

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

PAULO ROBERTO DALL CORTIVO

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR LEVEDURAS  
ISOLADAS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ENGENHARIA DE  
BIORREATORES E ESTRATÉGIAS DE FERMENTAÇÃO**

Porto Alegre  
Dezembro de 2021



PAULO ROBERTO DALL CORTIVO

Engenheiro Agrônomo - UFRGS

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR LEVEDURAS  
ISOLADAS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ENGENHARIA DE  
BIORREACTORES E ESTRATÉGIAS DE FERMENTAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. PhD: Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>: Lilian Raquel Hickert

Porto Alegre

Dezembro de 2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Dall Cortivo, Paulo Roberto  
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR LEVEDURAS  
ISOLADAS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ENGENHARIA DE  
BIORREATORES E ESTRATÉGIAS DE FERMENTAÇÃO / Paulo  
Roberto Dall Cortivo. -- 2021.  
117 f.  
Orientador: Marco Antônio Zachia Ayub.

Tese (Doutorado) -- 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, 2021.

1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Leveduras.  
4. Resíduos lignocelulósicos. 5. Fermentação da  
xilose. I. Zachia Ayub, Marco Antônio, orient. II.  
Título.

*Caminhante, são tuas pegadas  
o caminho e nada mais;  
caminhante, não há caminho,  
se faz caminho ao andar*

*Ao andar se faz caminho  
e ao voltar a vista atrás  
se vê a senda que nunca  
se há de voltar a pisar*

*Caminhante não há caminho  
senão há marcas no mar....*

Antonio Machado

## AGRADECIMENTO

Ao Professor Marco Antônio Záchia Ayub, principalmente pelo seu exemplo de cientista e ser humano. Obrigado por toda a dedicação e empenho para o meu crescimento profissional.

A professora Lilian Raquel Hickert, pela incansável dedicação e auxílio.

As professoras Patrícia Valente da Silva, Gertrudes Corção e Sueli Van Der Sand pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

Ao professor Saulo Fernandes de Andrade, encontro de uma grande amizade.

As professoras Suse Botelho da Silva e Nicole Teixeira Sehnem pela presteza disponibilizada em avaliarem este trabalho.

Aos colegas do BIOTECLAB, aos quais compartilhei meus dias de trabalho, os desafios e conquistas ao longo dos anos. Em especial à Mariana Fensterseifer, Dener Acosta, Bruna Vargas, Laura Benites, Diandra de Andrade e Rosiane Matias pelo convívio e cumplicidade nos últimos anos de trabalho. Aos colegas do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial ao Cristian Pinilla e ao Diogo Vargas pelo apoio e amizade.

As colegas e amigas Sabrina Gabardo, Adriane Mouro, Carla Matte, Lovaine Duarte, Luiza Aydos e Vera Massuti pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos amigos, em especial aos amigos desde a graduação, Luiz Gustavo Denardin, e Lucas Lucena Cardoso Casagrande.

Aos meus pais, Vicente e Santina pelo apoio, compreensão e estímulo a seguir sempre em frente.

Finalmente, agradeço a CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro, e a todos os cidadãos que lutam para a manutenção e aperfeiçoamento das políticas de ciência no Brasil.

## RESUMO

A exploração da biodiversidade de leveduras e o aperfeiçoamento do processo fermentativo são estratégias que podem gerar avanços que permitam a viabilização industrial da produção de etanol de segunda geração. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre as leveduras recentemente prospectadas da biodiversidade brasileira com capacidade de fermentar a glicose e xilose em etanol, bem como, desenvolver estratégias de fermentação de hidrolisados resultantes do tratamento ácido e tratamento enzimático da mistura 1:1 de casca de aveia com casca de soja buscando aperfeiçoar a produção de etanol a partir destes substratos. Na primeira etapa deste estudo, a capacidade de fermentação dos hidrolisados da mistura de casca de aveia com casca de soja pela levedura, recentemente prospectada, *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 foi avaliada em fermentações em biorreator de tanque agitado e o efeito do oxigênio na conversão da glicose e xilose em etanol foi investigado. Três diferentes condições de aeração do meio de cultura foram testadas (anaerobiose, 0,5 vvm e 1 vvm). Limitações na capacidade de fermentação dos açúcares foram observadas nas culturas em anaerobiose e os parâmetros de produção de etanol se mostraram dependentes da condição de aeração aplicada e da concentração de açúcar do hidrolisado. Os rendimentos de conversão ao etanol ( $Y_{EtOH/S}$ ) variaram de 0,23 até 0,40  $g \cdot g^{-1}$  e as produtividades volumétricas ( $Q_P$ ) variaram de 0,06 até 0,22  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$ . Na segunda etapa do estudo, a fermentação dos hidrolisados da mistura de casca de aveia com casca de soja foi testada em agitador rotacional, biorreator de tanque agitado e biorreator de células imobilizadas utilizando uma ampla diversidade de leveduras dos gêneros *Spathaspora*, *Scheffersomyces*, *Sugiymaella* e *Candida*, além de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para fermentar glicose e xilose em etanol. Altos rendimentos de conversão ao etanol foram atingidos com a levedura *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 tanto em microaerofilia (0,42  $g \cdot g^{-1}$ ) quanto em anaerobiose (0,43  $g \cdot g^{-1}$ ), superando, até mesmo, os rendimentos de *Sp. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 mostrados na etapa anterior. Aumentos consideráveis na produtividade volumétrica foram atingidos com células de *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> fermentando os hidrolisados suplementados com extrato de levedura cru, atingindo 0,30  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  na fermentação do hidrolisado resultante do tratamento ácido e 0,29  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  na fermentação do hidrolisado resultante do tratamento enzimático. A estabilidade das células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> foi testada em fermentações sequenciais de hidrolisados e o desempenho fermentativo se manteve estável por mais de 250 horas de fermentação. Na terceira etapa do estudo, *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469, a levedura que conferiu os melhores resultados ao longo deste trabalho, foi testada em fermentação com células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> em biorreator fluidizado e de leito fixo em cultura contínua na taxa de diluição de 0,05  $h^{-1}$ . O biorreator fluidizado mostrou melhores parâmetros fermentativos ( $Y_{EtOH/S}$  e  $Q_P$ ) operando em cultura contínua na taxa de diluição de 0,05  $h^{-1}$ . Aumentos na taxa de diluição do biorreator fluidizado (0,1 e 0,2  $h^{-1}$ ) em cultivo contínuo geraram altos valores de produtividade volumétrica de etanol, atingindo 1,69  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  na fermentação do hidrolisado resultante do tratamento ácido e 2,74  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  na fermentação do hidrolisado resultante do tratamento enzimático.

Palavras-chave: Biorrefinaria; casca de aveia; casca de soja; hidrólise ácida e enzimática, células imobilizadas; fermentação contínua.

## ABSTRACT

The exploration of yeast biodiversity and the improvement of the fermentation process are strategies that can generate advances that allow the industrial viability of second generation ethanol production. In this context, the present work aimed to deepen the knowledge of recently prospected yeasts from Brazilian biodiversity with the ability to ferment glucose and xylose into ethanol, as well as developing fermentation strategies of hydrolysates resulting from acid treatment and enzymatic treatment of the 1:1 mixture of oat hull and soybean hull, seeking to improve the production of ethanol from these substrates. In the first step of this study, the fermentation capacity of hydrolysates from the mixture of oat hull and soybean hull by the recently prospected yeast, *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 was evaluated in fermentations in a bioreactor stirred tank and the effect of oxygen on conversion of glucose and xylose to ethanol was investigated. Three different aeration conditions of the culture medium were tested (anaerobiosis, 0.5 vvm and 1 vvm). Limitations in the fermentation capacity of sugars were observed in anaerobic cultures and the parameters of ethanol production were shown to be dependent on the applied aeration condition and on the sugar concentration of the hydrolysates. The conversion yields to ethanol ( $Y_{EtOH/S}$ ) ranged from 0.23 to 0.40  $g \cdot g^{-1}$  and the volumetric productivity ( $Q_P$ ) ranged from 0.06 to 0.22  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$ . In the second stage of the study, the fermentation of hydrolysates from the mixture of oat hull and soybean hull was tested in a rotational shaker, bioreactor stirred tank and immobilized cell bioreactor using a wide variety of yeasts from the genera *Spathaspora*, *Scheffersomyces*, *Sugiymaella* and *Candida*, in addition to a strain of *Saccharomyces cerevisiae* genetically modified to ferment glucose and xylose into ethanol. High yields of conversion to ethanol were achieved with the yeast *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 both in microaerophilic (0.42  $g \cdot g^{-1}$ ) and in anaerobiosis (0.43  $g \cdot g^{-1}$ ), even surpassing the yields of *Sp. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 shown in the previous step. Considerable increases in volumetric productivity were achieved with cells immobilized of *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 in LentiKats<sup>®</sup> fermenting the hydrolysates supplemented with raw yeast extract, reaching 0.30  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  in the fermentation of the resulting hydrolysate of the acid treatment and 0.29  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  in the fermentation of the hydrolysate resulting from the enzymatic treatment. The stability of cells immobilized on LentiKats<sup>®</sup> was tested in sequential fermentations of hydrolysates and fermentation performance was stable for over 250 hours of continuous fermentation. In the third stage of the study, *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469, the yeast that gave the best results throughout this work, was tested in fermentation with cells immobilized in LentiKats<sup>®</sup> in a fluidized and packed-bed, in continuous culture in the dilution rate 0.05  $h^{-1}$ . The fluidized bioreactor showed better fermentation parameters ( $Y_{EtOH/S}$  and  $Q_P$ ) operating in continuous culture at a dilution rate of 0.05  $h^{-1}$ . Increases in the fluidized bioreactor dilution rate (0.1 and 0.2  $h^{-1}$ ) in continuous cultivation generated high values of volumetric ethanol productivity, reaching 1.69  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  in the fermentation of the resulting hydrolysate of the acid treatment and 2.74  $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$  in the fermentation of the hydrolysate resulting from the enzymatic treatment.

Keywords: Biorefinery; oat hull; soybean hull; acid and enzymatic hydrolysis; immobilized cells; continuous fermentation.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
NOMENCLATURA.....	11
1.INTRODUÇÃO.....	13
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Resíduos Lignocelulósicos.....	14
2.2 Biorrefinarias e processos de tratamento e conversão de açúcares dos resíduos lignocelulósicos.....	22
2.3 Produção de etanol em biorrefinarias.....	29
2.4 Produção de xilitol em biorrefinarias.....	31
2.5 Leveduras fermentadoras de xilose.....	32
2.5.1 Leveduras selvagens fermentadoras de xilose na produção de etanol de segunda geração.....	32
2.5.2 Leveduras geneticamente modificadas para fermentar xilose na produção de etanol de segunda geração.....	36
2.6 Tecnologias de fermentação.....	37
2.6.1 Características dos hidrolisados e influência no processo de fermentação..	37
2.6.2 Biorreatores e configurações para a produção de etanol.....	39
2.7 Imobilização celular.....	44
3. RESULTADOS.....	48
3.1 Conversion of fermentable sugars from hydrolysates of soybean and oat hulls into ethanol and xylitol by <i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG-CM-Y303.....	49
3.2 Performance of xylose-fermenting yeasts in oat and soybean hulls hydrolysate and improvement of ethanol production using immobilized cell systems.....	56
3.3 Continuous bioreactor bioprocess using immobilized <i>Spathaspora passalidarum</i> to ferment hydrolysates of oat and soybean hulls to ethanol.....	78
4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS .....	109
5. CONCLUSÕES.....	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial da geração de resíduos lignocelulósicos em milhões de toneladas. Adaptado de Bentsen e Elby (2010).....	15
Figura 2. Estimativa de produção de resíduos lignocelulósicos conforme o tipo de cultivo. Adaptado de Bentsen e Elby (2010).....	16
Figura 3. Componentes da parede celular da planta. Adaptado de Rocha-Meneses <i>et al.</i> (2020).....	17
Figura 4. Representação da molécula de celulose. Adaptado de Radford <i>et al.</i> (1996).....	17
Figura 5. Representação das regiões amorfas e cristalinas da celulose. Adaptado de Siqueira <i>et al.</i> (2010).....	18
Figura 6. Representação da hemicelulose. Adaptado de Santos <i>et al.</i> (2012).....	19
Figura 7. Estrutura química da lignina. Mandlekar <i>et al.</i> (2018).....	21
Figura 8. Representação esquemática dos processos realizados em uma biorrefinaria de lignocelulósicos. Adaptado de Kamm <i>et al.</i> (2006).....	24
Figura 9. Representação esquemática da ação das enzimas de despolimerização da celulose. Adaptado de Ojeda <i>et al.</i> (2011).....	28
Figura 10. Países e quantidade produzida de etanol. Adaptado de Maitah <i>et al.</i> (2020).....	30
Figura 11. Via metabólica da xilose em leveduras e bactérias. Adaptado de Jeppsson <i>et al.</i> (2006).....	34
Figura 12. Representação esquemática de um biorreator de tanque agitado STR. Disponível em Yang (2007).....	40
Figura 13. Biorreatores em coluna de células imobilizadas.....	42
Figura 14. Métodos de imobilização celular. Adaptado de Kourkoutas <i>et al.</i> (2004).....	45
Figura 15. Processo de difusão nas partículas de Lentikats <sup>®</sup> . Adaptado de Krasňan <i>et al.</i> (2016).....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais diferenças entre as moléculas de celulose e hemicelulose. Adaptado de Santos <i>et al.</i> (2012).....	20
Tabela 2. Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas.....	22
Tabela 3. Principais métodos de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos. Adaptada de OJEDA <i>et al.</i> (2011).....	25

## NOMENCLATURA

### Lista de Símbolos

$\text{CO}_2$	gás carbônico
$D$	taxa de diluição
g	grama
h	hora
$\text{H}_2\text{SO}_4$	ácido sulfúrico
L	litro
min	minuto
mL	mililitro
mg	miligramas
mm	milímetro
NaOH	hidróxido de sódio
$^{\circ}\text{C}$	graus Célsius
pH	potencial hidrogeniônico
$r_p$	taxa de formação de produto
rpm	rotações por minuto
t	tempo
$\mu\text{L}$	microlitro
$X$	concentração celular
$Y_{P/S}$	fator de conversão de substrato em produto
$Y_{etoh}$	rendimento de etanol
$Y_{xyl}$	rendimento de xilitol
$Q_{etoh}$	produtividade volumétrica de etanol
$Q_{xyl}$	produtividade volumétrica de xilitol

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CBS	<i>Centraalbureau voar Schimmelcultures</i>
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DO	Densidade Óptica
HMF	Hidroximetilfurfural
<i>XR</i>	Gene que codifica para a enzima xilose redutase
<i>XDH</i>	Gene que codifica para a enzima xilose desidrogenase
<i>XK</i>	Gene que codifica para a enzima xiloloquinase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SEAPPA	Secretaria da Agricultura, Agropecuária, Pesca e Agronegócio
UFMG-CM	Coleção de cultura da Universidade Federal de Minas Gerais
YMA	<i>Yeast morphology agar</i>

## 1. INTRODUÇÃO

Processos biotecnológicos estão recebendo mais atenção pelas diversas indústrias por serem processos mais sustentáveis quando comparados com a tecnologia química clássica. Uma tendência biotecnológica crescente é a produção de biocombustíveis, em que se destaca a tecnologia de fermentação para conversão de resíduos agrícolas ricos em açúcares no chamado etanol de segunda geração. Esta tecnologia é impulsionada pelas preocupações com a viabilidade do uso de combustíveis fósseis, o rápido aquecimento do planeta e a geração de resíduos.

A biomassa lignocelulósica contém a maior reserva de açúcares do planeta, sendo composta pelas frações de celulose, hemicelulose e lignina. A glicose compõe a fração da celulose e é o açúcar mais abundante do planeta; já a xilose, o segundo mais abundante, compõe a fração de hemicelulose. Os açúcares das frações de celulose e hemicelulose formam até 70% de toda a biomassa de angiospermas e podem ser uma fonte alternativa de substrato para a produção de etanol de segunda geração.

