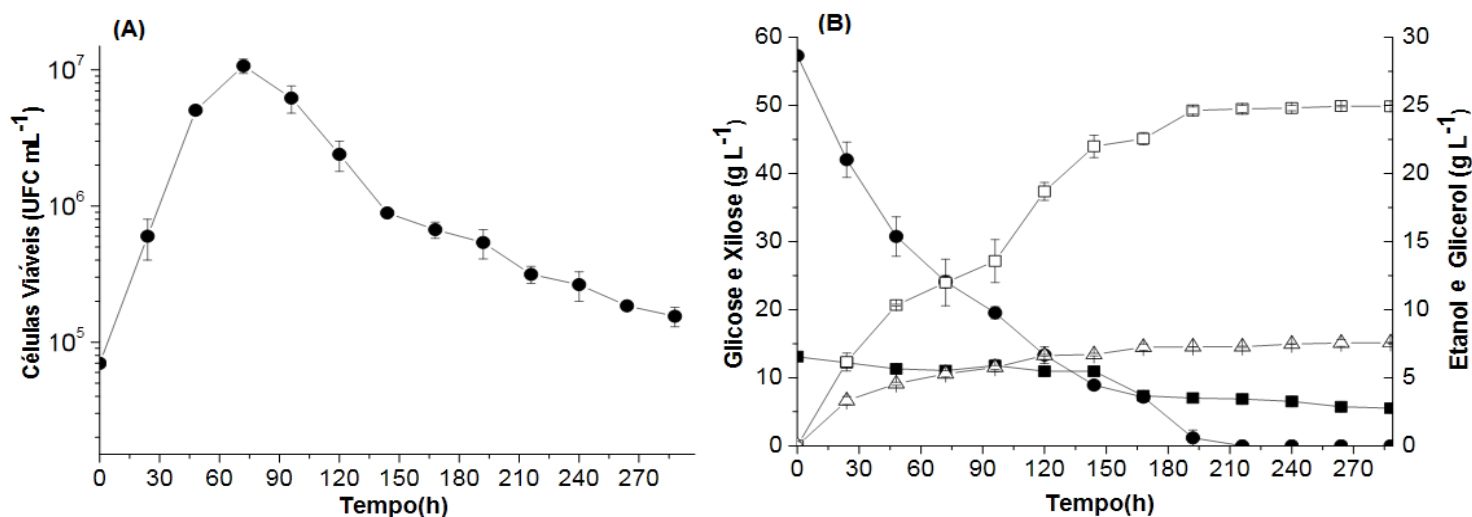
Cerca de 20 % da xilose do hidrolisado foi metabolizada e esta metabolização foi seguida de um pequeno aumento da quantidade de glicerol e etanol. Não houve produção de xilitol, o que possivelmente está relacionada à condição de cultivo em anaerobiose. A baixa utilização da xilose pela levedura na etapa final de cultivo, quando este era o único açúcar presente, pode estar relacionada à lise celular causada pelo etanol presente no meio, já que esta linhagem não está adaptada à produção de etanol em larga escala. Uma evolução adaptativa poderia tornar essas leveduras mais adaptadas a esses meios de fermentação e, conseqüentemente, poderia ocorrer uma melhora no metabolismo da xilose.

Mas o principal fator do baixo metabolismo da xilose nos hidrolisados está relacionado à ausência de sistema específico de transporte deste açúcar. Em um estudo realizado por Sedlak e Ho (2004), os transportadores Hxt7p e Hxt5p foram mais efetivos no transporte de xilose em linhagens recombinantes,

porém esses transportadores foram fortemente reprimidos quando a concentração da glicose era alta, mas foram gradativamente sendo transcritos à medida que a glicose foi consumida durante a fermentação. Embora seja possível a conversão de xilose à etanol por linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*, a afinidade por xilose pelos transportadores de glicose é bem menor (Jeffries, 2006).

Uma estratégia já reportada na literatura para aumentar a efetividade do metabolismo da xilose seria a inserção de transportadores exógenos de xilose em *S. cerevisiae* recombinante. O estudo da super-expressão dos transportadores de hexoses Hxt próprios da *S. cerevisiae* recombinante para melhorar o consumo da xilose já foi relatado na literatura por Gonçalves *et al.*, (2014). Embora estes ainda sejam estudos iniciais, tendem a contribuir com a melhor elucidação do metabolismo da xilose em leveduras recombinantes.

A linhagem *S. cerevisiae* YRH 396 também foi testada em biorreator no hidrolisado enzimático concentrado. O número de células viáveis bem como cinética de consumo de substrato e formação de metabólitos pode ser visualizado na Figura 17.



**Figura 17. (A) Células viáveis de *S. cerevisiae* recombinante YRH 396 fermentando o hidrolisado enzimático concentrado. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos (●) glicose, (■) xilose, (□) etanol e (Δ) glicerol.**

Neste meio, o consumo da glicose se mostrou mais lento devido possivelmente às altas pressões osmóticas (2328 mOsm kg<sup>-1</sup>). A glicose foi completamente consumida após 180 horas do início do cultivo. A alta necessidade de regulação osmótica se refletiu na alta produção de glicerol, alcançando valor máximo de 7,4 g L<sup>-1</sup>. Em um experimento realizado por Hector *et al.*, (2011) com a mesma linhagem recombinante fermentando um meio sintético com 50 g L<sup>-1</sup> de glicose e 50 g L<sup>-1</sup> de xilose, foi alcançado um valor de glicerol máximo de 5,9 g L<sup>-1</sup>. No mesmo trabalho, em um ensaio de sacarificação e fermentação simultânea, a linhagem produziu 1,6 g L<sup>-1</sup> de glicerol comparando com as demais linhagens testadas neste experimento, a linhagem YRH396 foi a maior produtora de glicerol. Como já foi relacionado por D'Amore *et al.*, (1988), o glicerol também é formado em condições anaeróbias, porque quando a via oxidativa não pode ser utilizada para o consumo de

equivalentes redutores, então o glicerol é formado para a reoxidação do NADH em excesso.

Em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, a expressão de genes de metabolismo da xilose também pode tornar o metabolismo da glicose mais lento, fato reportado por Meinander e colaboradores (1999), onde a expressão de genes para o metabolismo da xilose diminuiu a taxa de crescimento médio em glicose de 13 % até 47 % de uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae*. Em outro estudo, a linhagem recombinante 259 ST cresceu 10 % mais lentamente que sua parental (Helle *et al.*, 2003). Também no estudo realizado por Zhou e colaboradores (2014), a linhagem parental D5A consumiu glicose dentro de 30 h enquanto a recombinante YRH400 dentro de 50 h, sendo que neste estudo já é sugerido que a expressão dos genes para o metabolismo da xilose reduz o estado energético total, confirmando que a enzima xiluloquinase consome ATP (Jin *et al.*, 2003).