No contexto de fermentação, em escala industrial para a produção de etanol, as leveduras são os organismos mais adequados devido às vantagens: maior espessura de suas paredes celulares, exigências nutricionais menos rigorosas, maior tamanho de suas células, maior resistência à contaminação e melhor crescimento em pH ácido. Embora a glicose que compõe a biomassa lignocelulósica seja fermentada em etanol pela levedura *S. cerevisiae*, com rendimentos teóricos, a fermentação eficiente em etanol da xilose — principal componente da fração hemicelulósica — ainda é um desafio a ser superado para a conversão econômica da biomassa de lignocelulose em etanol. A descoberta de leveduras fermentadoras de xilose em novos nichos e a transformação genética de leveduras visando à rápida utilização de xilose passaram a ser exploradas na tentativa de viabilizar a produção de etanol de segunda geração.

Avanços no desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol de segunda geração foram alcançados, porém a consolidação da tecnologia ainda está distante. Nos últimos anos, novas abordagens para a obtenção de linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* foram reportadas e, também, novos gêneros e novas espécies de leveduras com capacidade de conversão de xilose em etanol foram descritos. No Brasil, novos gêneros e novas espécies de leveduras com tal capacidade foram isolados de diferentes biomas, sendo micro-organismos candidatos para a domesticação e aplicação direta na produção do etanol de segunda geração.

Apesar da disponibilidade de grande diversidade natural e artificial de leveduras com possibilidade de aplicação na produção de etanol de segunda geração, grande parte destas leveduras ainda não teve seu potencial fermentativo avaliado de forma mais profunda em fermentações sob condições controladas em biorreatores. Além disso, resíduos lignocelulósicos com alta geração mundial, como casca de soja e casca de aveia, precisam ter seus potenciais de uso na produção de etanol de segunda geração mais explorados. É preciso também estudar novas tecnologias de fermentação que gerem contribuições significativas para a melhoria do bioprocessamento de produção de etanol de segunda geração. Nesse contexto, o objetivo principal deste trabalho é investigar a fisiologia de novas leveduras fermentadoras de xilose isoladas da biodiversidade brasileira em fermentações de hidrolisado ácido e enzimático da mistura de casca de aveia e casca de soja, e estudar estratégias de fermentação com células imobilizadas para a melhoria dos parâmetros de produção de etanol e aumento da eficiência do bioprocessamento.

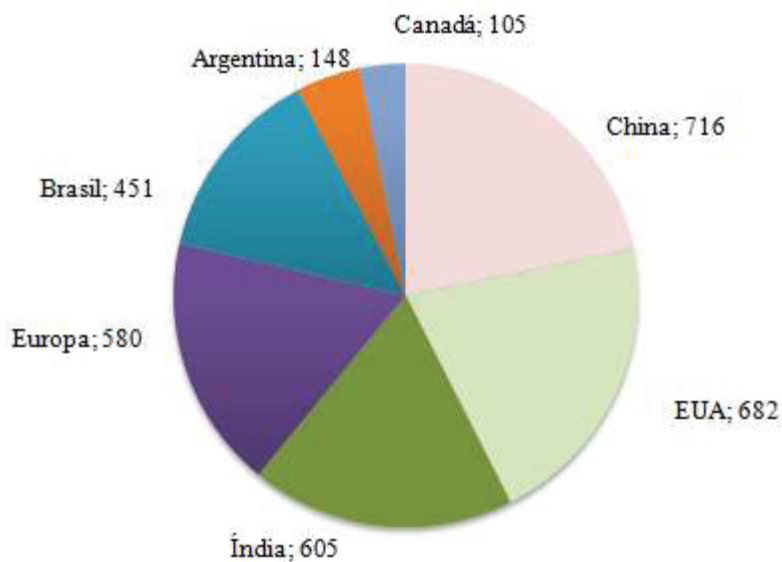
Os objetivos específicos são:

- ✓ Realizar triagem de leveduras isoladas da biodiversidade brasileira, selvagens ou geneticamente modificadas, em fermentações de hidrolisados de mistura de cascas de aveia e de cascas soja com alta pressão osmótica, estudando as respostas fisiológicas destas leveduras em diferentes condições de cultivo controladas em biorreator;
- ✓ Avaliar a viabilidade da tecnologia de imobilização celular em LentiKats<sup>®</sup> para a aplicação em fermentações de hidrolisados ácido e enzimático;
- ✓ Avaliar o efeito da suplementação dos hidrolisados e do cultivo com células imobilizadas, e a possibilidade de reúso das células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup>;
- ✓ Desenvolver um sistema de fermentação contínua com células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> para aumentar a eficiência do processo de produção de etanol de segunda geração.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Resíduos Lignocelulósicos

Biomassa lignocelulósica ou resíduo lignocelulósico é toda a matéria orgânica proveniente de fontes vegetais ou resíduos agroindustriais oriundos do processamento industrial da biomassa vegetal (KIM *et al.*, 2004). Estima-se que 3,3 Gigaton de resíduos agroindustriais são produzidos anualmente. O acúmulo desses resíduos em grandes quantidades traz prejuízos ao meio ambiente e também resulta na perda de materiais que podem ser potencialmente aproveitados (KIM *et al.*, 2004). Embora seja difícil encontrar na literatura científica uma estatística atualizada da produção mundial de resíduos lignocelulósicos, a Figura 1 mostra a distribuição média do potencial mundial de geração destes resíduos em alguns países e continentes em milhões de toneladas.

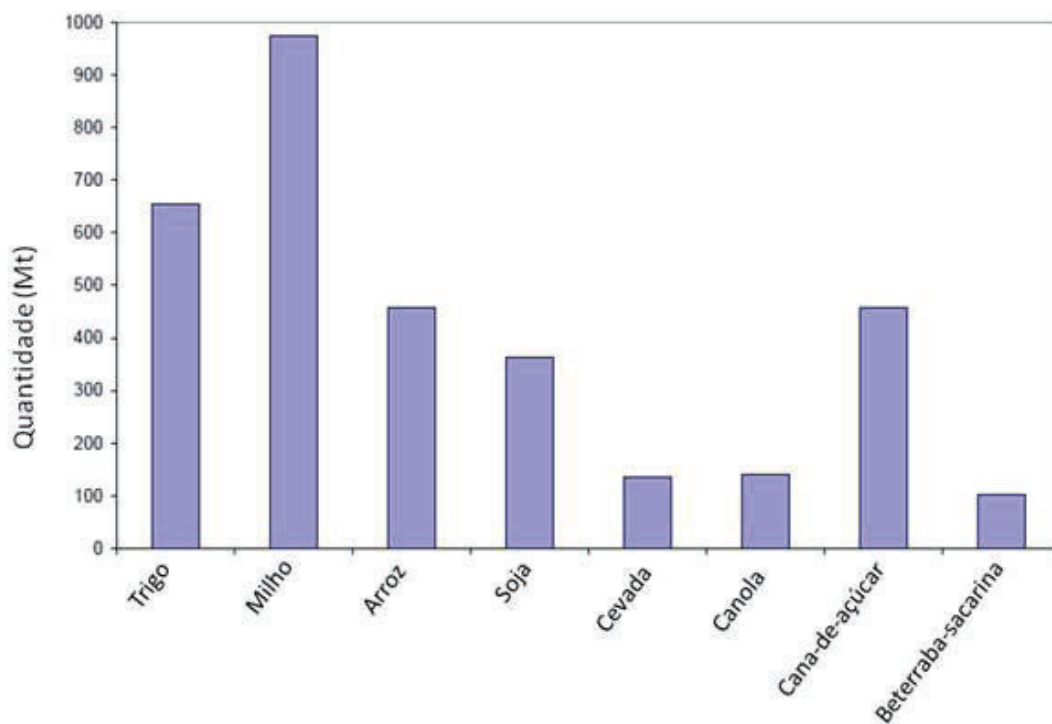


**Figura 1: Potencial da geração de resíduos lignocelulósicos em milhões de toneladas. Adaptado de Bentsen e Elby (2010).**

Já a Figura 2 mostra a estimativa de geração de resíduos agroindustriais de acordo com cada tipo de produção agrícola. A análise dos dados mostra que o milho tem um potencial residual de mais de 900 milhões de toneladas; e trigo e arroz têm um potencial residual de mais de 600 e 400 milhões de toneladas, respectivamente. Os potenciais de cana-de-açúcar e soja estão entre 450 e 350 milhões de toneladas, respectivamente (BENTSEN *et al.*, 2010). Outras culturas plantadas em menor proporção, como a aveia branca, que é cultivada em zonas temperadas no Noroeste da Europa, América do Norte, Ásia e em partes da América do

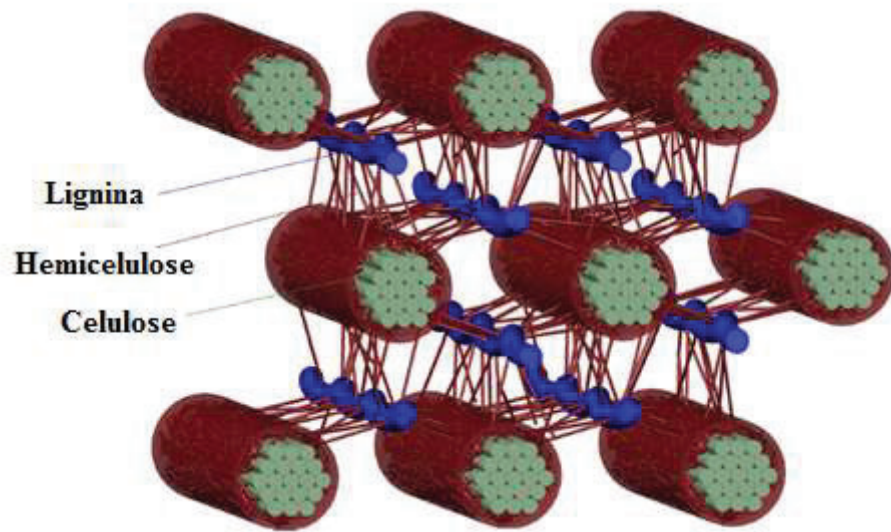


Sul (USDA, 2015), também produzem quantidades significativas de resíduos lignocelulósicos. Kim *et al.* (2004) afirmam que a cultura da aveia pode produzir, anualmente, mais de 10,6 milhões de toneladas de resíduos.



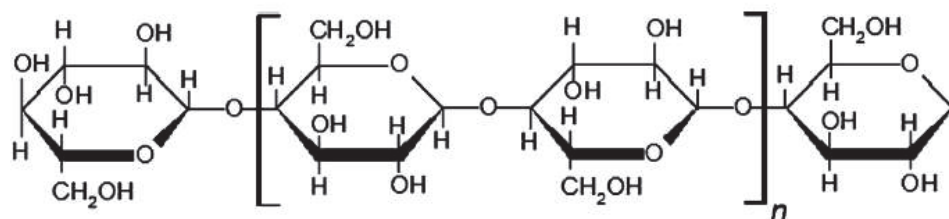
**Figura 2: Estimativa de produção de resíduos lignocelulósicos conforme o tipo de cultivo. Adaptado de Bentsen e Elby (2010).**

A biomassa lignocelulósica é composta, principalmente, pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose (aproximadamente, 70% da massa seca) intercalados por lignina, que é uma macromolécula composta de álcoois aromáticos, cujo teor tende a aumentar com o envelhecimento das plantas (TEJADO *et al.*, 2007). As frações de lignina, hemicelulose e celulose estão unidas fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes (TEJADO *et al.*, 2007). A Figura 3 mostra os componentes da parede célula dos vegetais: celulose, hemicelulose e lignina, há, também, componentes em quantidade muito menores, como a pectina, a qual tem a função de cimentação intercelular. A pectina atua de forma conjunta com outros polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, e, quando hidrolisada, gera ácido glucorônico (PELLOUX *et al.*, 2007).



**Figura 3: Componentes da parede celular da planta. Adaptado de ROCHA-MENESES *et al.* (2020).**

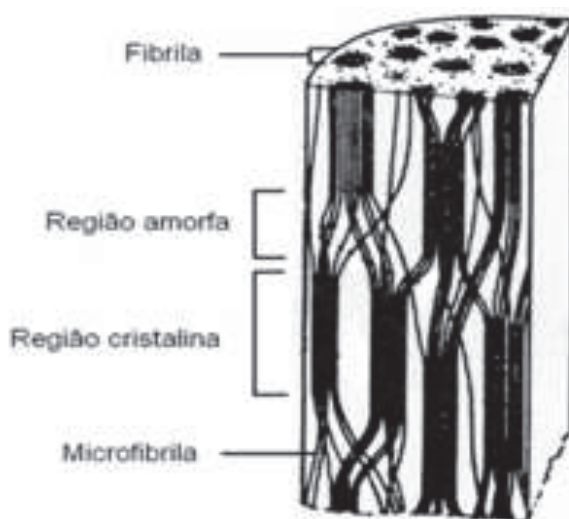
Dentre os componentes da parede célula das plantas, a celulose é o mais predominante, sendo caracterizada como um polímero linear de monômeros de D-glicose ligados por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas que podem conter mais de 10.000 unidades de glicose (CHENG *et al.*, 2011). As cadeias de celulose são reticuladas por fortes ligações de hidrogênio para formar microfibrilas de celulose (VAN DYK *et al.*, 2012). Uma representação esquemática da molécula de celulose é mostrada na Figura 4.



**Figura 4: Representação da molécula de celulose. Adaptado de Radford *et al.* (1996).**

A celulose exibe uma região cristalina muito recalcitrante à decomposição e uma pequena parte de celulose amorfa, a qual é mais fácil de se decompor (H.P.S *et al.*, 2014). A orientação das microfibrilas de celulose na parede celular tem um forte efeito sobre as propriedades estruturais de vários tipos de plantas (ABDUL KHALIL *et al.*, 2012), conforme é

representado na Figura 5, em que estão ilustradas as regiões cristalinas e as regiões amorfas da celulose. Naturalmente, as moléculas de celulose se apresentam como feixes que se agregaram na forma de microfibrilas, isto é, em regiões cristalinas e amorfas (TAHERZADEH *et al.*, 2008). A composição de celulose varia muito se for madeira de lei, madeira branca ou gramínea. Por exemplo, madeiras duras têm uma quantidade maior de hemicelulose quando comparadas com resíduos de caules (ABDUL KHALIL *et al.*, 2012). A celulose é um componente estrutural importante das paredes celulares das plantas, pois é responsável pela resistência mecânica (ANWAR *et al.*, 2014).

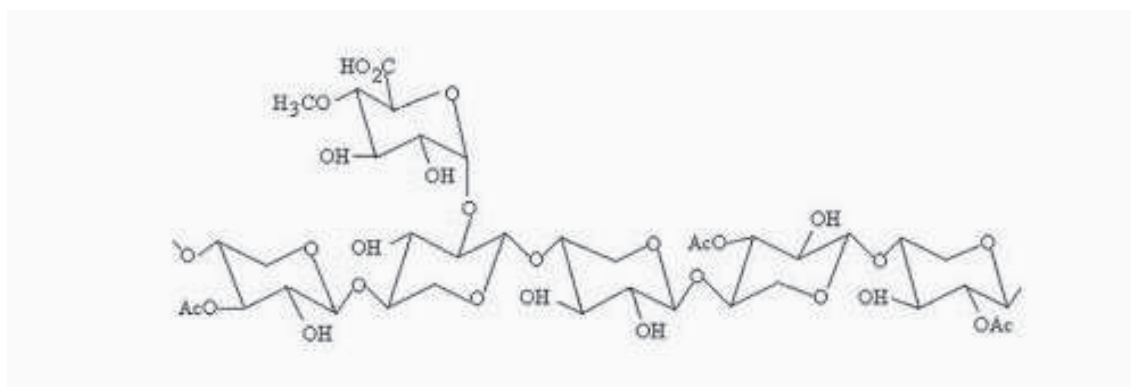


**Figura 5: Representação das regiões amorfas e cristalinas da celulose. Adaptado de Siqueira *et al.* (2010).**

Já a hemicelulose é um complexo heteropolímero composto por diversos açúcares que formam uma rede altamente ramificada. Os monossacarídeos estão ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4; formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de açúcar, a partir do qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. A hemicelulose tem estrutura com ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (OGEDA *et al.*, 2010; RAMOS, 2003; SANTOS *et al.*, 2012). As moléculas que compõem a fração de hemicelulose consistem em cerca de 100 a 200 unidades de açúcar. Dentre os açúcares que compõem a fração de hemicelulose, estão: hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e alguns ácidos de açúcares, como ácidos D-glucurônico, D-galacturônico e 4-O-metil-D-glucurônico (CHENG *et al.*, 2011; MICHELIN *et al.*, 2014).

Apesar da diversidade de composição, as moléculas de D-xilose são o principal componente da hemicelulose, unidas entre si por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (GÍRIO, F. *et al.*, 2010; LIMAYEM *et al.*, 2012).

A função principal das hemiceluloses é atuar como um agente de ligação entre a lignina e celulose. Sua ligação covalente à lignina e sua interação não covalente com a celulose são fundamentais na manutenção da integridade da celulose *in situ* e ajudam a proteger as fibras contra a degradação por celulases produzida por micro-organismos (MICHELIN *et al.*, 2014). Além disso, toda a hemicelulose possui cadeias laterais constituídas de ácido acético, ácidos hexurônicos e deoxihexoses, responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água e em álcalis (MENEZES, 2007). A Figura 6 mostra a representação da molécula de hemicelulose.



**Figura 6: Representação da hemicelulose. Adaptado de Santos *et al.* (2012).**

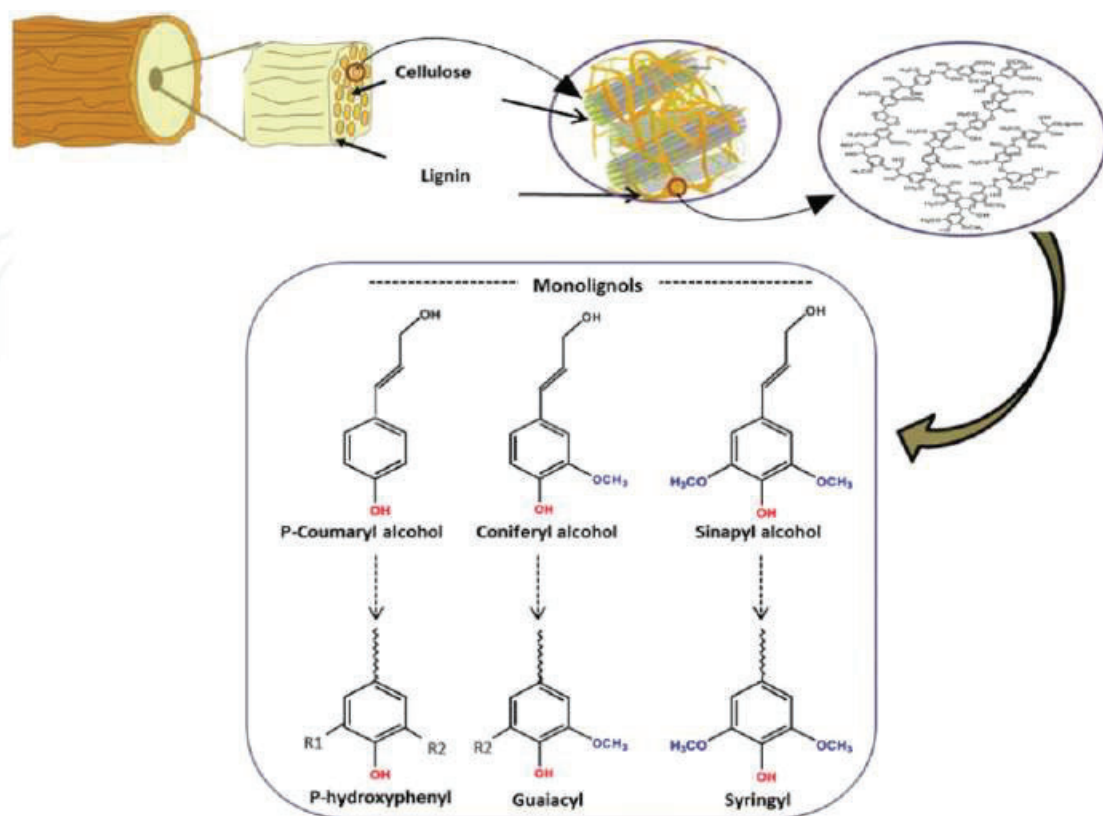
A Tabela 1 mostra as comparações entre as diferentes propriedades das moléculas de celulose e hemicelulose.

**Tabela1: Principais diferenças entre as moléculas de celulose e hemicelulose.**

Adaptado de Santos *et al.* (2012)

<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>
Consiste em unidades de glicose ligadas entre si	Consiste em várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização: 1000-1500 monômeros	Baixo grau de polimerização: 50-300 monômeros
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões cristalinas e amorfas	Apresenta somente regiões amorfas
É degradada de forma lenta por ácido orgânico diluído à quente	É degradada de forma rápida por ácido inorgânico diluído à quente
É insolúvel em álcalis	É solúvel em álcalis

O terceiro componente da parede celular é a lignina, a qual é uma molécula altamente polimerizada, mas bastante amorfa quando comparada às frações supradescritas (AITKEN, 2012). Lignina é um biopolímero aromático complexo hidrofóbico reticulado com um peso molecular de 10.000 Dalton (LIMAYEM *et al.*, 2012; MIELENZ, 2001), composto por três grandes componentes fenólicos, nomeados álcool p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (MENON *et al.*, 2012). Sua proporção varia entre diferentes plantas, tecidos de madeira e camadas da parede celular (MENON *et al.*, 2012). Plantas mais antigas e mais lenhosas contêm níveis mais altos de lignina depositada nas paredes celulares para fornecer rigidez e resistência, conferindo impermeabilidade às paredes celulares e formando uma barreira físico-química contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo (VAN DYK *et al.*, 2012). Por isso, a lignina é o componente de material lignocelulósico mais recalcitrante à degradação (HIMMEL *et al.*, 2007). A Figura 7 mostra a estrutura química da lignina.



**Figura 7: Estrutura química da lignina. Mandlekar *et al.* (2018).**

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono da natureza e é, ainda, o maior depósito natural de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se uma fonte potencial de moléculas a serem aproveitadas em biorrefinarias (MANDLEKAR *et al.*, 2018). Existem diferenças na composição estrutural da lignina entre angiospermas e gimnospermas (FUKUSHIMA *et al.*, 2003; ZIEGLER *et al.*, 2004). Existe também uma grande variação na composição monomérica de ligninas de diferentes espécies, órgãos, tecidos e, até mesmo, de frações da parede celular (SANTOS *et al.*, 2012).

De uma maneira geral, o teor de celulose da biomassa vegetal pode variar de 30 a 50%, o de hemicelulose varia de 15 a 35% e o de lignina 10 a 20% (GÍRIO, F. M. *et al.*, 2010; MIELENZ, 2001). A Tabela 2 mostra a composição de celulose hemicelulose e lignina de alguns resíduos lignocelulósicos já publicados na literatura. A dissociação destas estruturas em monômeros de açúcares é estudada há alguns anos devido ao potencial para o aproveitamento destas moléculas que são de grande abundância na natureza.

**Tabela 2: Composição química de biomassas lignocelulósicas.**

Resíduo Lignocelulósico	Composição			Referências
	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	
Ácer	40,9	19,4	29,1	Kim <i>et al.</i> 2011
Álamo híbrido	4,38	14,9	29,1	Kim <i>et al.</i> 2011
Algodão (talo)	5,85	14,4	21,5	Jiménez <i>et al.</i> 2007
Amêndoa (casca)	2,68	32,5	27,4	Nabarlatt <i>et al.</i> 2007
Arroz (casca)	36,7	20,0	21,3	Garrote <i>et al.</i> 2007
	33,6	37,2	19,3	Kim <i>et al.</i> 2008
	29,7	19,6	24,6	Nabarlatz <i>et al.</i> 2007
	36,7	20,0	21,3	Parajó <i>et al.</i> 2004
Bambu	50,4	24,2	23,4	Alves <i>et al.</i> 2010
Banana	13,2	14,8	14,0	John <i>et al.</i> 2006
Cana-de-açúcar (bagaço)	43,1	32,3	23,2	Alves <i>et al.</i> 2010
	44,7	36,9	11	Son and Wei 2010
Canola	27,3	21,9	14,2	Petersson <i>et al.</i> 2007
Centeio	40,8	26,1	16,1	Petersson <i>et al.</i> 2007
Cevada (casca)	21,4	36,6	19,2	Parajó <i>et al.</i> 2004
Cevada (palha)	30,8	25,3	16,7	Nabarlatz <i>et al.</i> 2007
Eucalipto	46,7	20,7	29,2	Alves <i>et al.</i> 2010
	46,6	25,8	22,9	Parajó <i>et al.</i> 2004
Faba bean	28,4	20,4	14,4	Petersson <i>et al.</i> 2007
Girassol (talo)	4,21	29,7	13,4	Jiménez <i>et al.</i> 2007
	34,3	37,2	17,7	Garrote <i>et al.</i> 2007
	34,3	40,6	18,8	Garrote <i>et al.</i> 2007
	35,4	35,1	14,8	Michelin <i>et al.</i> 2012
	38,5	36,8	18,7	Nabarlatz <i>et al.</i> 2007
Oliveira	34,4	40,8	18,8	Parajó <i>et al.</i> 2004
	25,0	18,3	16,6	Cara <i>et al.</i> 2008
Sorgo (palha)	3,51	24	25,4	Vuez <i>et al.</i> 2007
	39,7	36,5	17,3	Jiménez <i>et al.</i> 1990
Trigo (Palha)	31,5	25,2	15,9	Nabarlatz <i>et al.</i> 2007
	37,4	33,8	19,4	Ruiz <i>et al.</i> 2011a
	48,6	27,7	8,2	Saba <i>et al.</i> 2005
Videira (ramos)	41,1	26,0	20,3	Jiménez <i>et al.</i> 2007

## 2.2 Biorrefinarias e processos de tratamento e conversão de açúcares dos resíduos lignocelulósicos

O conceito de biorrefinaria surgiu na busca do aproveitamento da biomassa vegetal para a transformação em produtos de valor agregado. A biorrefinaria é uma instalação que integra os processos e equipamentos para a conversão de biomassa vegetal para produção de combustíveis, produtos químicos e energia (SRIVASTAVA *et al.*, 2014). Segundo Pereira



Junior *et al.* (2008), uma biorrefinaria utiliza matérias-primas renováveis, ou seja, a biomassa e seus resíduos, de maneira integral e diversificada para a produção, por meio de rota química ou biotecnológica, de uma variedade de substâncias e energia com o mínimo de emissões e de geração de resíduos.

Entre as razões que levaram à criação das biorrefinarias estão a necessidade de compensar o aumento contínuo dos preços dos recursos fósseis, a disponibilidade incerta desses, e as preocupações ambientais causadas pela exploração de combustíveis fósseis (NREL, 2008). Demirbas (2009) afirma que o aspecto mais interessante do conceito de biorrefinaria é que quase todos os tipos de biomassa podem ser convertidos em diferentes classes de biocombustíveis e bioquímicos por meio de tecnologias de conversão aplicadas em conjunto. Segundo Alvim *et al.* (2014), fica evidente que o conceito de biorrefinaria é muito abrangente e engloba todas as vertentes de uso da biomassa, seja para produção de biocombustíveis seja para a produção de outros produtos de interesse da indústria.

As vantagens das biorrefinarias são inúmeras: ao produzir diversos produtos, as biorrefinarias podem explorar o potencial máximo das biomassas e agregar maior valor possível a estas; aumentando a rentabilidade, reduzindo a demanda energética e, por consequência, reduzindo a emissão de gases do efeito estufa (SAINI *et al.*, 2019). Além disso, uma maior sustentabilidade no uso racional da biomassa, como no caso do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, reduz a competição existente entre o uso de biomassa para a produção de alimentos e de combustíveis. (GHATAK, 2011).

Nesse contexto, SAINI *et al.* (2019) apontam três diferentes categorias de biorrefinarias:

1) biorrefinarias de culturas, cujo objetivo é processar e consumir grãos integrais para a obtenção do produto desejado. Pode-se mencionar a produção de etanol a partir de milho como um exemplo de processo realizado neste tipo de biorrefinaria, em que processo de conversão de biomassa e energia é iniciado por processos mecânicos de separação da biomassa em diferentes componentes que são tratados separadamente;

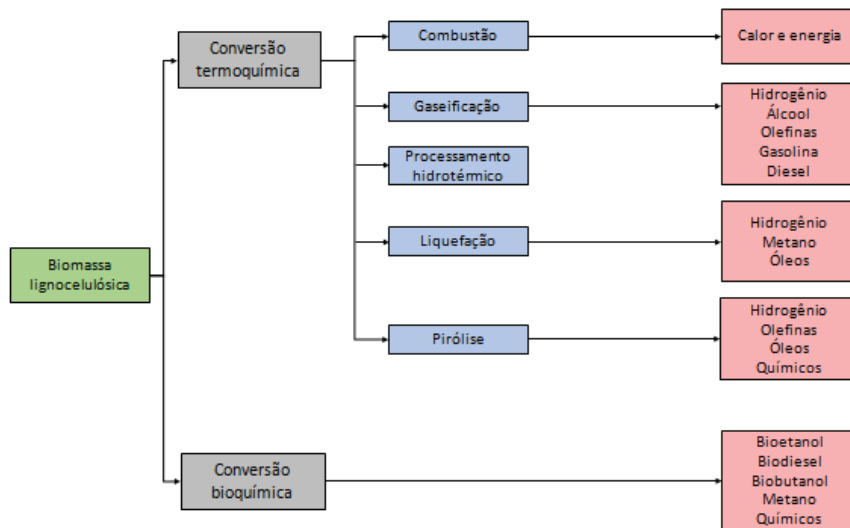
2) biorrefinarias verdes, em que é utilizada a biomassa verde, como, por exemplo, plantas e grãos verdes para a produção de produtos químicos como ácido lático e aminoácidos, ou energia a partir da geração de biogás;

3) biorrefinaria de matérias-primas lignocelulósicas, em que é utilizada biomassa renovável para a produção de uma variedade de produtos por meio de uma combinação de tecnologias, sendo essa biomassa composta por três frações químicas básicas — hemicelulose,



celulose e lignina.

A biorrefinaria de lignocelulósicos é bastante vantajosa já que as fontes lignocelulósicas são encontradas em abundância e não são utilizadas como alimento pelos seres humanos (GHATAK, 2011). A segunda geração de biocombustíveis utiliza, principalmente, materiais lignocelulósicos para a produção de combustíveis líquidos (etanol e butanol) ou combustíveis gasosos (hidrogênio ou metano) (SAINI *et al.*, 2019). A Figura 8 mostra os processos que ocorrem em uma biorrefinaria de biomassas lignocelulósicos.



**Figura 8: Representação esquemática dos processos realizados em uma biorrefinaria de lignocelulósicos. Adaptado de Kamm *et al.* (2006).**

Em uma biorrefinaria, vários processos podem ser utilizados para aproveitar os componentes da biomassa lignocelulósica. Entre os processos que ocorrem em uma biorrefinaria, está o processo bioquímico, que é utilizado para transformar os açúcares liberados pela biomassa lignocelulósica hidrolisada em produtos de valor agregado, como etanol, xilitol, ácido lático, e 2,3 butanodiol (CORTIVO *et al.*, 2018; OURIQUE *et al.*, 2020). Para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos em biorrefinaria por processos bioquímicos, é necessário que estes passem por pré-tratamentos. Segundo Isikgor *et al.* (2015), uma biorrefinaria lignocelulósica ideal aplicaria processos universais para a solubilização dos açúcares e lignina, e, depois, processos específicos seriam aplicados para a

conversão em diferentes produtos de interesse, porém, devido à enorme variação dos materiais lignocelulósicos, se torna difícil encontrar um projeto de processo geral para uma biorrefinaria.