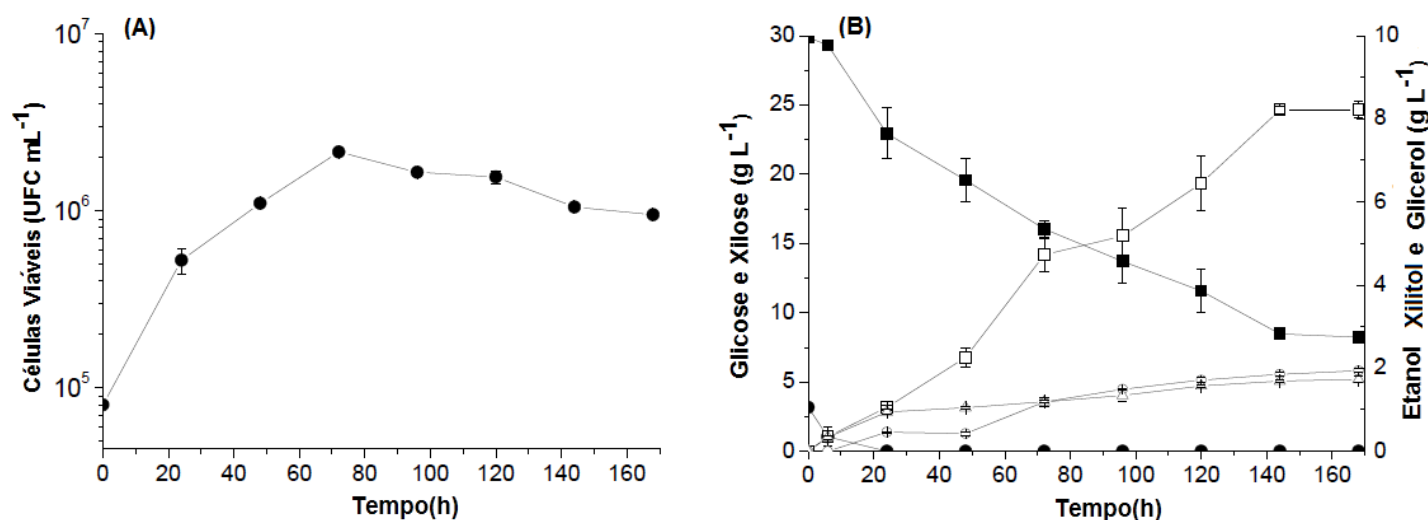
Da Cunha Perreira *et al.*, (2011) reportaram ter obtido  $Y_{p/s}$  de  $0,53 \text{ gg}^{-1}$  para a fermentação de um hidrolisado de casca de arroz com aproximadamente  $28 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, onde houve consumo de 100 % da glicose disponível no meio, em aproximadamente 80 horas de cultivo por uma linhagem selvagem de *S. cerevisiae*. Embora no experimento citado a concentração de glicose foi inferior que a testada no presente estudo, ela também foi metabolizada lentamente quando comparada com o meio sintético, mostrando que o efeito da pressão osmótica também pode ter influenciado o metabolismo de linhagens selvagens de *S. cerevisiae*.



Quanto aos parâmetros de produção de etanol a levedura apresentou  $Y_{p/s}$  de  $0,39 \text{ gg}^{-1}$ , sendo xilose consumida somente após o esgotamento da glicose, com pouco incremento para a produção de etanol. Não houve produção de xilitol, pois provavelmente a xilose consumida tenha sido usada como fonte de energia para a manutenção celular e regulação osmótica. A falha no metabolismo da xilose, além dos fatores já discutidos pode estar relacionada à inibição por ácidos orgânicos (Almeida *et al.*, 2011) e a elevada proporção de glicose neste meio de fermentação e a baixa proporção de xilose, que pode ao longo do cultivo ficar inferior ao  $K_m$  estimado para a captação de xilose em *S. cerevisiae* (80-200 mM) (Saloheimo *et al.* 2007).

### **5.7.2 Fermentação do hidrolisado ácido em biorreator em anaerobiose**

A Figura 18 mostra o número de células viáveis bem como o consumo de açúcares e formação de metabólitos de fermentação do hidrolisado ácido em anaerobiose.



**Figura 18. (A) Células viáveis de *S. cerevisiae* recombinante YRH 396 fermentando o hidrolisado ácido em anaerobiose. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos; (●) glicose, (■) xilose, (□) etanol, (○) xilitol e (Δ) glicerol.**

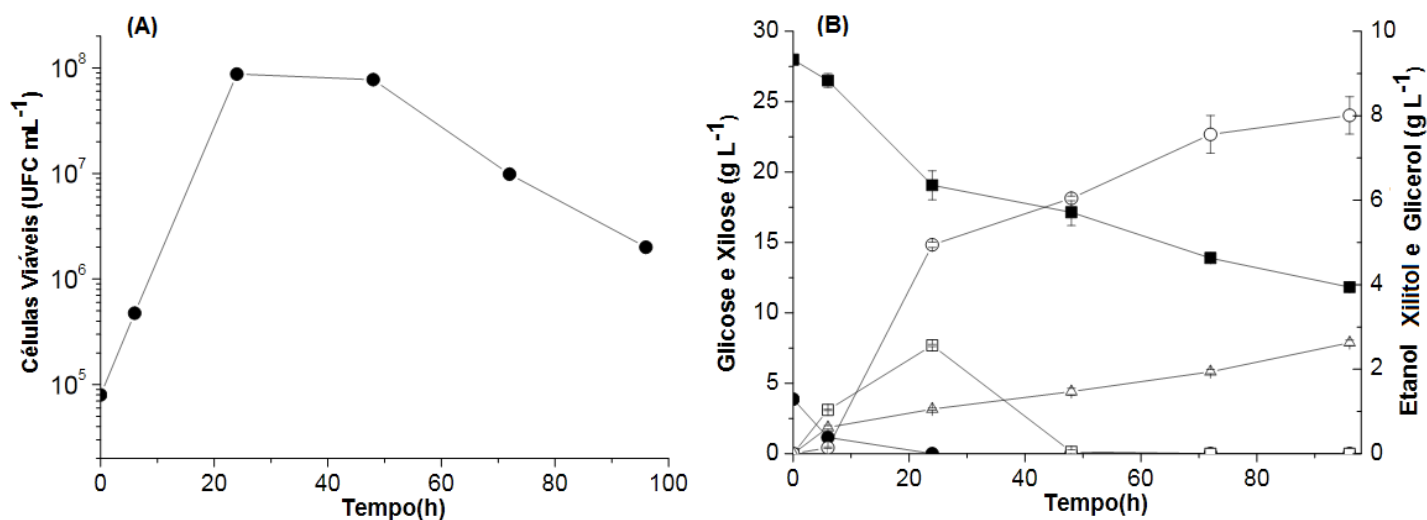
Neste meio de cultura, a eficiência de consumo de xilose foi maior que nos outros meios contendo concentração equivalente ou maior de glicose, neste sentido, Jojima *et al.*, (2010) reportam que a fermentação da xilose em hidrolisado misto é mais difícil, já que além da menor metabolização deste açúcar em comparação com a glicose, a taxa de consumo da xilose tende a diminuir ao longo da cinética. Neste caso, como a xilose foi o principal açúcar disponível para a manutenção celular da levedura ocorreu à indução de um consumo maior. Xilitol foi produzido em pequena quantidade ( $1,7 \text{ g L}^{-1}$ ). A baixa produção de xilitol neste hidrolisado, pode ser explicada pela presença de tóxicos furânicos no meio, pela pressão osmótica ou pela combinação destes fatores. O furfural pode funcionar como receptor de elétrons externos regenerando  $\text{NAD}^+$ , um cofator de xilitol desidrogenase que converte xilitol em

xilulose, que finalmente é fermentado em etanol (Wahlbom e Hahn-hägerdal, 2002), induzindo, conseqüentemente, um baixo acúmulo de xilitol.

É difícil estabelecer uma comparação dos resultados mostrados na literatura pelas linhagens *S. cerevisiae* com integração da via XR/XDH, pois os hidrolisados fermentados apresentam diferentes caracterizações e estratégias de fermentação. Nogué e Karhumaa (2014) em uma revisão bibliográfica demonstraram que a percentagem da xilose consumida nos hidrolisados lignocelulósicos com predominância deste açúcar por linhagens de *S. cerevisiae* com esta via de metabolismo variaram de 31 % até 100 %. Neste trabalho, a fermentação do hidrolisado ácido em anaerobiose apresentou consumo de 71,2 % da xilose com  $Y_{p/s}$  de  $0,33 \text{ gg}^{-1}$ .

### **5.7.3 Fermentação do hidrolisado ácido em biorreator aerado**

Com o objetivo de verificar metabolismo da linhagem YRH 396 em um ambiente com aeração controlada de 1vvm escalonou-se a fermentação do hidrolisado ácido I em um biorreator aerado com 1vvm e 300 rpm de agitação. Schirmer-Michel *et al.*, (2009) mostrou que esta condições de aeração e agitação em um hidrolisado com características semelhantes ao do hidrolisado ácido deste trabalho resultou em um  $K_L a$  de  $8 \text{ h}^{-1}$ , as células viáveis bem como o açúcares e formação de metabólitos pode ser visualizado na Figura 19.



**Figura 19. (A) Células viáveis de *S. cerevisiae* recombinante YRH 396 fermentando o hidrolisado ácido em biorreator aerado com 1 vvm. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos; (●) glicose, (■) xilose, (□) etanol, (○) xilitol e (Δ) glicerol.**

Etanol máximo de 2,94 g L<sup>-1</sup> foi produzido em 24 horas de cultivo, porém consumido nas horas seguintes. No cultivo em biorreator aerado, o metabolismo da xilose foi mais acelerado quando comparado com o cultivo em agitador orbital. Quanto à produção de xilitol, um máximo de 8,17 g L<sup>-1</sup> foi alcançado no tempo de 96 horas de cultivo com  $Y_{x/x}$  de 0,45 g g<sup>-1</sup>.

No trabalho de Park e Seo, (2016) uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* foi utilizada na fermentação de xilose de um meio sintético em um biorreator aerado com 1 vvm e 500 rpm de agitação, consumindo aproximadamente 30 g L<sup>-1</sup> de xilose e produzindo cerca de 11 g L<sup>-1</sup> de Xilitol. Bae *et al.*, (2004), desenvolveram um sistema de batelada com reciclagem de células de uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* e obtiveram uma produtividade máxima de xilitol de 2,34 g (L h)<sup>-1</sup> a partir da fermentação de um

meio sintético. Kojge e Ghosalkar, (2016) construíram linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com o gene da xilose redutase (XI) de *P. stipitis*, *C. tropicalis* e *Neurospora crassa*, além disso, inseriram um gene que codifica um transportador específico de xilose de *P. stipula*. A fermentação de xilose foi realizada em um sistema de batelada alimentada com glicose para regenerar NADPH, o rendimento de xilitol foi quase teórico para todas as linhagens tanto da fermentação de meio sintético contendo xilose, bem como na fermentação de um hidrolisado de sabugo de milho.

As leveduras utilizadas na produção biotecnológica de xilitol como *Candida* e *Spathaspora*, em geral, não apresentam a mesma robustez das linhagens de *S. cerevisiae*, o que impossibilita uma aplicação industrial em larga escala. As linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* que apresentam alta produção de xilitol poderiam ser aplicadas industrialmente para a produção deste álcool. Além disso Kojge e Ghosalkar, (2016) já relataram que como xilitol é um produto alimentício a produção por *S. cerevisiae* seria ideal, já que este é um organismo liberado para uso na produção de alimentos.

## 5.8 Ensaio de fermentação com as espécies *Spathaspora girioi* e *Spathaspora hagerdaliae*

### 5.8.1 Ensaio preliminares de fermentação de meio sintético

As espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae* foram testadas previamente em meio sintético contendo xilose, e em outro meio contendo glicose e xilose em agitador orbital na condição de anaerobiose. Estas linhagens já haviam sido testadas por Lopes *et al.*, (2016), em uma limitação menor de oxigênio com os frascos de erlenmeyer vedados com bucha de algodão. A comparação dos resultados se encontra na Tabela 8.

**Tabela 8. Ensaio de fermentação de meio sintético pelas espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae***

	I		II		III*		IV*	
	$Y_{P/s}$	$Y_{x/x}$	$Y_{P/s}$	$Y_{x/x}$	$Y_{P/s}$	$Y_{x/x}$	$Y_{P/s}$	$Y_{x/x}$
	ET	XIL	ET	XIL	ET	XIL	ET	XIL
	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$	$gg^{-1}$
<i>S. girioi</i>	0,39	0,25	0,31	0,27	0,18	0,52	0,22	0,35
<i>S. hagerdaliae</i>	0,45	0,21	0,38	0,26	0,32	0,37	0,28	0,21

I - 20 g L<sup>-1</sup> de glicose 30 g L<sup>-1</sup> de xilose + YP. Anaerobiose

II- 30 g L<sup>-1</sup> de xilose + YP. Anaerobiose

III \*- 30 g L<sup>-1</sup> de glicose 30 g L<sup>-1</sup> de xilose + YP. Oxigênio limitado

IV \*- 30 g L<sup>-1</sup> de xilose. + YP. Oxigênio limitado

\*Resultados disponível em Lopes *et al.*, (2016)

Os parâmetros cinéticos de produção de etanol são maiores em anaerobiose, conforme o esperado, com uma oxigenação maior dos meios ocorre uma maior produção de biomassa. Estes resultados também foram demonstrados por Da Cunha Pereira *et al.*, (2011) utilizando a levedura *S. arborariae*, que apresentou melhores resultados para etanol no cultivo em anaerobiose.

Cadete *et al.*, (2016) testaram sete espécies de *Spathaspora* na condição de anaerobiose e oxigênio limitado, em meio sintético contendo xilose. As linhagens mostraram cinéticas de consumo de substrato e formação de produtos diferentes, mas em geral, a condição de anaerobiose resultou em maior produção de etanol. No trabalho de Cadete *et al.*, (2016), a melhor produtora de etanol foi a levedura *S. passalidarum* com  $Y_{p/s}$  de  $0,48 \text{ gg}^{-1}$  para ambas as condições de oxigenação; já para a produção de xilitol, *S. suhii* apresentou  $Y_{x/x}$  de  $0,92 \text{ gg}^{-1}$  para a condição de anaerobiose e  $0,46 \text{ gg}^{-1}$  para a condição de oxigênio limitado. Cadete *et al.*,(2016) mostrou que nas espécies de *Spathaspora* a dependência da xilose redutase pelo cofatore NADPH ou NADH e NADPH é determinante para definir se as espécies são melhores produtoras de etanol ou xilitol.

### **5.8.2 Fermentação do hidrolisado ácido em agitador orbital**

Inicialmente as linhagens foram testadas no hidrolisado ácido I, II e V, variando as concentrações de açúcares para avaliar a capacidade de crescimento. O crescimento celular foi avaliado em unidade formadora de colônias (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), 30 h após a inoculação com as células, na condição de anaerobiose (Tabela 9) e oxigênio limitado (Tabela 10).