Para que os açúcares das biomassas lignocelulósicas possam ser aproveitados por processos fermentativos, é necessário que eles estejam livres para o ataque dos micro-organismos no processo fermentativo. Inúmeros métodos para o pré-tratamento e solubilização dos açúcares da biomassa lignocelulósica foram desenvolvidos, e, também, métodos para o aproveitamento da lignina em processos fermentativos (MANDLEKAR *et al.*, 2017). Quanto aos pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos, uma característica comum a todos os métodos é que previamente o material lignocelulósico deve ser mecanicamente quebrado ou moído a fim de aumentar a área superficial (LJUNGDAHL *et al.*, 1985). A Tabela 3, abaixo, resume os principais métodos de pré-tratamento que são aplicados nas biomassas lignocelulósicas para a solubilização dos açúcares, apresentando as vantagens e desvantagens de cada.

**Tabela 3: Principais métodos de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos. Adaptada de OJEDA *et al.* (2011)**

<b>Método</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Ácido concentrado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <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>✓ Problemas de corrosão dos equipamentos</li> </ul>
<b>Ácido diluído</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Método de duas etapas: bom rendimento de glicose e de açúcares de hemicelulose</li> <li>✓ Menos problemas com corrosão quando comparado ao ácido concentrado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Formação de produtos de degradação</li> <li>✓ Necessidade de reatores mais sofisticados para a obtenção de altos rendimentos</li> <li>✓ Concentração baixa de açúcar no fluxo de saída</li> </ul>

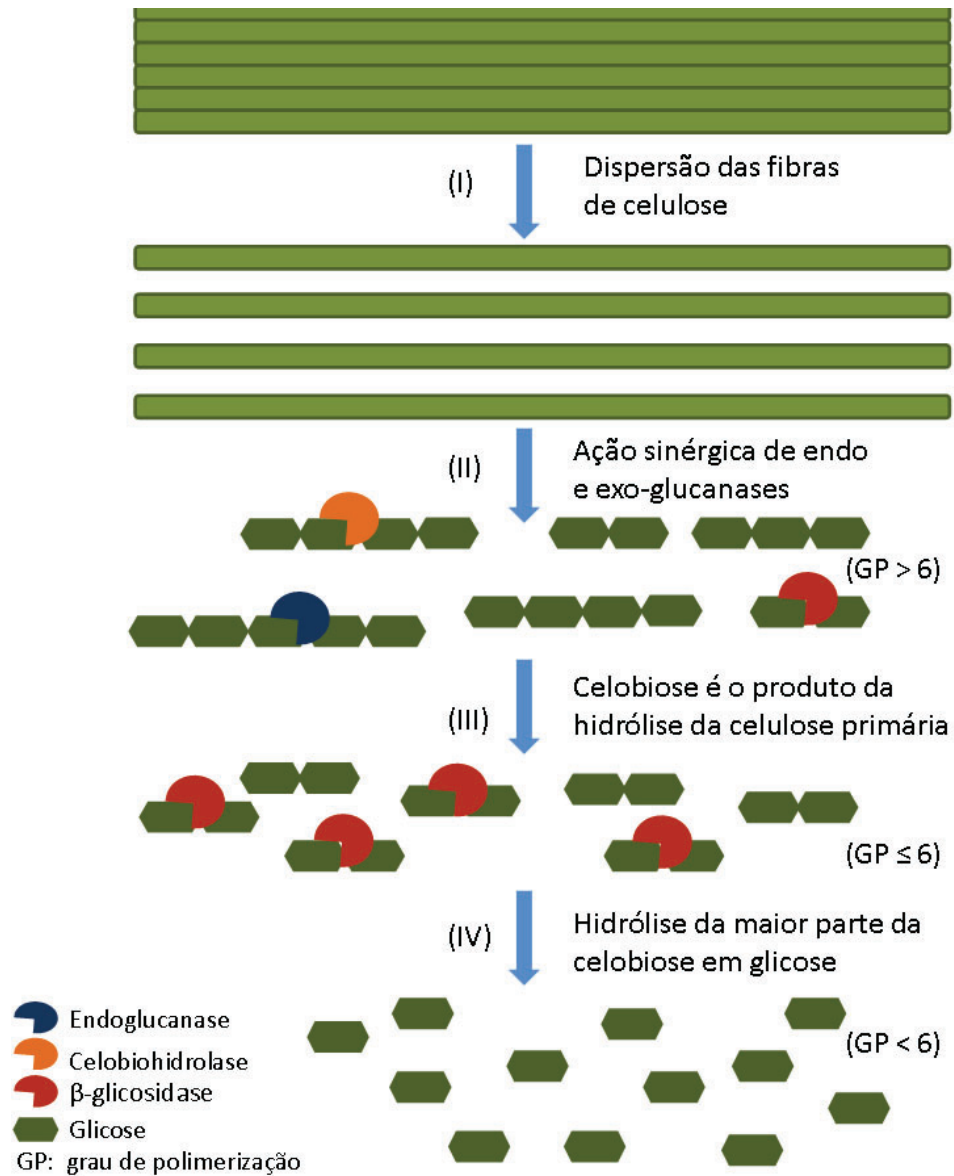
<b>Líquidos Iônicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Reuso do líquido iônico após o processo</li> <li>✓ Substrato final com digestibilidade &gt;90%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ O líquido iônico deve ser completamente retirado antes da hidrólise (interfere na atividade hidrolítica das enzimas)</li> <li>✓ Alto custo dos líquidos iônicos</li> </ul>
<b>Explosão à Vapor</b>	<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>✓ Etapa adicional é necessária para a remoção da lignina</li> </ul>
<b>Uso de Fungos ou bactérias</b>	<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 um pouco do carboidrato disponível – menor rendimento de açúcar</li> </ul>

O pré-tratamento com ácido diluído é um dos mais aplicados, pois, além de realizar o pré-tratamento da biomassa com diminuição da cristalinidade da celulose e retirada da lignina solúvel (OJEDA *et al.*, 2009), ocorre a liberação dos açúcares da fração de hemicelulose, os quais podem ser aproveitados. Como a hemicelulose é amorfa, condições menos severas são necessárias para liberar os açúcares desta fração e rendimentos de 80-90% dos açúcares podem ser recuperados da fração da hemicelulose com temperaturas em torno de 160°C, tempos de reação de cerca de 10 min e níveis ácidos de 0,7% (BORNEMAN *et al.*, 1984). Após o tratamento com ácido, aproximadamente, 90% da celulose sólida restante pode ser digerida enzimaticamente para produzir glicose. Este desempenho motiva o uso de ácido sulfúrico diluído na hidrólise ácida para aplicações em curto prazo (LIU *et al.*, 1987; LI *et al.*, 1991). Apesar desta vantagem, neste processo, pode haver a degradação dos açúcares, em que produtos da degradação podem ser formados, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF). De uma maneira geral, a degradação dos açúcares liberados pode ser modesta o suficiente para recuperar cerca de 80-90% do máximo possível de açúcares (BORNEMAN *et al.*, 1983).

Após passar pelo processo de pré-tratamento pela hidrólise ácida, a fração de celulose fica suscetível ao ataque das enzimas do complexo da celulase, a hidrólise da celulose também pode ser dada em água pura espontaneamente, porém este processo é muito

lento e precisa ser acelerado pela adição de enzimas celulases. A remoção de hemicelulose aumenta o rendimento da hidrólise enzimática de celulose (GROHMANN, *et al.*, 1985; SADDLER, *et al.*, 1985). Ligninas também devem ser removidas porque a enzima celulase adsorve sobre elas (CLARK *et al.*, 1989). Estes pré-requisitos são previamente atendidos pelo tratamento com ácido diluído que retira a lignina solúvel e a hemicelulose.

As enzimas que digerem a celulose, celulases, são complexos enzimáticos cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endoglucanases – que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exoglucanases ou celobio-hidrolases – responsáveis pela ação nos terminais gerando a celobiose – e as  $\beta$ - glucosidades, que hidrolisam a celobiose à glicose. A Figura 9 é uma representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas celulases. A atividade catalítica pode ser medida por meio da análise dos produtos da degradação da celulose, ou seja, celobiose e glicose (OJEDA *et al.*, 2011).



**Figura 9: Representação esquemática da ação das enzimas de despolimerização da celulose. Adaptado de Ojeda *et al.* (2011).**

O sistema da celulase do fungo *Trichoderma reesei* foi o primeiro sistema fúngico a ser utilizado na produção industrial de celulase, permanecendo ainda como a fonte mais utilizada devido a vantagens, como o sinergismo entre a ação das endoglucanases e celobio-hidrolases, gerando a hidrólise completa da celulose com baixa presença de celobiose no meio (OJEDA *et al.*, 2011). Recentemente, Cortivo *et al.* (2018) relataram que um coquetel comercial CELLUCLAST 1.5 ® (Novozymes), que tem atividades de cinco endoglucanases-exo-glucanases (conversão de celulose em celobiose) e duas atividades de β-glicosidase (conversão de celobiose em glicose) originário do fungo *Trichoderma reesei*, demonstrou alta

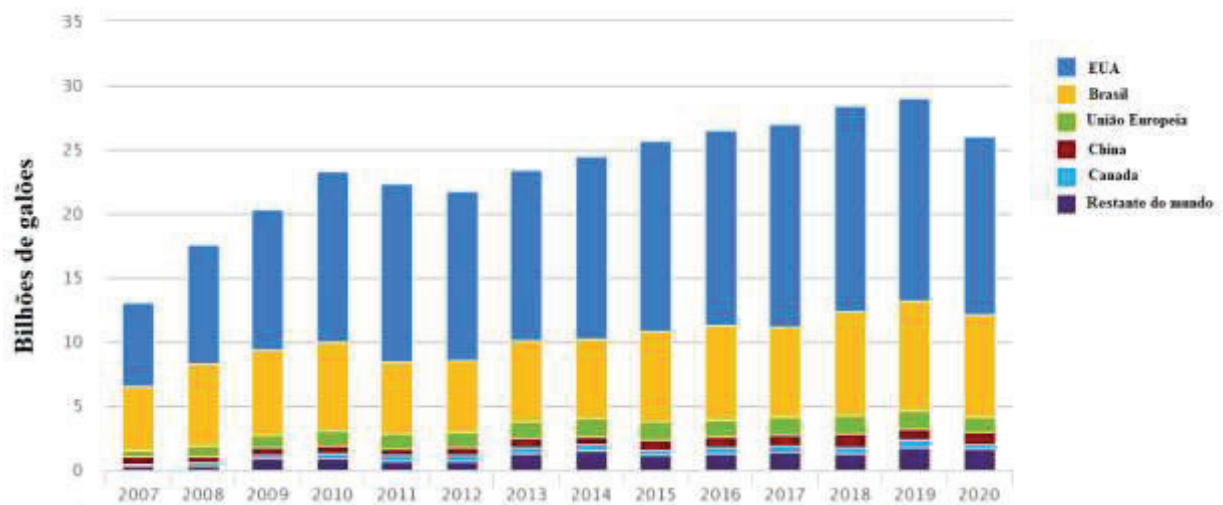
eficiência de sacarificação da mistura de casca de aveia e de casca de soja pós-hidrólise ácida. Este coquetel enzimático também foi reportado na sacarificação de outras biomassas lignocelulósicas, como de bagaço da cana e palha de trigo (SANTOS *et al.*, 2010).

Na produção industrial de celulasas, as pesquisas centraram-se em mutação e seleção de melhores descendências para a produção de enzimas em escala industrial. Além de celulasas de fungos, há celulasas que são produzidas por bactérias aeróbicas e anaeróbicas (OJEDA *et al.*, 2011), mas estas são menos empregadas. Uma característica geral das celulasas é que elas apresentam maior atividade na faixa de temperatura de 60 a 70°C e pH entre 4,5 e 5 (TÉBÉKA *et al.*, 2009), por isso a grande maioria dos estudos de sacarificação opera nestas faixas de temperatura e de pH. O aquecimento pode favorecer a diminuição da cristalinidade e a mobilidade da água de hidratação durante a hidrólise da celulose (TÉBÉKA *et al.*, 2009).

### **2.3 Produção de etanol em biorrefinarias**

O etanol, um dos principais produtos produzidos em uma biorrefinaria, pode ser classificado em etanol de primeira geração, segunda ou terceira geração. A base desta classificação é o substrato utilizado para sua produção (FARRELL *et al.*, 2006). A produção de etanol de primeira geração utiliza como substrato a biomassa amilácea e sacarínea. No Brasil, utiliza-se o caldo da cana-de-açúcar, já no Estados Unidos, é utilizado o amido de milho, e, na Europa, a sacarose da beterraba (FARRELL *et al.*, 2006). O etanol de primeira geração é uma tecnologia consolidada e a produção já é realizada em escala industrial. Já a produção de etanol de segunda geração emprega como substrato os açúcares que compõem a biomassa lignocelulósica, e, para a produção de etanol de terceira geração, utiliza-se como substrato a biomassa de algas (TAN *et al.*, 2008). A tecnologia de produção de etanol tanto de segunda quanto de terceira geração ainda precisa ser consolidada.

Atualmente, a produção de etanol no Brasil ocorre em larga escala, e o país é o segundo maior produtor mundial de álcool combustível, atrás apenas dos Estados Unidos (SHIKIDA *et al.*, 2012). A Figura 10 demonstra os países produtores de etanol com a quantidade produzida em cada local em milhões de litros.



**Figura 10: Países e quantidade produzida de etanol. Adaptado de Maitah *et al.* (2020).**

O etanol brasileiro é feito a partir do beneficiamento da cana-de-açúcar, e este processo é mais eficiente que o processo de produção utilizado nos Estados Unidos a partir do amido de milho (BENTSEN *et al.*, 2010). A principal razão é a produtividade da cana-de-açúcar, uma vez que a quantidade de biomassa produzida por unidade de área plantada de cana-de-açúcar é significativamente superior àquela de qualquer outro vegetal que pode ser usado como biomassa energética. A beterraba, utilizada na Europa, sob tal perspectiva, também é pouco recomendável (BENTSEN *et al.*, 2010).

Mundialmente, o aumento da demanda de etanol é causado, principalmente, pela significativa diminuição do uso do petróleo. A fim de evitar que haja limite de oferta, bem como, a competição pelo uso da terra para a geração de energia e para produção de alimentos, especialmente em locais que não dispõem de clima favorável ou extensão territorial para cultivo, torna-se necessário investir no desenvolvimento de tecnologias de segunda geração de produção de etanol. Essa nova tecnologia representa uma alternativa para o uso energético da biomassa, apresentando vantagens ambientais e econômicas.

As matérias-primas usadas para a produção do etanol de segunda geração são resíduos agroindustriais e florestais. A principal vantagem das biorrefinarias de segunda geração é a

não concorrência com alimentos ou terras agrícolas para alimentação humana ou animal (GUPTA *et al.*, 2015). Além disso, o aproveitamento desses resíduos é um método alternativo para algumas das estratégias convencionais de gerenciamento de resíduos sólidos, como aterro ou queima (BENTSEN *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2004a).

Comparativamente, a consolidação da tecnologia de produção de etanol de segunda geração permitiria aumentar a produção de etanol de cana, com a mesma área plantada, em 200%, devido ao aproveitamento do bagaço e da palha (GUPTA *et al.*, 2015); além da possibilidade de aproveitamento de inúmeros outros resíduos lignocelulósicos, como cascas de soja, cascas e palha de arroz e sabugo de milho. O desenvolvimento tecnológico do etanol de segunda geração não exclui a tecnologia em uso, ambas podem coexistir e ser complementares. É possível continuar com os avanços da tecnologia de etanol de primeira geração e atingir grandes ganhos com tecnologias em desenvolvimento de etanol de segunda geração (GUPTA *et al.*, 2015).

#### **2.4 Produção de xilitol em biorrefinarias**

O xilitol é um álcool de cinco carbonos com várias propriedades biológicas, sendo uma das mais importantes a doçura relativa equivalente à sacarose, com quase um terço a menos do conteúdo calórico. Possui também propriedades farmacológicas, como prevenção de cárie e também é usado como substituto do açúcar para diabéticos (DASGUPTA *et al.*, 2017; MAGUIRE *et al.*, 2003). A demanda industrial por xilitol aumenta anualmente, mantendo um alto valor de mercado (LINGA *et al.*, 2016; PAL *et al.*, 2016). A produção industrial de xilitol ainda ocorre por hidrogenação catalítica de uma solução pura de D-xilose, o que requer uma aplicação de alta energia, fazendo com que o processo tenha custo elevado (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Diante desse problema, a produção de xilitol pela rota biotecnológica, utilizando a xilose presente na fração hemicelulose dos resíduos como substrato, tornou-se uma alternativa interessante.

Para a utilização da via biotecnológica de produção de xilitol, é necessário utilizar algum micro-organismo como biocatalisador, as leveduras são os organismos mais adequados para este processo (DASGUPTA *et al.*, 2017). A produção de xilitol por leveduras é dada em uma única etapa: ocorre a redução de xilose que é convertida em xilitol via xilose redutase, e o xilitol é secretado para fora da célula ou oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, em que, posteriormente, será convertida em etanol. A dependência e o



equilíbrio dos cofatores das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase são o fator crucial para a excreção do xilitol e está relacionado a aspectos genéticos e fisiológicos das leveduras, ou às condições de cultura (GUAMAN-BURNEO *et al.*, 2015; JUNYAPATE *et al.*, 2013).

Existem leveduras cujo principal produto de fermentação da xilose é o xilitol, como muitas leveduras do gênero *Candida*. As espécies *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. mogii* demonstraram ser produtoras eficientes de xilitol (ONISHI e SUZUKI 1969; (BARBOSA *et al.*, 1988; GUO *et al.*, 2006; MAYERHOFF *et al.*, 1997). Entretanto, na fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica pela maioria das leveduras, ocorre algum desvio do fluxo de carbonos que iria para o etanol formando xilitol, que, muitas vezes, é subproduto indesejável (DASGUPTA *et al.*, 2017).

## **2.5 Leveduras fermentadoras de xilose**

### **2.5.1 Leveduras selvagens fermentadoras de xilose na produção de etanol de segunda geração**

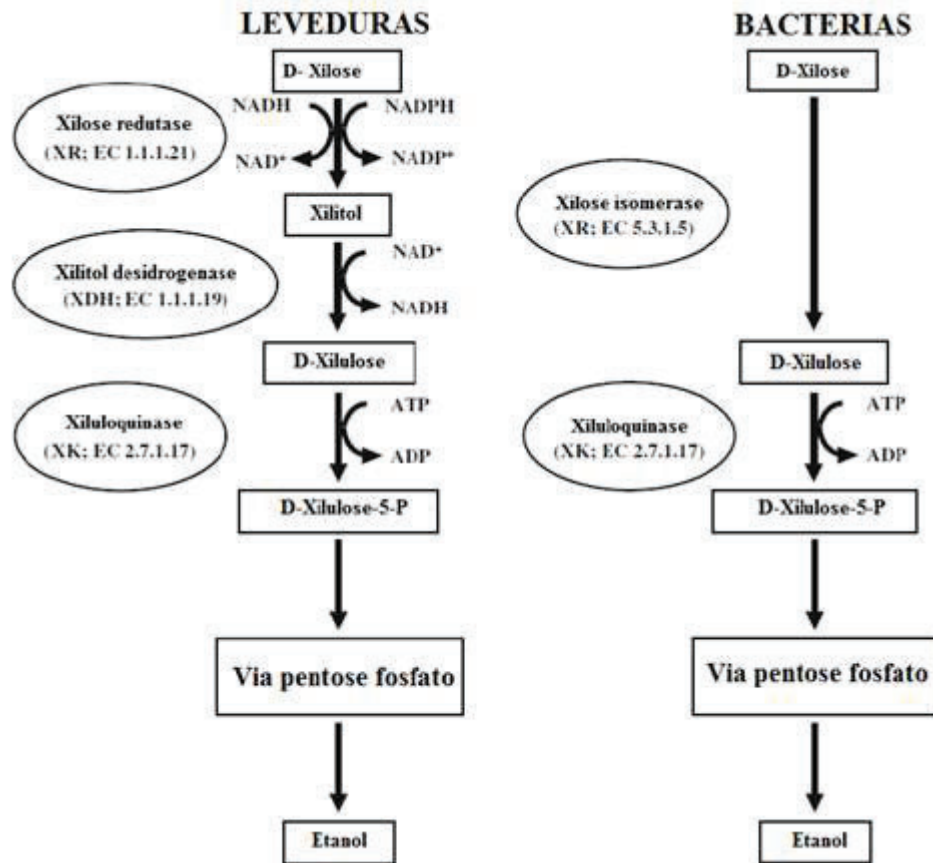
A hidrólise da fração de celulose libera moléculas de glicose que são facilmente fermentadas em etanol com rendimento teórico pela levedura *S. cerevisiae*, a qual é utilizada industrialmente na produção de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar no Brasil. *S. cerevisiae* é capaz de fermentar hexoses rápida e eficientemente, exibe alta tolerância ao etanol, e tolerância a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação (GIRIO *et al.*, 2010). Infelizmente, *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar pentoses, como a xilose, que estão presentes em grandes quantidades em hidrolisados da fração de hemicelulose da biomassa lignocelulósica (HARNER *et al.*, 2015). O sequenciamento genético mostrou que *S. cerevisiae* tem todos os genes necessários para o metabolismo da xilose, porém estes são pouco expressos, por isso a grande maioria das linhagens não consegue assimilar este açúcar e convertê-lo em etanol (TOIVARI *et al.*, 2004).

Devido ao interesse no desenvolvimento do etanol de segunda geração e à incapacidade de *S. cerevisiae* de fermentar xilose, houve preocupação da comunidade científica em prospectar e domesticar leveduras fermentadoras desse açúcar. Apesar do conhecimento de que algumas bactérias tenham capacidade de fermentarem xilose em etanol, como *Zymomonas mobilis* (GRISALES DÍAZ *et al.*, 2019), as leveduras sempre foram os organismos preferidos nesses estudos já que apresentam vantagens sobre as bactérias na

fermentação em escala industrial devido à espessura de sua parede celular, exigências nutricionais menos rigorosas, maior tamanho, maior resistência à contaminação e melhor crescimento em pH ácido. Em 1983, du Preez e colaboradores descreveram e avaliaram a levedura *Candida shehatae* na fermentação da xilose para a produção de etanol e, desde então, muitos grupos de pesquisa desenvolveram programas de isolamento e triagem para identificar esses micróbios fermentadores de xilose, outros gêneros e as espécies foram descritas como: *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces* (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1988)

Após a publicação de vários estudos independentes, houve consenso de que as leveduras mais capazes de realizar a fermentação da xilose com maiores rendimentos eram *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Pichia stipitis* (PEREGO *et al.*, 1990). Uma série de estudos para o aprimoramento genético dessas leveduras nativas foi desenvolvida, como o uso de técnicas de adaptação evolutiva, mutagênese aleatória, embaralhamento do genoma e fusão de protoplasto. Recentemente, Harner *et al.* (2015) revisaram todos esses estudos de melhoramento genético destas leveduras.

A Figura 11 mostra o caminho metabólico da xilose em leveduras e bactérias que, naturalmente, fermentam esse açúcar. Existem diferenças marcantes entre as duas vias. Na via bacteriana, a xilose é isomerizada em xilulose pela ação da enzima xilose isomerase (XI EC 5.3.1.5) e, depois, é convertida em xilulose-5-fosfato pela enzima xiluloquinase (XK EC 2.7.1.17) que entra por meio da via pentose-fosfato, que é, finalmente, convertido em etanol (KWAK *et al.*, 2017). Em leveduras, a xilose sofre, inicialmente, uma reação de redução catalisada pela xilose redutase (XR EC 1.1.1.30) que converte a xilose em xilitol. Depois que o xilitol é oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH EC 1.1.1.9), na próxima etapa, a xilulose é fosforilada pela enzima xilulocinase (XK EC 2.7.1.17) em xilulose-5P, que é um intermediário comum de leveduras e bactérias, que entra nas vias da pentose-fosfato, em que é, finalmente, convertido em etanol (PITKÄNEN *et al.*, 2003). Um aspecto relevante nas leveduras é que as duas primeiras enzimas da rota (XR e XDH) possuem especificidades diferentes para os cofatores NADH e NADPH, e o sinergismo das atividades entre as duas enzimas é crucial para manter o fluxo de carbono para o etanol ou a secreção de xilitol para fora da célula (JEPPSSON *et al.*, 2006).



**Figura 11: Via metabólica da xilose em leveduras e bactérias. Adaptado de Jeppsson *et al.* (2006).**

Em 2006, houve a descrição de um novo gênero de leveduras denominado *Spathaspora*, que ganhou importância devido ao potencial de aplicação destas leveduras na produção de etanol de segunda geração. Este novo gênero foi descrito para acomodar uma cepa de uma nova espécie de levedura que produz ascis contendo um único ascósporo com extremidades curvas. Ascis e ascósporos eram distintos dos já descritos para qualquer outra levedura conhecida, por isso um novo gênero foi descrito. A primeira espécie descrita foi *Spathaspora passalidarum*, isolada do intestino do escaravelho *Odontotaenius disjunctus* (Coleoptera: *Passalidae*), encontrado no Leste dos Estados Unidos. Esse estudo de Nguyen *et al.* (2006) mostrou que os besouros e os ambientes colonizados por esses insetos são potenciais fontes de novas espécies de leveduras que tenham capacidade de fermentação da xilose.

Além da primeira linhagem de *Sp. passalidarum* isolada por Nguyen *et al.* (2006), várias outras cepas já foram descritas. Cadete *et al.* (2012) relataram o isolamento de seis cepas de *Sp. passalidarum* de um total de 224 isolados de leveduras de amostras de madeira

podre coletadas em áreas da Floresta Amazônica brasileira. Também foram obtidas duas novas linhagens isoladas de madeira podre por Ren *et al.* (2014) no centro da China. Mais recentemente, seis linhagens foram isoladas de na Floresta Amazônica brasileira (GISELE *et al.*, 2017), sendo que uma foi isolada no intestino do besouro *Popilus marginatus* (Coleoptera: Passalidae) e cinco em galerias de troncos habitados por esses insetos. Por fim, Rodrussamee *et al.* (2018) isolaram uma nova cepa *Sp. Passalidarum* CMUWF1-2 do solo do Sudeste da Ásia e esta cepa mostrou a capacidade de fermentar xilose a temperaturas mais altas do que as linhagens já descritas.

Além de *Sp. passalidarum*, Cadete *et al.* (2009) descreveram uma nova espécie do gênero *Spathaspora* que foi isolada de madeiras em decomposição da Mata Atlântica no Brasil e foi denominada *Sp. arborárias*. Anos mais tarde, outras leveduras do gênero *Spathaspora* foram encontradas em vários habitats no Brasil. Quatro outras espécies desse clado foram descritas por Cadete *et al.* (2013): *Sp. brasiliensis*, *Sp. roraimanensis*, *Sp. suhii* e *Sp. xilofermentans* isoladas de raízes em decomposição na Floresta Amazônica. Três espécies, *Sp. girioi*, *sp. gorwiae* e *Sp. hagerdaliae*, foram relatadas por Lopes *et al.* (2016) com base em isolados obtidos de madeira podre na Mata Atlântica. Embora *Sp. gorwiae* e *Sp. hagerdaliae* formem um subclato separado pela análise da filogenia molecular (LOPES *et al.*, 2016), as características morfológicas são compatíveis com o gênero *Spathaspora*. Zhang *et al.* (2016) descreveram três isolados de leveduras no intestino dos besouros hospedeiros *Allomyrina dichotoma* (Coleoptera: Scarabeidae) coletados na Reserva Natural Nacional de Baotianman, Nanyan, Província de Henan, China. Comparações das sequências de DNA indicaram que os três isolados representam três linhagens de uma mesma espécie do clado *Spathaspora*, que foi denominada *Spathaspora allomyrinae*.

Morais *et al.* (2017) propuseram a nova espécie denominada *Sp. Boniae*, baseados em dois isolados que produzem ascósporos alongados contendo asci com extremidades curvas típicas do gênero *Spathaspora*, esta levedura foi encontrada em madeiras em decomposição na zona da Floresta Atlântica, no estado de Minas Gerais, no Brasil. Varize *et al.* (2018) isolaram do tronco de uma árvore ornamental de *Tibouchina granulosa* em Piracicaba, no estado de São Paulo, Brasil, uma levedura que não produz ascósporos, mas análise das sequências dos transcritos espaçadores internos (ITS-5.8S) e dos domínios D1/D2 do gene rRNA da subunidade grande mostraram que essa espécie pertence ao clado *Spathaspora* e foi denominada *Sp. Piracicabensis*. Esta levedura tem o etanol como principal produto da fermentação da xilose, em fermentações de meio sintético.

Além das leveduras do gênero *Spathaspora*, nas últimas décadas, novas linhagens, espécies e até gêneros de leveduras com alguma capacidade de fermentar xilose foram isolados da biodiversidade mundial: *Candida jeffriesii* (NGUYEN *et al.*, 2006) isolada no EUA do intestino em *Odontotaenius disjunctus* (Coleoptera: Passalidae); *Scheffersomyces henanensis* (REN *et al.*, 2014) isolada de amostras de madeira podre coletadas da Reserva Natural Baotianman na província de Henan, China Central; *Scheffersomyces parashehatae*; *Scheffersomyces xylosifermentans*, *Candida broadrunensis* e *Candida manassasensis* foram associados a insetos em Broad-Run, Virgínia, EUA (SUH *et al.*, 2013). Novas leveduras fermentadoras de xilose também foram isoladas em madeira em decomposição e insetos encontrados nos biomas brasileiros, entre elas: *Scheffersomyces amazonensis* (CADETE *et al.*, 2016), *Scheffersomyces queiroziae* (MORAIS *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2018) *Scheffersomyces stambukii* (LOPES *et al.*, 2018), *Sugiyamaella xyLANicola* (MORAIS *et al.*, 2013) e uma variedade de outras novas espécies do gênero *Sugiyamaella* (SENA *et al.*, 2017).

### **2.5.2 Leveduras geneticamente modificadas para fermentar xilose para a produção de etanol de segunda geração**

Embora a fermentação das pentoses seja realizada por leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, diversos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de criar linhagens geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* para a aplicação na produção do etanol de segunda geração, buscando obter linhagens fermentadoras de xilose tão robustas quanto *S. cerevisiae*. Assim, se apresenta para fermentar a glicose, além das outras características que conferem vantagens para a aplicação industrial de *S. cerevisiae* (GÍRIO, F. M. *et al.*, 2010).

Estudos de clonagem dos genes da xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) de *P. stipitis*, e expressão em *S. cerevisiae* para metabolizar a xilose foram relatados desde os anos 90 (AMORE *et al.*, 1991; KÖTTER *et al.*, 1993). A escolha dos genes de *P. stipitis* para o desenvolvimento de linhagens geneticamente modificadas deve-se, provavelmente, ao fato de que as tentativas de expressão do gene bacteriano em leveduras, até então, não mostraram resultados satisfatórios de assimilação de xilose com produção de etanol (D'AMORE *et al.*, 1989; SARTHY *et al.*, 1987) e as melhores leveduras fermentadoras de xilose da época, *P. tannophilus* e *C. shehatae*, mostraram fluxo de carbono e rendimentos de conversão de xilose em etanol menores que *P. stipitis* (DU PREEZ *et al.*, 1986; HO *et al.*, 1990). Atualmente, os

genes de *P.stipitis* continuam sendo preferidos pela maioria dos cientistas pelo amplo conhecimento genético e fisiológico desta levedura (JANSEN *et al.*, 2017).