**Tabela 9. Células viáveis após 30 h de cultivo de *S. girioi* e *S. hagerdaliae* nos hidrolisados I, II e V em anaerobiose (UFC mL<sup>-1</sup>).**

<b>Linhagem</b>	<b>Hidrolisado I</b>	<b>Hidrolisado II</b>	<b>Hidrolisado V</b>
<i>S. girioi</i>	98±15 *10 <sup>4</sup>	0	0
<i>S. hagerdaliae</i>	62±13*10 <sup>4</sup>	0	0

**Tabela 10. Células viáveis após 30 h de cultivo de *S. girioi* e *S. hagerdaliae* nos hidrolisados I,II e V em oxigênio limitado (UFC mL<sup>-1</sup>).**

<b>Linhagem</b>	<b>Hidrolisado I</b>	<b>Hidrolisado II</b>	<b>Hidrolisado V</b>
<i>S. girioi</i>	36±10 * 10 <sup>5</sup>	0	0
<i>S. hagerdaliae</i>	21±12*10 <sup>5</sup>	0	0

Embora houvesse crescimento celular somente no hidrolisado I, as leveduras não passaram por nenhum processo de evolução adaptativa que as tornasse resistentes às pressões osmóticas dos meios e à alta carga de compostos inibidores da fermentação (furanos e ácidos orgânicos) presentes nos hidrolisados concentrados.

As linhagens *S. girioi* e *S. hagerdaliae* tiveram então sua cinética estudada fermentando o hidrolisado ácido da casca de aveia e soja (hidrolisado I). Os parâmetros fermentativos estão resumidos nas Tabelas 11 a seguir.



Tabela 11. Parâmetros cinéticos das espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae* fermentando o hidrolisado ácido I.

Oxigenação	Espécie	Glicose Consumida (%)	Xilose Consumida (%)	Etanol Máximo (g L <sup>-1</sup> )	Xilitol Máximo (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> ET (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> ET (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/lx</sub> XIL (g g <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> XIL (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Células Viáveis (UFC mL <sup>-1</sup> )
Anaerobiose	<i>S. girioi</i>	100	41,5± 4,3	3,0±0,6	4,1±0,2	0,20	0,01	0,31	0,03	10 <sup>5</sup>
	<i>S. hagerdaliae</i>	100	84,0± 6,1	11,0±0,6	2,8±0,3	0,44	0,06	0,10	0,01	10 <sup>5</sup>
Oxigênio limitado	<i>S. girioi</i>	100	63,6± 7,4	2,6±0,4	9.0±0,8	0,12	0,03	0,46	0,07	10 <sup>6</sup>
	<i>S. hagerdaliae</i>	100	69,0± 5,8	5,6±0,9	3,7±0,3	0,27	0,04	0,18	0,02	10 <sup>6</sup>

Uma redução nos parâmetros fermentativos é observada quando comparados com os parâmetros de fermentação dos meios sintéticos, mostrando o efeito significativo dos inibidores da fermentação, furfural e HMF, e da alta pressão osmótica para a linhagem *S. girioi*. Já para a linhagem *S. hagerdaliae* esta diminuição parece não ser tão severa, e pode estar relacionado à origem genética da espécie com maior capacidade de adaptação aos hidrolisados de resíduos lignocelulósicos. As concentrações de furfural e HMF dos hidrolisados podem causar interferência nas enzimas glicolíticas e na síntese de macromoléculas, enquanto o ácido acético pode permear as membranas celulares, causando a acidificação do citosol, prejudicando os processos metabólicos essenciais para o crescimento microbiano e diminuindo, subsequentemente, a produtividade em etanol (Keating *et al.*, 2008).

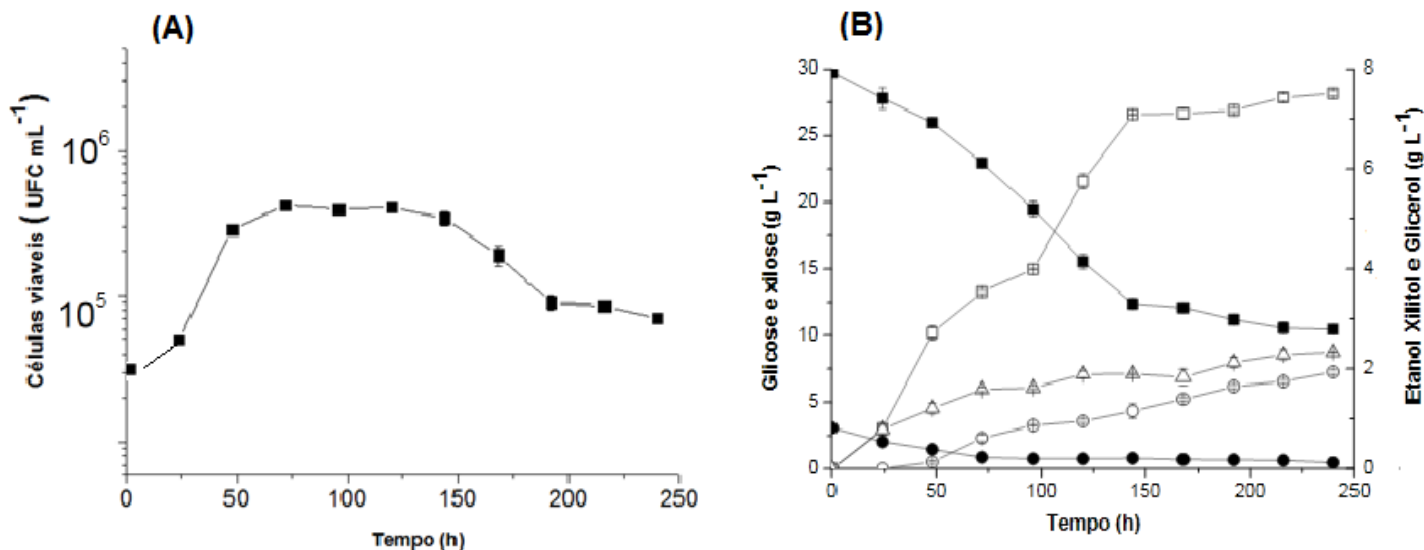
Uma relação mais equilibrada da atividade da xilose redutase e xilitol desidrogenase poderia explicar a maior produção de etanol pela espécie *S. hagerdaliae*. Isto foi reportado por Hou (2012) para a levedura *S. Passalidarum*, que mostrou altos rendimentos de etanol. A maior eficiência de produção de xilitol por *S. girioi* está relacionada com a maior atividade NADPH-XR e o que foi mostrado por Lopes *et al.*, (2016) em um ensaio de fermentação de meio sintético.

No trabalho de Cadete *et al.*, (2012), enquanto os melhores produtores de xilitol (*S. brasiliensis*, *S. roraimanensis*, *S. suhii* e *S. xylofermentans*) tinham estritamente atividades de XR dependentes de NADPH, os melhores produtores de etanol (*S. passalidarum* e *S. arborariae*) demonstraram atividades XR tanto com NADH como NADPH como co-factor. Lopes *et al.*, (2016) mostraram que para as espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae* a atividade da xilose redutase mostrou-se dependente de

NADPH, porém no mesmo estudo estas espécies mostraram maior capacidade de produção de etanol que a espécie *S. gorwiae* que tinha atividade da xilose redutase dependente de NADH. Neste mesmo estudo, a espécie *S. gorwiae* apresentava maior atividade enzimática total que a espécie *S. hagerdaliae*, porém menor consumo de açúcares e formação de etanol ou xilitol, o que contrasta com os resultados mostrados por Cadete *et al.*, (2016) onde as espécies de *Spathaspora* que mostravam maior atividade enzimática, conseqüentemente, mostravam maior consumo de açúcares e produção de etanol ou xilitol.

### **5.8.3 Fermentação por *S. hagerdaliae* de hidrolisado ácido em biorreator em anaerobiose**

Visando aperfeiçoar a produção de etanol, a fermentação do hidrolisado ácido I por *S. hagerdaliae* foi escalonada em biorreator em condição de anaerobiose com pH fixado em 5,5. O número de células viáveis bem como o consumo de açúcares e formação de metabólitos pode ser visualizado na Figura 21.



**Figura 20. (A) Células viáveis de *S. hagerdaliae* fermentando hidrolisado ácido em anerbiose. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos; (●) glicose, (■) xilose, (□) etanol (○) xilitol e (Δ) glicerol.**

Uma diminuição dos parâmetros de produção de etanol ocorreu no cultivo em biorreator ( $Y_{p/s}$  0,32 gg<sup>-1</sup>) quando comparada com o mesmo cultivo em agitador orbital ( $Y_{p/s}$  0,44 gg<sup>-1</sup>). A condição de anaerobiose simulada em agitador orbital pode não ter sido atingida com precisão, já que não foi medido se houve transferência de oxigênio para o meio de cultura, pode ter ocorrido uma pequena oxigenação dos meios, que pode ser determinante para o consumo de xilose e conversão a etanol provocando um melhor equilíbrio redox dos cofatores NADPH e NAD<sup>+</sup>. Outra hipótese que explicaria esta redução seria o efeito do pH controlado em 5,5 no biorreator, embora o pH do hidrolisado no início do cultivo em agitador orbital seja 5,5 ele é alterado pelo processo fermentativo e muitas leveduras apresentam pH ideal diferente de 5,5

como foi mostrado, por exemplo, nos trabalhos de Dussan *et al.*, (2016) ; Pappu *et al.*, (2016).

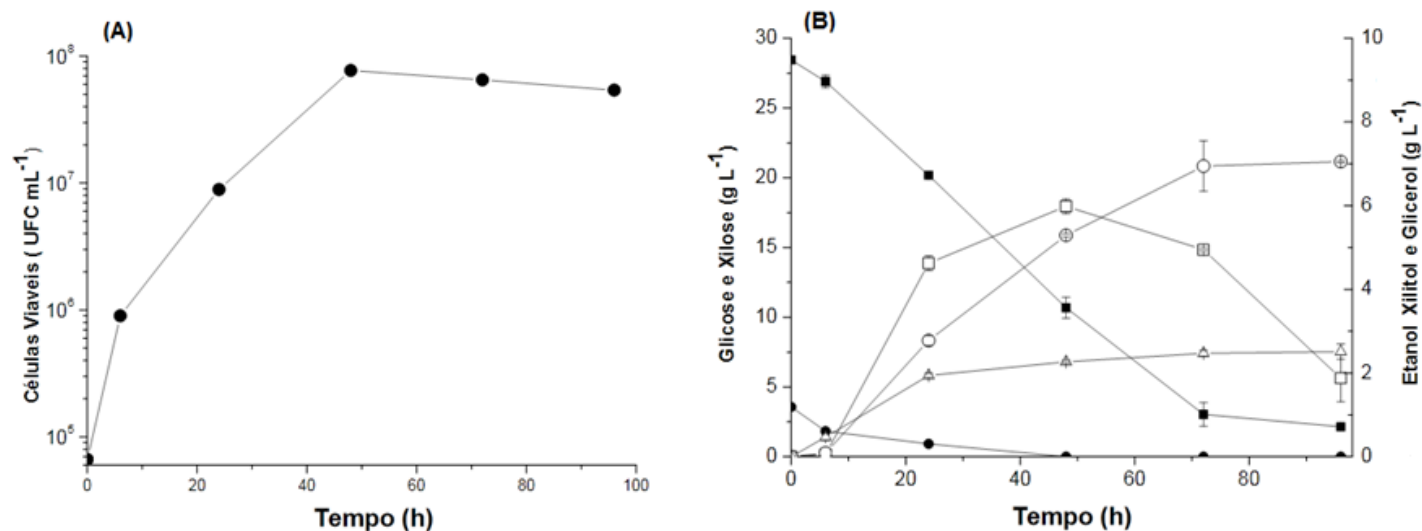
*S. hagerdaliae* apresentou  $Y_{p/s}$  de  $0,44 \text{ gg}^{-1}$  (agitador orbital) no hidrolisado ácido I da mistura de casca de aveia e casca de soja. No trabalho de Da Cunha Pereira *et al.*, (2011), *S. arborariae* apresentou  $Y_{p/s}$  de  $0,45 \text{ gg}^{-1}$  no hidrolisado da casca de arroz; já no trabalho de Cadete *et al.*, (2012) três espécies de *Spathaspora* foram testadas em hidrolisado hemicelulósico do bagaço-da-cana de açúcar os valores de  $Y_{p/s}$  variaram entre  $0,22 \text{ gg}^{-1}$  até  $0,18 \text{ gg}^{-1}$ . Este valores podem ser considerados baixos, porém a concentração inicial de xilose neste hidrolisado era alta, em torno de  $50 \text{ g L}^{-1}$ , o que pode ter causado uma repressão catabólica, já que em muitos casos concentrações elevadas de açúcar reprimem o metabolismo de algumas leveduras.

Em geral, o perfil de consumo de açúcares por leveduras está relacionado ao seu sistema de transporte de açúcares. A afinidade da proteína de transporte de hexose para a xilose é 1-2 ordens de grandeza inferior às da glicose. Portanto, durante a fermentação de glicose e xilose, a xilose só pode ser transportada e metabolizada, em grande quantidade, após a glicose ter sido exaurida. Uma pequena quantidade de xilose pode ser transportada por difusão facilitada de baixa afinidade (Kotter e Ciriacy, 1993) este sistema já foi claramente demonstrado em linhagens de *S. cerevisiae*. Em outras leveduras como *Candida* e *Sphatasporas*, a xilose pode ser transportada pela difusão facilitada de baixa afinidade como em *S. cerevisiae* ou por um sistema de alta afinidade que é expresso, dependendo das condições de crescimento da levedura (Leandro *et al.*, 2006). Porém este transporte ativo provoca o esgotamento de ATP que em condições anaeróbicas, como no caso deste

experimento com *S. hagerdaliae*, não é muito provável que seja utilizado. No hidrolisado testado neste experimento, o consumo da xilose foi facilitado, já que a concentração de glicose era baixa e foi consumida nas primeiras horas, sendo a xilose a única fonte de carbono disponível para o crescimento e manutenção celular.

#### **5.8.4 Fermentação por *S. hagerdaliae* de hidrolisado ácido em biorreator aerado.**

A espécie *S. hagerdaliae*, por apresentar desempenho satisfatório nos ensaios em agitador orbital, teve seu metabolismo estudado em biorreator aerado. Testou-se a condição de aeração de 1 vvm, condição descrita na literatura por Schirmer-Michel *et al.*, (2009) como microaeróbica em virtude da capacidade de transferência de oxigênio para o hidrolisado. O experimento foi conduzido em biorreator com pH fixado (5,5) pela adição de ácido e base, em 300 rpm de agitação, visando a transferência homogênea de oxigênio. As células viáveis ao longo do cultivo e a cinética de consumo de substrato e formação de metabólitos pode ser vista na Figura 22.