Uma estratégia abordada por Hector *et al.* (2011) foi estudar a influência da origem genética da linhagem parental na fermentação da xilose, porque, até então, a maioria dos estudos usava haploides de laboratório como progenitor, devido à facilidade de transformação genética, mas, na maioria dos casos, essas leveduras não mostravam boa adaptação à fermentação de xilose no caldo gerado pela biomassa lignocelulósica hidrolisada (MATSUSHIKA *et al.*, 2009). A partir destas observações, esses autores decidiram avaliar a transformação genética usando como progenitor leveduras de aplicação industrial e alta ploidia. Os autores desenvolveram seis linhagens e observaram que três das linhagens selecionadas produziam mais etanol que o controle que foi clonado usando uma linhagem haploide.

Essas leveduras também metabolizaram os açúcares do hidrolisado de capim, produzindo mais etanol do que a cepa como progenitor haploide. Seguindo a mesma ideia, Lopes *et al.* (2017) utilizaram como parental para a transformação uma levedura utilizada industrialmente na produção de primeira geração no Brasil *S. cerevisiae* PE-2, que é uma levedura diploide altamente etanogênica, esta levedura mostrou bons resultados em fermentações de meio sintético, mas ainda são necessários testes complementares em hidrolisados.

## **2.6 Tecnologia de fermentação**

### **2.6.1 Características dos hidrolisados e influência no processo de fermentação**

Os hidrolisados de biomassa lignocelulósica passam por processos de preparação que utilizam altas temperaturas e concentrações de ácido causando a solubilização da lignina e a degradação de parte dos açúcares que geram outros compostos. Por isso, os hidrolisados têm características diferenciadas dos meios sintéticos, como altas pressões osmóticas, formação de ácidos orgânicos e presença de compostos furânicos que são produtos da degradação dos açúcares (ALMEIDA *et al.*, 2007).

A alta pressão osmótica do hidrolisado é causada porque, após o processo de hidrólise, o caldo resultante é concentrado por evaporação da água para aumentar o teor de açúcar, além de passar pela etapa de correção do pH para que o hidrolisado possua condições propícias



para fermentação. Esse processo acumula todos os compostos formados, além de gerar grandes quantidades de sais a partir da correção do pH, conseqüentemente, ocorre aumento brusco da pressão osmótica (ZHAO *et al.*, 2009). O título de pressão osmótica dos hidrolisados depende da biomassa utilizada e dos tratamentos realizados. Comparativamente, Schirmer-Michel *et al.* (2009) reportaram que um meio sintético com  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de açúcar tem pressão osmótica de  $300 \text{ Osm}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Hickert *et al.* (2013) reportaram que a pressão osmótica do hidrolisado da casca de arroz com, aproximadamente,  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de açúcares é de  $1300 \text{ Osm}\cdot\text{kg}^{-1}$ , já para a mistura de um hidrolisado ácido e enzimático de cascas de soja com, aproximadamente,  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de açúcares. Hickert *et al.* (2014) reportaram que a pressão osmótica foi de  $2500 \text{ Osm}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

O efeito osmótico do hidrolisado faz com que as leveduras, durante a fermentação, passem por estresse que afetam a taxa de multiplicação celular, além de mudanças na permeabilidade da membrana plasmática (CLARO *et al.*, 2007). Uma medida utilizada pelas células para se adaptar a essa condição é a síntese de osmólitos, que são grupos de solutos de baixo peso molecular envolvidos na estabilização protéica, em resposta a condições ambientais de estresse (VIANA *et al.*, 2005). *S. cerevisiae* e grande parte das leveduras sintetizam, principalmente, o glicerol, como osmólito (GARAY-ARROYO *et al.*, 1999). Geralmente, no processo de fermentação, as leveduras podem usar até 9% do total de açúcar para bioconversão de glicerol para a regulação osmótica (BASSO *et al.*, 2008).

Os processos de hidrólise também acabam gerando compostos tóxicos que são produtos da degradação dos açúcares e da lignina. É difícil haver algum processo de hidrólise em que não ocorra a degradação dos açúcares em compostos furânicos e a geração de ácidos fracos, já que a desacetilação da hemicelulose gera ácido acético e a degradação dos açúcares gera compostos fenólicos (ALMEIDA *et al.*, 2007). De uma maneira geral, os principais inibidores de metabolismo das leveduras presentes nos hidrolisados de biomassas lignocelulósicas são o furfural, que é formado pela desidratação das pentoses e HMF, que é formado pela desidratação das hexoses (LENIHAN *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2009). Em leveduras, a toxicidade destes furaldeídos interfere no metabolismo, aumentando a fase lag de crescimento e atrasando a produção de metabólitos. Esses efeitos aumentam de acordo com o aumento da concentração do furaldeído (NILSSON *et al.*, 2005).

A formação de furfural e HMF nos hidrolisados está relacionada, principalmente, ao tipo de biomassa lignocelulósica utilizado. Aguilar *et al.* (2002) reportaram ter encontrado altas concentrações de furfural, atingindo até  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  em hidrolisado de bagaço de cana-de-

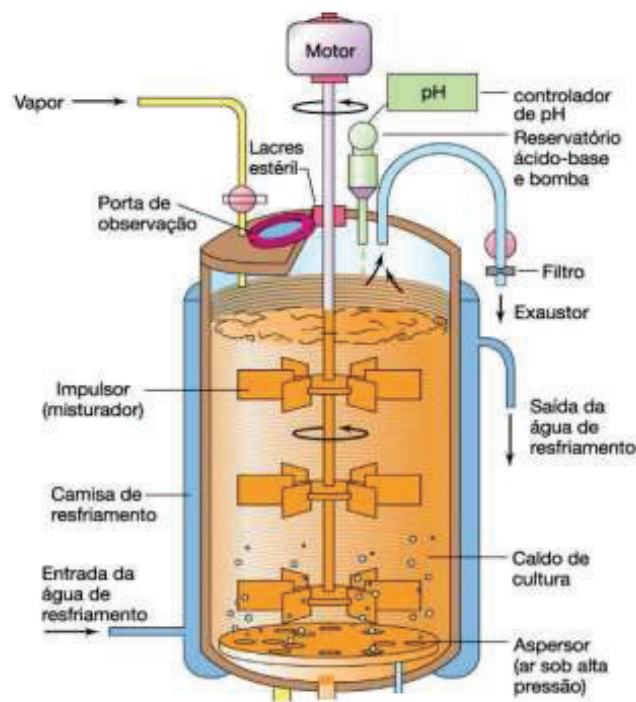
açúcar. Já LARSSON *et al.* (1999) reportaram ter encontrado  $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de HMF no hidrolisado de pedaços de madeira da árvore *Picea abies*. Em contraste, CORTIVO *et al.* (2019) reportaram que hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja possuem concentrações muito baixas de furfural e HMF inferior a  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Baixas concentrações de furfural e HMF ( $<1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) também foram observados nos hidrolisados da mistura de cascas de aveia e cascas de soja (CORTIVO *et al.*, 2018), e no hidrolisado de cascas de arroz (HICKERT *et al.*, 2013).

### 2.6.2 Biorreatores e configurações para a produção de etanol

Muitos estudos de fermentação para a produção de etanol de segunda geração abordam somente a fermentação em frasco agitado, mas esta abordagem não é completa, é preciso escalonar a fermentação em biorreator com condições controladas para a obtenção de parâmetros cinéticos mais efetivos e de menor variação (CORTIVO *et al.*, 2018). Os biorreatores do tipo tanque agitado (STR) permitem o controle preciso da temperatura de fermentação e da agitação, além de controle de outros parâmetros inexistentes em fermentações em frasco agitado, como controle de pH e da aeração. O controle destes parâmetros é muito importante em estudos de produção de etanol em que a aeração, geralmente, é um parâmetro crucial, já que, muitas vezes, uma microaerofilia restrita ou anaerobiose é necessária para a fermentação eficiente da xilose em etanol (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2004b).

Biorreatores STR são reatores agitados mecanicamente por meio de pás internas (impelidores). A aeração dos sistemas é feita por meio de um compressor de ar e a sua entrada no biorreator é feita pela parte inferior, sendo que a distribuição ocorre por meio de difusores. A troca de calor se dá por serpentina interna ou de camisa externa (DORAN, 1995). A agitação mecânica é convencionalmente utilizada na indústria ou em biorreatores de bancada devido a baixos custos de operação. Em escala industrial, estes reatores são, geralmente, fabricados em aço inoxidável e em escala laboratorial, e são feitos de vidro. Para prevenir a integridade do vaso, chicanas são acopladas aos tanques de modo que impedem a formação de vórtice causado por altas frequências de agitação. Tipicamente, 75% do volume de trabalho é preenchido com o fluido e o restante do volume, usualmente, serve para a passagem de ar e eventual formação de espuma. (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2011). A Figura 12 mostra as partes de um biorreator modelo STR.





**Figura 12: Representação esquemática de um biorreator de tanque agitado STR. Disponível em Yang (2007).**

Um aspecto importante desta configuração é a transferência de oxigênio do sistema e a relação com a agitação. Caso a altura do biorreator seja igual ao seu diâmetro, usualmente, utiliza-se um agitador; se essa razão for maior, são necessários mais agitadores e a distância entre eles deve ser igual, principalmente em cultivos aerados que precisam de uma transferência de oxigênio uniforme (YANG, 2007). Embora reatores STR sejam amplamente utilizados em sistemas de fermentação com células suspensas, esta configuração é pouco empregada para células imobilizadas devido à tensão de cisalhamento exercida sobre as matrizes de imobilização, que podem ser sensíveis e pouco resistentes (KOSSEVA, 2011; WILLAERT, 2011). Para fermentações com células imobilizadas, são necessários biorreatores que permitam manter a integridade do suporte com o biocatalisador (KOSSEVA, 2011; WILLAERT, 2011).

Reatores de coluna têm se mostrado adequados para a utilização com células imobilizadas, pois, na grande maioria dos casos, preservam o biocatalisador, sendo três configurações mais relatadas na literatura:

1) Reator de leito empacotado, também chamado de leito fixo. Nesta configuração, não há mistura longitudinal, o material suporte é adicionado em seu interior, por onde também

passa o meio de alimentação de forma ascendente, a movimentação das partículas na coluna é sutil ou praticamente inexistente, ocorrendo gradiente de concentração ao longo do comprimento da coluna do biorreator. Esse sistema apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de empacotamento de diversos tipos de suportes com variadas geometrias, a simplicidade de operação, o baixo custo, altas taxas de conversão e produtividades volumétricas, além da simplicidade do projeto (KOSSEVA, 2011; VERBELEN, PIETER J. *et al.*, 2006). Apesar disso, este sistema apresenta algumas desvantagens, como o acúmulo de gases e de biomassa suspensa, os quais podem levar à formação de caminhos preferenciais e prejudicar a transferência de massa, e as taxas de produção, além de ser inapropriado para cultivos aerados devido à depleção rápida do oxigênio no início da coluna (VERBELEN *et al.*, 2006; KOSSEVA *et al.*, 2009).

2) Reator de leito fluidizado: este sistema caracteriza-se pela movimentação das partículas ao longo da coluna do biorreator devido à agitação do meio de cultivo. Esta agitação pode ser dada de duas maneiras: pela recirculação do próprio meio de cultura ou por meio da injeção de ar ou de um gás inerte, como no caso de reatores *airlift* e de coluna de bolhas. Neste sistema, a transferência de massa é facilitada devido à homogeneização do meio e à movimentação das partículas, o que facilita a remoção de gases e evita a decantação de células no fundo do biorreator. A principal vantagem dos biorreatores de leito fluidizado é a combinação entre reatores de mistura completa e de leito fixo, apresentando boas condições de mistura e baixas tensões de cisalhamento. É importante que o tamanho e a densidade do suporte bem como a taxa de fluxo de líquidos e gases que passam pela coluna devem ser configurados para que o sistema mantenha a maior homogeneidade possível (GROBOILLOT *et al.*, 1994; VERBELEN *et al.*, 2006; KOSSEVA *et al.*, 2009).

3) Reatores de membrana utilizam membranas seletivas com fluxo cruzado permitindo a separação entre as células que ficam delimitadas em um espaço enquanto ocorre o trânsito de açúcares com saída dos produtos de fermentação (RADOČAJ *et al.*, 2014). Esse sistema pode apresentar limitações, entre elas: decaimento de fluxo e incrustações na membrana em função do tempo de operação, que são causadas devido à alta concentração de sólidos solúveis e insolúveis nas matérias-primas e de interações químicas entre as moléculas. Muitas vezes, é necessária a limpeza da membrana ao longo do processo ou desenvolvimento de tecnologias que permitam a diminuição da incrustação da membrana (MACHADO *et al.*, 2014).

A Figura 13 mostra uma representação esquemática dos biorreatores de colunas.

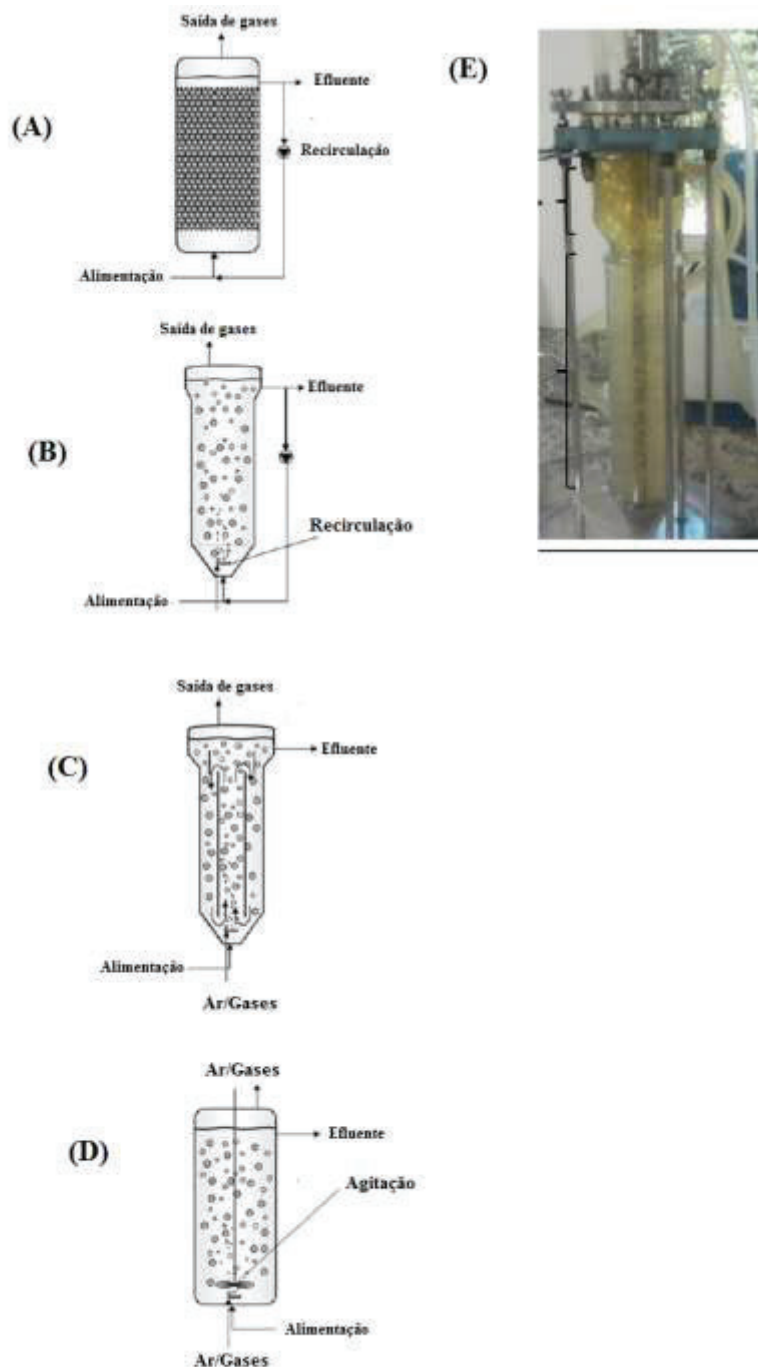


Figura 13: Biorreatores em coluna de células imobilizadas: (A) leito fixo ou empacotado, (B) leito fluidizado pela recirculação do meio, (C) leito fluidizado pelo sistema *airlift*, (D) leito fluidizado pelo sistema de coluna de bolhas. Adaptado de Gabardo (2015). (E) Fotografia de um biorreator de coluna da marca PID Fermenter AWS (Wald, Suíça). Disponível em Antunes (2015).