**Figura 21. (A) Células viáveis de *S. hagerdaliae* fermentando hidrolisado ácido em biorreator aerado com 1 vvm. (B) Cinética de consumo de açúcar e formação de metabólitos; (●) glicose, (■) xilose, (□) etanol (○) xilitol e (Δ) glicerol.**

A cinética de fermentação em biorreator aerado demonstrou diferenças do cultivo em agitador orbital em oxigênio limitado devido à diferença de transferência de oxigênio do biorreator e melhor padronização das condições de cultivo. Houve um rápido consumo da xilose, onde em 96 h de cultivo mais de 90 % foi consumida, ocorrendo produção de etanol máxima de  $5,6 \text{ g L}^{-1}$ , porém este começou a ser consumido a partir de 48 horas de cultivo. Delgenes e colaboradores (1998), demonstraram que em algumas leveduras o consumo de etanol está relacionado a uma incompleta conversão da xilose, ocorrendo uma preferência pelo consumo de etanol, em vez de xilose na presença de oxigênio.

A produção de xilitol no cultivo com aeração mostrou-se superior ao cultivo em anaerobiose em biorreator, pois a aeração é condição experimental

crítica para produção de xilitol. O suprimento de oxigênio determina se D-xilose será fermentada ou não, regulando o equilíbrio do consumo de carbono para bioconversão e crescimento (Winkelhausen e Kuzmanova, 1998). O cultivo da espécie *S. hagerdaliae* em biorreator aerado com 1 vvm e 300 rpm de agitação com pH fixado em 5,5 mostrou  $Y_{x/x}$  de 0,31, para a otimização da conversão de xilose em xilitol seria necessário realizar um planejamento experimental considerando a aeração do meio e transferência de oxigênio como variável, além do pH, já que este influencia o metabolismo de algumas leveduras. Esta otimização já foi realizada para algumas leveduras como no trabalho de Pappu e Gummadi (2016) onde os valores ótimos para a conversão de xilose em xilitol pela leveduras *Debaryomyces nepalensis* foram pH 4,3, agitação 370 rpm e aeração 0,9 vvm

No trabalho de Da Cunha Pereira *et al.*, (2011) em um biorreator aerado com 0,33 vvm a levedura *S. arborariae* apresentou um valor de  $Y_{x/x}$  de  $0,33 \text{ gg}^{-1}$  cultivada em hidrolisado da casca de arroz, já o co-cultivo *S. cerevisiae* e *S. arborariae* neste mesmo hidrolisado apresentou  $Y_{x/x}$  de  $0,45 \text{ gg}^{-1}$ . Já no trabalho de Cadete *et al.*, (2012) três espécies de *Spathaspora* foram cultivadas em hidrolisado de bagaço-da-cana em agitador orbital em oxigênio limitado, com o hidrolisado contendo 50,2 g de xilose. Duas das espécies produziram somente xilitol e apresentaram  $Y_{x/x}$  de  $0,57 \text{ gg}^{-1}$  e  $0,61 \text{ gg}^{-1}$  e xilitol máximo de 18,2 e 17,1 g L<sup>-1</sup>. Estes valores são considerados altos quando comparados com outros disponíveis na literatura, e também são superiores aos obtidos no presente estudo para as espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae*.

A espécies *S. hagerdaliae* e *S. girioi* mostraram-se melhores produtoras de xilitol que muitas espécies de *candida*. Tantos nos trabalhos de Da Cunha-



Pereira *et al.*, (2011) quanto nos trabalhos de Hickert *et al.*, (2013) espécies de *Candida* mostraram-se boas produtoras de xilitol em meio sintético mas não demonstrando bons resultados quando cultivadas em hidrolisado lignocelulósicos. No trabalho de Cadete *et al.*, (2012) a espécie *C. lignosa* não produziu xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço-da-cana e as linhagens de *Spathaspora* testadas neste hidrolisado produziram xilitol, justificando que muitas espécies de *Spathaspora* são boas produtoras de xilitol a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica com presença de ácidos orgânicos, furanos e altas pressões osmóticas.

Os resultados aqui apresentados, apoiados com os apresentados na literatura demonstram que as espécies de *Spathaspora* possuem alto potencial de aplicação na produção de etanol ou xilitol a partir de hidrolisados de resíduos lignocelulósicos. Mais estudos sobre um controle de aeração e pH dos meios de cultivo, bem como sobre a concentração inicial de açúcares precisam ser desenvolvidos na tentativa de maximizar a produção destes álcoois.

## 6. CONCLUSÕES

A casca de aveia e casca de soja são resíduos com grande quantidade de monômeros de açúcares que podem ser liberados em processos de hidrólise. A hidrólise ácida diluída da mistura de cascas de aveia e casca de soja (1 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 min de autoclave) mostrou-se eficiente na solubilização da fração de hemicelulose com menor gasto de ácido quando comparada com as demais condições testada. Para a hidrólise enzimática, o extrato do fungo *Penicillium echinulatum* S1M29 mostrou-se como uma nova alternativa interessante para a hidrólise de biomassas lignocelulósicas, porém mais estudos sobre a pruficação deste complexo poderiam contribuir para torna-lo mais eficiente. A enzima comercial *Novozymes* CELLUCLAST 1.5<sup>®</sup> mostrou alta capacidade de sacarificação da fração de celulose.

A fermentação dos hidrolisados pelas linhagens recombinantes *S. cerevisiae* YRH 396 e YRH 400 mostrou-se limitada, apesar das linhagens parentais serem de aplicação industrial o metabolismo da xilose foi lento evidenciando que para a metabolização em escala industrial outras modificações em nível molecular são necessárias, além de que, os processos de evolução adaptativa precisam ser investigados, pois podem gerar melhorias na capacidade de fermentação da xilose por estas linhagens recombinantes.

A fermentação do hidrolisado ácido pelas novas espécies de *Spathaspora* mostrou resultados satisfatórios, já que são selvagens e não foram expostas a processo de melhorias moleculares ou de evolução adaptativa. *S. hagerdaliae* demonstrou resultados de produtividade de etanol e consumo de xilose em hidrolisados de biomassa lignocelululósica semelhante as melhores espécies de *Spathaspora* já descritas na literatura.

## 7. PERSPECTIVAS

A fermentação da xilose pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* mostrou-se limitada sugerindo que além da utilização de linhagens industriais transformadas por integração cromossômica, estudos sobre o transporte da xilose para dentro da célula precisam ser realizados, a fim de contribuir para novas construções de linhagens recombinantes com maior capacidade de fermentar xilose, além do desenvolvimento de outras mutações que possibilitem a fermentação de outras pentoses como arabinose.

A fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica pelas espécies *S. girioi* e *S. hagerdaliae* ainda precisa ser investigada, com medições da atividade enzimática durante a fermentação de hidrolisados em diferentes condições de oxigenação dos meios, para a obtenção de mais conclusões sobre potencial biotecnológico destas espécies.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.M.; RÖDER, A.; MODIG, T.; LAADAN, B.; LIDÉN, G. ; GORWA-GRAUSLUND, M. NADH - vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 939-945, 2007.

AMIDON, T. E.; LIU, S. Water-based wood biorefinery. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 542-550, 2009.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163-173, 2014.

ARGUESO, J.L. ; CARAZZOLE, M.F. ; PIORT, A. ; MIECZKOWSKI, P.A. *et al.*, Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 488-495, 2013.

BETTIGA, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Comparing the xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, n.16 , p 396-402, 2008.

BRAT, D.; BOLES, E. ; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2304-2311, 2009.

CADETE, R. M. ; HERAS, A. M. ; SANDSTRÖM, A. ; 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*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 167-181, 2016.

CADETE, R.M. ; SANTOS, R.O. ; MELO, M.A. *et al.* *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1338-1342, 2009.

CADETE, R.M.; FONSECA, C.; ROSA, C.A. Novel yeast strains from Brazilian biodiversity: Biotechnological applications in lignocellulose conversion into

biofuels. In: da Silva SS, Chandel AK (eds). *Biofuels in Brazil*. Cham: Springer International Publishing. p. 255-279, 2014.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSS'NA, K. J. *et al.*, Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS One**, v. 7, p. 431-435, 2012.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.Z. *et al.*, *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Anton Van Lee**, v. 103, p. 421-431, 2013.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1371-1376, 2006.

CASSALES, A.R.; SOUZA-CRUZ, P.B.; RECH, R. ; AYUB, M.A.Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p.4675-4683, 2011.

CHENG, K.-K., WU, J., LIN, Z.-N., ZHANG, J.-A. Aerobic and sequential anaerobic fermentation to produce xylitol and ethanol using non-detoxified acid pretreated corncob. **Biotechnology for Biofuels**, 7, 144- 166. 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Avaliação da safra agrícola 2015/2016**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2016.

CORREDOR D.Y., SUN X. S., SALAZAR J. M., HOHN K. L., WANG D. Enzymatic Hydrolysis of Soybean Hulls Using Dilute Acid and Modified Steam-Explosion Pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, p. 1 – 8, 2008.

D'AMORE, C.J.; PANCHAL, I.; RUSSEL, G.G.; STEWART. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, V. 2, p. 365-372,1988.

DA CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T ; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n.5, p. 4218-25, 2011.

DAS NEVES, M.A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N. ; MITSUTOSHI, N. State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production.**Biotechnology and Molecular Biology**,v.1,p.1-14, 2007.

DELGENES, J.P.; ESCARE, M.C.; LAPLACE, J.M.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 101-111, 1998.

DIAO, L. ; LIU, Y. ; QIAN, F. ; YANG, J. ; JIANG, Y. ; YANG, S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 110, 2013.

DIEN, B. S.; MILLER D. J.; HECTOR, R. E.,- COTTA, M. A. Enhancing alfalfa conversion efficiencies for sugar recovery and ethanol production by altering lignin composition. **Bioresource Technology**, V. 102, p. 6479-6486, 2011.

DIEN; B. S.; BRYAN, P. J. ; HECTOR, R. ; ITEN, L. B.; MITCHELL, R. B.; QURESHI, N.; SARATH, G.; VOGEL, K. P.; COTTA, M. A. Conversion of switchgrass to ethanol using dilute ammonium hydroxide pretreatment: influence of ecotype and harvest maturity. **Environmental Technology**, v.34, p. 1837-1848, 2013.

DILLON A.J.P, BETTIO M., POZZAN F.G., ANDRIGHETTI T., CAMASSOLA M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal Applied Microbiology**, v.111, p. 48-53, 2011

DU PREEZ, J.C. ; VAN DRIESSEL, B. ; PRIOR, B.A. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Candida tenuis* on D-xylose. **Archives of Microbiology**, v. 152, p. 143-147, 1989.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbiology Technology**, V. 16, p. 944-956, 1994.

DUNNING, J.W; DALLAS, D.E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Analytical chemistry**, v. 21, p. 727-729, 1949.

DUSSÁN, K.J.; SILVA, D.D.V.; PEREZ, V.H., DA SILVA, S.S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renew Energy**. 87,703–710, 2016

ERDEI, B.; FRANKO, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Separate hydrolysis and co-fermentation for improved xylose utilization in integrated ethanol production from wheat meal and wheat straw. **Biotechnology for Biofuels** 5,12, 2012

GÁRDONYI, M. ; ÖSTERBERG, M. ; RODRIGUES, C. ; SPENCER-MARTINS, I.;HAHN-HÄGERDAL. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 45-52, 2003.

GHOSH, P.; GHOSE, T. K. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; Scheper, T., ed.; Springer: New York, vol. 85, 2003.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F. *et al.*, Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-800, 2010.

GONÇALVES, D.L. ; MATSUSHIKA, A. ; DE SALES, B.B. ; GOSHIMA, T. ; BON, E.P. ; STAMBUK, B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 63, p. 13-20, 2014.

HAHN HÄGERDAL, B. ; KARHUMAA, K. ; FONSECA, C. ; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, p.937-953, 2007.

HAMACHER, T. ; BECKER, J. ; GARDONYI, M. ; HAHN-HADERGAL, B. ; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexoses transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783-2788, 2002.

HARNER, N. K.; WEN, X.; BAJWA, P. K. *et al.* Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.42, p.1-20, 2015.

HAYN, M. ; STEINER, W. ; KLINGER, R. ; STEINMÜLLER, H. ; SINNER, M. ; ESTERBAUER, H. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosics. In: Saddler JN (ed) *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*. CAB International, Wallingford, UK, p. 33-72, 1993.

HECTOR, R.E.; DIEN, B.S.; COTTA, M.A. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 1193-1202, 2011.

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. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 84, 2013.

HELLE, S.S.; CAMERON, D.R.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S.J.B. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose

fermentation by a genetically engineered strain of *S. Cerevisiae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.33, p. 786-792, 2003

HICKERT, L. R.; CRUZ, M. M. ; DILLON, A. J. P. ; FONTANA, R. C; Rosa, C. A. ; AYUB, M. A. Z. Fermentation kinetics of acid-enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p.5924-5936, 2014.

HICKERT, L. R; De SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A .Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, v.43, p.112-116, 2013.

HICKERT, L.R. Otimização da hidrólise da casca de arroz (*oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras. Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), ICBS, UFRGS, Porto Alegre, 2009.

HOU, J. ; VEMURI, G. ; BAO, X. ; OLSSON, L. Impact of overexpressing NADH kinase on glucose and xylose metabolism in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V.82, p. 909-919, 2009.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 94, p. 205-14, 2012.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E. ; JANSEN VAN RENSBURG, E.L. ; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 602-619, 2003.

JAIRO, H; WOLFGANG, L;. GLASSE, G. Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable **Materials Journal of Polymers and the Environment**, v.3 p. 39–48, 2002

JEFFRIES, T.W. ; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63. p. 495-509, 2004.

JEFFRIES, T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, 17, 320-326, 2006

JIN, Y.S. ; JEFFRIES, T.W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.105, n.108, p.277–286, 2003.



KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops Products**, v. 20, p.103-110, 2004

KARHUMAA, K. ; SANCHEZ, R.G. ; HAHN-HAGERDAL, B. ; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Cell Fact**, v. 6, p. 1, 2007.

KARIMI K., EMTIAZI G., TAHERZADEH M.J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.138 – 144. 2006

KIM, J., YUN, S. Discovery of Cellulose as a Smart Material. **Macromolecules**, v. 39, p. 4202-4206, 2006.

KUMAR, R. ; SINGH, S. ; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

KUYPER, M. ; HARHANGI, H.R. ; STAVE, AK. ; WINKLER, A.A. ; JETTEN, M.S. ; DE LAAT, W.T. ; DEN RIDDER, J.J. ; OP DEN CAMP, H.J. ; VAN DIJKEN, J.P. ; PRONK, J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 69-78, 2003.

LASER, M. ; SCHULMAN, D. ; ALLEN, S.G. ; LICHWA, J. ; ANTAL, M.J. ; LYND, L. R. Acomparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.

LEANDRO, M. J; GONÇALVES, P. ; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose–H<sup>+</sup> symporter. **Biochemical Journal**, v. 395, p. 543-549, 2006.

LEE, W.S. ; CHEN, C. ; CHANG, C.H. ; YANG, S.S. Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v. 39, p. 216-222, 2012.