A principal finalidade da utilização de biorreatores com células imobilizadas é a vantagem de realização da operação contínua de fermentação ou a possibilidade de realização de fermentações em sequência com reaproveitamento das células. Processos com reaproveitamento de células são interessantes pela redução de custos do bioprocessamento (GABARDO *et al.*, 2016). O reaproveitamento das células imobilizadas é relatado na literatura em fermentações sequenciais de permeado de soro de queijo para a produção de etanol utilizando as leveduras *S. cerevisiae* e *K. marxianus* imobilizadas em arginato de cálcio (GABARDO *et al.*, 2016). O aproveitamento de células de *Candida shehatae* imobilizadas em alginato de cálcio em fermentações sequenciais de hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana também já foi relatado (ANTUNES *et al.*, 2016).

Já o processo contínuo se caracteriza pela manutenção do volume de reação constante, sendo um sistema aberto em que a vazão de alimentação é idêntica à vazão de retirada de meio, mantendo, assim, o volume de reação constante. Nesse sistema, as células precisam manter o mesmo estado fisiológico e a formação dos produtos precisa ser constante. Dessa forma, o estado estacionário é alcançado e as variáveis de estado permanecem constantes ao longo do tempo de operação (GHALY *et al.*, 1997). Sistemas de fermentação contínua apresentam vantagens, como o aumento na produtividade, minimização das perdas e operação em biorreatores de menor escala (GHALY *et al.*, 1997; VERBELEN, PIETER J. *et al.*, 2006).

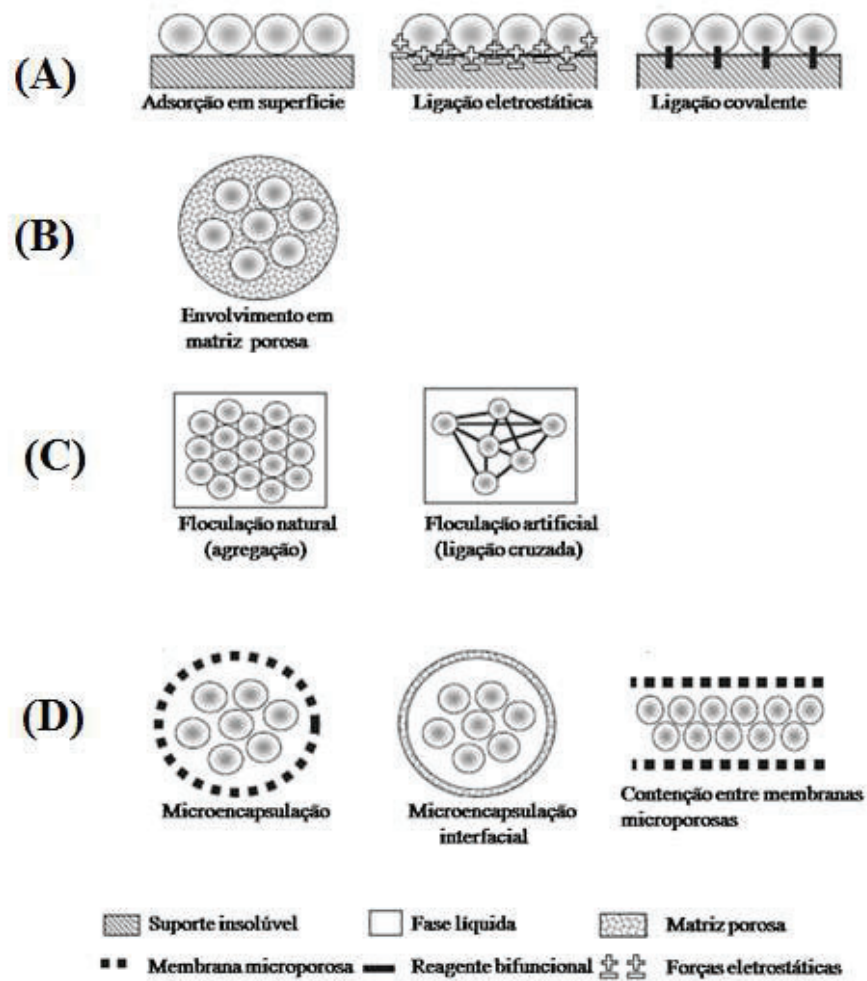
Sistemas de fermentação contínuos ainda em escala laboratorial são relatados em algumas pesquisas de conversão de soro de queijo e permeado do soro de queijo com diferentes configurações de biorreator de leito fixo e leito fluidizado, utilizando sistemas com células imobilizadas de *K. marxianus* em alginato de cálcio (GABARDO *et al.*, 2011; GABARDO *et al.*, 2015). Em escala industrial, já é aplicada a produção contínua de álcool a partir de células floculentas. Este sistema desenvolvido pela empresa Natrontec, que tem sido implementado em algumas plantas industriais no Brasil, mostrou considerável elevação de eficiência sobre o processo tradicional, com diminuição dos custos de produção e manutenção (ZANIN *et al.*, 2000). Além disso, em fermentações industriais para a produção de alimentos, já estão sendo utilizados sistemas contínuos de fermentação. Diversas cervejarias, em vários países, já utilizam processos contínuos de produção. As cervejarias Kirin Brewery Company (Japão), Labbat Breweries (Canadá) e Meura Delta (Bélgica) aplicam diferentes tecnologias de fermentação contínua, que são altamente produtivas e rentáveis (VIRKAJÄRVI, 2001).

## 2.7 Imobilização celular

O processo de imobilização celular consiste no confinamento de células em uma estrutura física, preservando a atividade catalítica (KAREL *et al.*, 1985). A imobilização de células também pode ser definida como uma técnica utilizada para a fixação física ou química das células, organelas, enzimas ou outras proteínas (por exemplo, anticorpos monoclonais) em um suporte sólido, em uma matriz sólida ou retidas por uma membrana, a fim de aumentar sua estabilidade e facilitar uso repetido ou contínuo (IUPAC, 1997). Muitos micro-organismos apresentam a capacidade de se aderir a diferentes tipos de superfícies na natureza (KOURKOUTAS *et al.*, 2004). Os processos de imobilização, geralmente, simulam o crescimento natural de células no interior de estruturas naturais ou em superfícies.

A técnica de imobilização celular tem sido utilizada em alguns estudos, pois pode apresentar vantagens frente a processos com células suspensas, como redução dos tempos de fermentação, aumento da produtividade, possibilidade de reuso das células, além de redução dos riscos de contaminação, já que é possível operar com alta densidade celular durante o processo de fermentação. Além disso, há melhora na estabilidade do biocatalisador e proteção contra o estresse ambiental, gerando maior tolerância às altas concentrações de substrato e produto final (MUSSATTO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2002).

Diversos processos de imobilização celular são reportados, dentre eles: ligação a superfícies sólidas, aprisionamento em matrizes porosas, floculação (natural ou artificial), e contenção por membranas (KOSSEVA *et al.*, 2009). A Figura 14 mostra, esquematicamente, alguns destes processos de imobilização. Cada um desses métodos apresenta vantagens e desvantagens, por isso é necessário levar em conta a finalidade da utilização da imobilização celular. As técnicas de envolvimento em matriz porosa foram avaliadas em processos de produção de etanol a partir de glicose ou melão ou permeado soro de queijo. Nesta metodologia, as células podem ser protegidas do estresse ambiental, mas enfrentam problemas difusionais de transferência de massa (GABARDO *et al.*, 2016; VERBELEN, P. J. *et al.*, 2006).



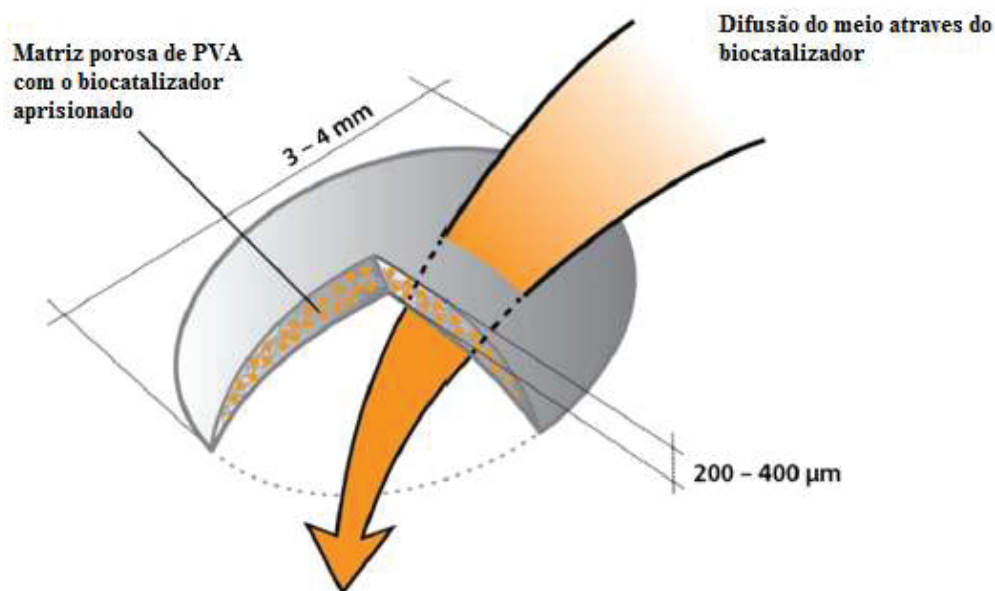
**Figura 14: Métodos de imobilização celular: (A) ligação a superfícies sólidas, (B) aprisionamento em matrizes porosas, (C) floculação e (D) contenção por membranas. Adaptado de Kourkoutas *et al.* (2004).**

Um método de imobilização que mostra resultados promissores para células e enzimas é a imobilização em álcool polivinílico (PVA), que é um polímero sintético que pode ser usado para formar hidrogéis com excelentes propriedades mecânicas, não é tóxico e pode ser economicamente viável para aplicações em escala industrial. A tecnologia de imobilização comercial em PVA patenteada é chamada de LentiKats<sup>®</sup> e permite que o processo de imobilização seja feito em temperatura ambiente sem a adição de compostos tóxicos (KRASŇAN *et al.*, 2016).

Esta tecnologia gera partículas em forma semelhante a lentes, diferente da forma



esférica, que é a mais típica em processos de imobilização celular. Apesar de o formato esférico permitir uma descrição fácil dos efeitos de difusão por modelos matemáticos que auxiliam a entender e a aperfeiçoar o bioprocesso, se as esferas possuírem um diâmetro grande, o centro do biocatalisador sofrerá limitações de difusão, e, no caso de células vivas, elas serão inibidas e somente as células sob a superfície estarão viáveis (KRASŇAN *et al.*, 2016). Além disso, partículas grandes são mais suscetíveis à deterioração causada por agitação e outras cargas mecânicas, já as muito pequenas podem obstruir a linha de saída em biorreatores e são difíceis de serem retidas (JAHNZ *et al.*, 2002). A estrutura em forma de lente da tecnologia proporciona que essas partículas combinem os benefícios de esferas grandes e pequenas. A forma e o tamanho permitem também uma difusão eficiente, devido a sua área superficial máxima e, ao mesmo tempo, ao volume. Sendo assim, as limitações de difusão associadas ao transporte do substrato para a lente e os produtos para o exterior da lente são significativamente reduzidos (LENTIKAT'S BIOTECHNOLOGIES). A Figura 15 mostra, esquematicamente, o processo de difusão nas LentiKats<sup>®</sup>.



**Figura 15: Processo de difusão nas partículas de LentiKats<sup>®</sup>. Adaptado de Krasňan *et al.* (2016).**

Lentikats<sup>®</sup> também possuem alta porosidade interna, gerando alta capacidade de imobilização, e excelente estabilidade física e mecânica (elasticidade e baixa abrasão) (Lentikat's Biotechnologies). O benefício da imobilização em LentiKats<sup>®</sup> é demonstrado por

alguns exemplos de imobilização bem-sucedida de células inteiras e enzimas, como, por exemplo, a redução do consumo de energia para tratamento de águas e produção contínua de cerveja (BEZBRADICA *et al.*, 2007; KRASŇAN *et al.*, 2016).



### 3. RESULTADOS

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos neste trabalho no formato de artigos científicos (itens 3.1, 3.2 e 3.3). Em cada um destes artigos, consta a introdução, os materiais e as metodologias empregadas, juntamente com a discussão dos resultados obtidos e as conclusões pertinentes a cada etapa de trabalho desenvolvida.

#### 3.1 - Resultado I

##### **Conversion of fermentable sugars from hydrolysates of soybean and oat hulls into ethanol and xylitol by *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303**

Neste artigo, a levedura recentemente prospectada *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 foi testada em fermentações de hidrolisado resultante do tratamento ácido, tratamento enzimático e na mistura destes hidrolisados, com alta concentração de glicose e xilose, e alta pressão osmótica. Diferentes condições de aeração dos meios foram testadas em biorreator. *Sp.hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 foi capaz de assimilar tanto a glicose quanto a xilose dos hidrolisados, mas mostrou-se sensível às altas pressões osmóticas, também houve conversão da xilose em xilitol impactando nos rendimentos de etanol, além disso, melhores rendimentos de etanol só foram atingidos em condições de microaerofilia. Este artigo está publicado na revista Industrial Crops and Products (fator de impacto 5,64) com o DÓI: [10.1016/j.indcrop.2020.112218](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112218).

### 3.2 - Resultado II

#### **Performance of xylose-fermenting yeasts in oat and soybean hulls hydrolysate and improvement of ethanol production using immobilized cell systems**

Neste artigo, uma ampla diversidade de leveduras com capacidade de fermentar glicose e xilose, dos gêneros *Spathaspora*, *Scheffersomyces Sugiyamaella* e *Candida*, além de uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para fermentar a glicose e xilose em etanol foram testadas no hidrolisado resultante do tratamento ácido da mistura de casca de aveia e soja, buscando selecionar a levedura com a melhor capacidade de conversão dos açúcares em etanol. *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 mostrou os melhores parâmetros cinéticos de produção de etanol, superando até *Sp. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, cujos resultados foram mostrados na etapa anterior, por isso, foi selecionada para estudos de fermentação com as células imobilizadas por envolvimento em matriz porosa, utilizando a tecnologia LentiKats<sup>®</sup> (álcool polivinílico).

Fermentações do hidrolisado resultante do tratamento ácido com células imobilizadas mostraram melhoria da produtividade quando comparadas com o cultivo com células suspensas; e as culturas imobilizadas também foram viáveis na fermentação do hidrolisado resultante do tratamento enzimático com pressão osmótica mais elevada. Um aumento maior na produtividade de etanol também foi alcançado suplementando os hidrolisados com extrato de levedura cru. Por fim, as células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> foram testadas em uma sequência de fermentação de hidrolisado resultante do tratamento ácido, enzimático e na mistura ácido/enzimático buscando avaliar a tolerância do suporte de LentiKats<sup>®</sup> às variações de concentração de açúcar e pressão osmótica, e a manutenção da viabilidade das células imobilizadas por um longo período. Observou-se que as células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> mostraram capacidade de fermentação da glicose e xilose por mais de 240 horas com bons parâmetros de produção de etanol. Este artigo está publicado na revista *Biotechnology Letters* (fator de impacto 2,46) com DOI : <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03182-2>

Este artigo possui uma quantidade significativa de material suplementar (descrição detalhada das cinéticas de fermentação, que no artigo foi resumido em tabelas). O material suplementar pode ser consultado em <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10529-021-03182-2>

### 3.3 - Resultado III

#### **Continuous bioreactor bioprocess using immobilized *Spathaspora passalidarum* to ferment hydrolysates of oat and soybean hulls to ethanol**

Neste artigo, a levedura *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 foi testada em fermentações com as células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> em sistema de biorreator fluidizado e de leito fixo operando continuamente. O biorreator fluidizado mostrou melhores parâmetros de produção de etanol. Diferentes taxas de diluição foram testadas no biorreator fluidizado e o aumento da taxa de diluição gerou aumento na produtividade volumétrica de etanol. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura da superfície da LentiKats<sup>®</sup> mostraram a colonização da LentiKats<sup>®</sup> por *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469. Artigo a ser submetido.