LOPES, M. R. ; MORAIS, C. G. ; KOMINEK, J. ; CADETE, R. M. ; SOARES, M. A. ; UETANABARO, A. P. T. ; FONSECA, C. ; LACHANCE, M.-A. ; HITTINGER, CHRIS TODD ; ROSA, C.A. . Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov., and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 16, p. 0-12, 2016

MAPA/CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Anuário Estatístico da agroenergia Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2016.

MARGARITIS, A. ; BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, p.1039-1041, 1982.

MARGEOT, A. ; HAHN-HAGERDAL, B. ; EDLUND, M. ; SLADE, R. ; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 372-380, 2009.

MARTÍNEZ, E.A. ; SANTOS, J.A. F. Influence of the use of rice bran extract as a source of nutrients on xylitol production. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 32, p. 2-12, 2012.

MATSUSHIKA, A. ; INOUE, H. ; KODAKI, T. ; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 37-53, 2009.

MEINANDER, N.Q. ; BOELS, I.; HAHN-HADERGAL B. Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *XYL1* and *XYL2* from *Pichia stipitis* with and without overexpression of *TAL1*. **Bioresource Technology**, v.68, p. 79-87, 1999.

MIELENZ, J.R. ; BARDSLEY, J.S. ; WYMAN, C.E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3532-3539, 2009.

MOYSÉS, D.N. ; REIS, V.C.B. ; de ALMEIDA, J.R.M. ; de MORAES, L.M.P. ; TORRES, F.A.G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 207, 2016.

MUSSATTO, S.I. ; DRAGONE, G. ; ROBERTO, I.C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3801-3806, 2005.

MUSSATTO, S.I.; SILVA, C.J.S.M. ; ROBERTO, I.G. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, p. 681-686, 2006.

NICHOLS, N. N.; HECTOR, R.; SAHA, B.; FRAZER S. E.; KENNEDY, G. J. Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to

ethanol using conventional and engineered microbes **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 79–88, 2014.

NOGUE, S.N.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letter**, v. 37, p. 761-772, 2015.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, p. 659-664, 2009.

OGEDA, T. L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. .

OLOFSSON, K. ; BERTILSSON, M. ; LIDÉN, G.A. Short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, p. 1-14, 2008.

PALMQVIST. E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour Technol** 74, 25–33. 2000.

PAPPU, J.S.M. ; GUMMADI, S.N. Multi response optimization for enhanced xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. **Biotechnology** 6, 151, 2016.

ROBERTO, I.C. ; MUSSATTO S.I. ; RODRIGUES R.C. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. ; SATO, S. Influence of  $k_La$  on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 505-510, 1999.

ROCHA, G.J.M. Deslignificação de bagaço-da-cana de açúcar assistida por oxigênio. Tese (Doutorado em Química), IQSC, USP, São Carlos, v.136, 2000.

RODRIGUES, R. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

SAHA, B.; ITEN, L.; COTTA, M.; WU, V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 816-822, 2005.

SALOHEIMO, A. ; RAUTA, J. ; STASYK, O.V.; SIBIRNY A .A.; PENTTILA, M ; RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 1041-1052, 2007.

SÁNCHEZ, O. ; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SCHIMER-MICHEL, A.C., FLÔRES, S.H., HERTZ, P.F., MATOS, G.S., AYUB, M.A.Z., Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v.99, p.2898–2904, 2008.

SCHIRMER-MICHEL A. C., FLÔRES S. H., HERTZ P. F., AYUB M.A.Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 223 – 228. 2009.

SEDLAK, M.; HO, N.W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, v. 21, n. 8, p. 671-684, 2004.

SUHAG, M. ; SHARMA, H.R. Biorefinery concept : an overview of producing energy, fuels and materials from biomass feedstocks. **International Advanced Research Journal in Science**, v. 2, p. 103-109, 2015. .

TAMANINI, C. et al. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum Technology**, v. 26, n. 2, p. 117-125, 2004.

TIAN, S.; ZHOU, G. ; YAN, F. ; YU, Y. ; YANGO, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 600-656, 2009.

TOIVARI, M.H.; SALUSJARVI, L. ; RUOHONEN, L. ; PENTTILA, M. Endogenous xylose pathway in *saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3681-3686, 2004.

TORIBIO, J.C.D. ; MORALES, F.J. Biorefineries: An Overview on Bioethanol Production. Environment. **Energy and Climate Change**, v. 34, p. 153-173, 2015.

USDA – United States Department of Agriculture. Foreign Agriculture Service: Production, Supply and Distribution Online. Oil seeds, 2015. <http://www.fas.usda.gov/psdonline>. Consultado em 05 dez 2016.

VERHO, R.; LONDESBOROUGH, J.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p.5892-5897, 2003.

WAHLBOM, C.F., HAHN-HÄGERDAL, B. Furfural, 5.-Hydroxymetyl Furfural an acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.78, p.172-178, 2002.

WATANABE, S. ; ABU SALEH, A. ; PACK, S.P. ; ANNALURU, N. ; KODAKI, T.; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Microbiology**, v. 153. p. 3044-3054, 2007.

WINKELHAUSEN, E. ; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, p. 1-14, 1998.

WYMAN, C.E. Potential Synergies and Challenges in Refining Cellulosic Biomass to Fuels, Chemicals, and Power. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 254-262, 2003.

ZAHED, O; JOUZANI, GS; ABBASALIZADEH, S; KHODAIYAN, F; TABATABAEI, M.. Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a membrane bioreactor. **Folia Microbiol.** 61, 179–18. 2015.

ZHAO, X.Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology.** 144, 23-30. 2009.

ZHOU, H.; LAN, T.; DIEN, B. ; HECTOR, R. ; ZHU J. Comparisons of five *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 5, p. 1076-1083, 2014.

ZHOU, H.; ZHU, J.Y.; LUO X · NEGRON, J. Bioconversion of Beetle-Killed Lodgepole Pine Using SPORL: Process Scale-up Design, Lignin Coproduct, and High Solids Fermentation without Detoxification. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. xx, p.xx, 2013.

## ANEXO 1

## Laudo da enzima novozymes CELLUCLAST® 1.5 L



## Celluclast® 1.5 L

**Valid From** 2009-03-09

**Product Characteristics:**

Declared Enzyme	Cellulase
Declared Activity	700 EGU/g
Colour	Brown Colour can vary from batch to batch. Colour intensity is not an indication of enzyme activity.
Physical form	Liquid
Approximate Density (g/ml)	1.22
Stabilisers	Sodium chloride Sorbitol
Preservatives	Potassium sorbate
Odour	Slight fermentation odour
Production organism	Trichoderma reesei
Production Method	Produced by submerged fermentation of a micro organism. The enzyme protein is separated and purified from the production organism.

**Product Specification:**

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Beta-glucanase Units EGU	700		/g
Total Viable Count	-	50000	/g
Coliform Bacteria	-	30	/g
Enteropathogenic E.Coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g

<b>Packaging:</b>	See the standard packaging list for more information.
<b>Recommended Storage:</b>	
Best before	When stored as recommended, the product is best used within 18 months from date of delivery.
Storage at customer's warehouse	0-25°C (32°F-77°F)
Storage Conditions	In unbroken packaging - dry and protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. Extended storage or adverse conditions such as higher temperature or higher humidity may lead to a higher dosage requirement.

### **Safety and Handling Precautions**

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact. The product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred. Spilled product may dry out and create dust. Spilled material should be flushed away with water. Avoid splashing. Left over material may dry out and create dust. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection as prescribed on the warning label. Wash contaminated clothes. A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.