#### 4. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve por objetivo utilizar leveduras recentemente prospectadas da biodiversidade brasileira em diferentes estratégias de fermentação para a produção de etanol de segunda geração. Para tanto, uma série de etapas foram desenvolvidas abrangendo desde experimentos com diferentes gêneros de leveduras e diferentes espécies dentro do mesmo gênero, estudos testando diferentes condições de aeração dos meios de cultura durante a fermentação, testes com suplementação dos hidrolisados a partir de diferentes concentrações de açúcares, utilização da técnica de imobilização celular, diferentes estratégias de fermentação com biorreatores operados em regime batelada, batelada repetida e cultura contínua. Cada etapa teve significativa contribuição para que o objetivo final desta pesquisa fosse alcançado, especialmente no sentido de apresentar novas abordagens para a produção de etanol de segunda geração.

A mistura 1:1 de casca de aveia com casca de soja foi utilizada como substrato para a produção do etanol de segunda geração. Estudos para aplicação destes resíduos na produção do etanol são importantes, uma vez que a soja é a oleaginosa mais produzida no mundo e a aveia é plantada em regiões temperadas, ambas passam por processamento agroindustrial gerando uma quantidade abundante de resíduos que estão prontamente disponíveis para a utilização na produção de etanol. A hidrólise ácida diluída, seguida pelo processo de hidrólise enzimática utilizando a enzima Celluclast<sup>®</sup> 1.5 L (Novozymes, Brazil), permite alta recuperação da glicose e xilose presente na fração de celulose e hemicelulose da casca de aveia e casca de soja, gerando caldos com baixa concentração dos inibidores da fermentação (furfural, HMF e ácido acético).

Este estudo utilizou uma variedade de leveduras com capacidade de fermentar a glicose e a xilose, recentemente prospectadas da biodiversidade brasileira, pertencendo aos gêneros *Spathaspora*, *Scheffersomyces*, *Sugiyamaella*, e *Candida*, além de *S. cerevisiae* YRH 1415, que foi construída utilizando como parental a linhagem *S. cerevisiae* PE-2, que é, atualmente, a levedura mais utilizada na produção de etanol de primeira geração no Brasil. A capacidade de fermentação da xilose nesta levedura foi conferida por integração cromossômica dos genes de metabolismo da xilose de *Sc stipitis*. Observou-se, ao longo deste estudo, que as leveduras testadas foram capazes de crescer e fermentar os açúcares dos hidrolisados, mas diferenças marcantes no desempenho de produção de etanol entre os diferentes gêneros e também entre as diferentes espécies de leveduras foram observadas.

As leveduras do gênero *Spathaspora* mostraram um ótimo desempenho na

fermentação da glicose e xilose do hidrolisado, algumas espécies tiveram o principal produto da fermentação da xilose o etanol e outras, o xilitol, como *Sp. xylofermentans* UFMG-HMD-23.3, que teve como principal produto da fermentação da xilose o xilitol. Este também é um resultado interessante, uma vez que esta levedura tem potencial para ser aplicada em sistemas que são exclusivos de produção de xilitol, este que tem um alto valor agregado, visto o poder adoçante e a aplicabilidade na indústria de alimentos. Outras leveduras mostraram a necessidade de condições específicas de aeração para a manutenção do fluxo de carbonos da xilose para o etanol, como no caso da *Sp. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 em que o cultivo em microaerofilia gerou maior conversão ao etanol, enquanto, com uma aeração maior, o xilitol foi o principal produto.

Porém, para uma aplicação prática na indústria de produção de etanol de segunda geração, que exige maior simplicidade do processo, é necessário que a levedura consiga converter a glicose e xilose em etanol em condição de anaerobiose. Neste sentido, a levedura *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 mostrou os melhores resultados, pois os açúcares foram convertidos em etanol com baixa produção de xilitol e glicerol, em condição de cultura anaeróbica, além disso, a levedura foi capaz de tolerar a alta pressão osmótica do hidrolisado.

A partir deste resultado de triagem, a levedura *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 foi selecionada para ser aplicada em estudos para o melhoramento dos parâmetros fermentativos. Fermentações com as células de *Sp. passalidarum* UFMG-CM-469 imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup> foram testadas, a imobilização em LentiKats<sup>®</sup> é um aprimoramento do suporte de álcool polivinílico, permitindo que o processo de imobilização seja realizado em temperatura ambiente e sem a adição de produtos químicos tóxicos. Esta técnica tem a vantagem de gerar partículas com alta porosidade interna, alta capacidade de imobilização e resistentes ao cisalhamento, permitindo que a fermentação seja realizada em alta densidade celular, até então, este é o primeiro relato do uso da tecnologia de imobilização em LentiKats<sup>®</sup> na produção de etanol de segunda geração.

Culturas com células imobilizadas mostraram melhoria nos parâmetros de produção de etanol e a suplementação dos hidrolisados com extrato de levedura cru mostrou um aumento considerável na produtividade de etanol, isso mostra que o hidrolisado ácido e o hidrolisado enzimático da mistura de casca de aveia e casca de soja, ambos são caldos adequados para a aplicação na produção de etanol de segunda geração, pois não exigem suplementação extensiva. O uso prolongado das células imobilizadas também foi testado em fermentações

sequenciais de hidrolisado resultante do tratamento ácido, tratamento enzimático e da mistura de hidrolisados ácido e enzimático utilizando as mesmas células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup>, estas mantiveram a eficiência de fermentação por mais de 240 horas, mostrando que a imobilização em LentiKats<sup>®</sup> é estável e eficiente.

Por fim, foi testada a utilização de células imobilizadas em biorreator de coluna fluidizado e com leito fixo. Biorreatores de leito fixo e de leito fluidizado têm diferentes configurações, o que pode resultar em diferentes tipos de resultados. Na configuração de leito fixo, embora as transferências de massa sejam menores, o biorreator opera com densidade celular alta, o que pode beneficiar o processo fermentativo. Já a configuração de leito fluidizado, embora trabalhe com densidades celulares mais baixas, a fluidização do sistema permite uma maior transferência de massa, além de evitar que caminhos preferenciais se formem no reator. Neste estudo, considerando a natureza do suporte de imobilização, o biorreator fluidizado mostrou melhores resultados, tanto na fermentação em batelada como em biorreator de cultura contínua, a estratégia de fermentação utilizando células imobilizadas em biorreatores fluidizado operando em taxas de diluição maiores mostrou resultados promissores, já que o aumento da taxa de diluição gerou aumento na produtividade volumétrica de etanol.

Entre as perspectivas para a continuação deste trabalho, como a levedura *Sp passalidarum* UFMG-CM-469 mostrou melhores parâmetros de produção de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados da mistura de casca de aveia com casca de soja, entre uma grande variedade de outras leveduras que foram testadas, estudos da expressão gênica, análises proteômica, metabolômica e de atividade enzimática relacionada às vias de metabolismo da glicose e xilose durante a fermentação de hidrolisados poderiam melhor elucidar os fatores que conferem o desempenho fermentativo superior desta levedura. A capacidade fermentativa de *Sp passalidarum* UFMG-CM-469 ainda pode ser melhorada por processo de evolução adaptativa ou transformação genética gerando mutantes com maior e mais rápida capacidade conversão dos açúcares em etanol.

As estratégias de fermentação também podem ser aperfeiçoadas, a fermentação em biorreator contínuo com células imobilizadas pode ser aprimorada testando a fermentação de hidrolisados com outras concentrações de açúcares, bem como, a operação de dois biorreatores em sequência em que o segundo biorreator é alimentado com efluente do primeiro, esta estratégia pode gerar um maior título de produção de etanol e menor quantidade

de açúcares residuais quando se opera o biorreator contínuo com diluições mais altas. Outra possibilidade é projetar novos modelos de biorreatores para operação com células imobilizadas que permitam maior controle das variáveis relacionadas com o processo de fermentação.

## 5. CONCLUSÕES

A triagem de leveduras realizada neste estudo mostrou que as diferentes leveduras isoladas da biodiversidade brasileira tiveram diferenças marcantes na assimilação da glicose e xilose do hidrolisados resultantes do tratamento ácido e tratamento enzimático da mistura 1:1 de casca de aveia com casca de soja com diferentes perfis de conversões aos produtos, etanol e xilitol. *Sp passalidarum* UFMG-CM-469 que foi a levedura que mostrou melhores parâmetros de produção de etanol, tendo capacidade de conversão dos açúcares destes hidrolisados em etanol tanto em microaerofilia quanto em anaerobiose com baixa produção de xilitol e glicerol. *Sp passalidarum* UFMG-CM-469 foi selecionada para a utilização em bioprocessos com as células imobilizadas em LentiKats<sup>®</sup>. A utilização deste suporte de imobilização mostrou resultados promissores, pois foi capaz de proteger as células da alta pressão osmótica do hidrolisado e operar a fermentação com alta densidade celular, gerando melhores parâmetros de produção de etanol, foi possível também a reutilização das células imobilizadas em fermentações sequenciais de hidrolisados.

A suplementação do hidrolisado resultante do tratamento ácido e do hidrolisado resultante do tratamento enzimático com extrato de levedura cru, mostrou-se como uma alternativa interessante, pois é uma suplementação barata que gerou aumentos significativos na produtividade volumétrica de etanol para os dois hidrolisados. Finalmente, as culturas com células imobilizadas em biorreator fluidizado e em biorreator de leito fixo, operando continuamente, mostram resultados promissores de produção de etanol. Nas condições deste estudo, o biorreator fluidizado mostrou melhores parâmetros de produção de etanol a partir dos hidrolisados de casca de aveia e soja. Aumentos na taxa de diluição do biorreator fluidizado geraram aumentos na produtividade volumétrica de etanol. Todos estes resultados são relevantes, pois as leveduras testadas neste estudo bem como as estratégias de fermentação geraram resultados que contribuem para avanços na viabilização da produção industrial da produção do etanol de segunda geração.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S.; BHAT, A. H.; IREANA YUSRA, A. F. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Carbohydrate Polymers**, 87, n. 2, p. 963-979, 2012.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, 55, n. 4, p. 309-318, 2002.
- ALBUQUERQUE, T. L. d.; DA SILVA, I. J.; DE MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, 49, n. 11, p. 1779-1789, 2014.
- ALMEIDA, J. R.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B. *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALVES, E.; BOSE, S.; FRANCIS, R.; COLODETTE, J.; IAKOVLEV, M. *et al.* Carbohydrate composition of eucalyptus, bagasse and bamboo by a combination of methods. **Carbohydrate Polymers**, 82, p. 1097-1101, 2010.
- AMORE, R.; KÖTTER, P.; KÜSTER, C.; CIRIACY, M. *et al.* Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene (XYL1) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. **Gene**, 109, n. 1, p. 89-97, 1991.
- ANTUNES, F. A. Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, p. 169. 2015.
- ANTUNES, F. A. F.; SANTOS, J. C.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S. *et al.* Hemicellulosic Ethanol Production by Immobilized Wild Brazilian Yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Effects of Cell Concentration and Stirring Rate. **Current Microbiology**, 72, n. 2, p. 133-138, 2016.
- 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**, 7, n. 2, p. 163-173, 2014.
- BARBOSA, M. F. S.; DE MEDEIROS, M. B.; DE MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H. *et al.* Screening of yeasts for production of xylitol from xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, 3, n. 4, p. 241-251, 1988.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

- BENTSEN, N.; FELBY, C. Technical potentials of biomass for energy services from current agriculture and forestry in selected countries in Europe, The Americas and Asia. **Working Papers/forest & Landscape**, 2010, 31p.
- BEZBRADICA, D.; OBRADOVIC, B.; LESKOSEK-CUKALOVIC, I.; BUGARSKI, B. *et al.* Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. **Process Biochemistry**, 42, n. 9, p. 1348-1351, 2007.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSÁN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B. *et al.* Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLOS ONE**, 7, n. 8, p. e43135, 2012.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. *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. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 103, n. 2, p. 421-431, 2013.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A. *et al.* *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res**, 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.
- CARA, C.; RUIZ, E.; DOMINGUEZ, J.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, 99, p. 1869-1876, 2008.
- CLARK, T. A.; MACKIE, K. L.; DARE, P. H.; MCDONALD, A. G. Steam Explosion of the Softwood *Pinus Radiata* with Sulphur Dioxide Addition. II. Process Characterisation. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, 9, n. 2, p. 135-166, 1989.
- CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, 36, n. 12, p. 3541-3549, 2011.
- CLARO, F. B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, 102, p. 693-700, 2007.
- CORTIVO, P. R. D.; HICKERT, L. R.; HECTOR, R.; AYUB, M. A. Z. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. **Industrial Crops and Products**, 113, p. 10-18, 2018.
- D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 4, p. 315-323, 1989.
- DASGUPTA, D.; BANDHU, S.; ADHIKARI, D. K.; GHOSH, D. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, 197, p. 9-21, 2017.
- DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 23, n. 3, p. 228-233, 1986.

FARRELL, A.; PLEVIN, R.; TURNER, B.; JONES, A. *et al.* Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science**, 311, p. 506-508, 2006.

FUKUSHIMA, R.; HATFIELD, R. Nuclear magnetic resonance spectra of two types of lignin. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, p. 505-511, 2003.

G, J.; PEREZ, V.; RUIZ-COLORADO, A. Ethanol Production of Banana Shell and Cassava Starch. **DYNA**, 73, p. 21-27, 2006.

GABARDO, S. Engenharia de biorreatores contínuos com células imobilizadas para a bioconversão de soro e permeado de soro de queijo à bioetanol. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p.199. 2015.

GABARDO, S.; PEREIRA, G. F.; KLEIN, M. P.; RECH, R. *et al.* Dynamics of yeast immobilized-cell fluidized-bed bioreactors systems in ethanol fermentation from lactose-hydrolyzed whey and whey permeate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 39, n.1, p. 141-150, 2016.

GARAY-ARROYO, A.; COVARRUBIAS, A. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, 15, p. 879-892,1999.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS MAZORRA, V.; GOMEZ, E. Stirred Tank Bioreactors. In: MURRAY MOO-YOUNG. *Comprehensive Biotechnology*. Amsterdã: Elsevier; v. 2, p. 179-198, 2011.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Autohydrolysis of corncob: Study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. **Journal of Food Engineering**, 52, p. 211-218, 2002.

GARROTE, G.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Autohydrolysis of agricultural residues: Study of reaction byproducts. **Bioresource Technology**, 98, p. 1951-1957, 2007.

GHALY, A. E.; EL-TAWHEEL, A. A. Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey. **Biomass and Bioenergy**, 12, n. 6, p. 461-472, 1997.

GHATAK, H. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 15, p. 4042-4052, 2011.

GÍRIO, F.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. *et al.* Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review. **Bioresource Technology**, 101, p. 4775-4800, 2010.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GISELE, d.; LUANA, T.; SAMILA, R.; MAXWEL, A. Efficient production of second generation ethanol and xylitol by yeasts from Amazonian beetles (Coleoptera) and their galleries. **African Journal of Microbiology Research**, 11, p. 814-824, 2017.

GRISALES DÍAZ, V.; WILLIS, M. Ethanol production using *Zymomonas mobilis*: Development of a kinetic model describing glucose and xylose co-fermentation. **Biomass and Bioenergy**, 123, p. 41-50, 2019.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14 n.2, p. 75-107, 1994.

GUAMAN-BURNEO, M.; DUSSAN, K.; CADETE, R.; CHEAB, M. *et al.* Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, 108, 2015.

GUO, C.; ZHAO, C.; HE, P.; LU, D. *et al.* Screening and characterization of yeasts for xylitol production. **Journal of Applied Microbiology**, 101, n. 5, p. 1096-1104, 2006.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 41, p. 550-567, 2015.

H.P.S, A. K.; DAVOUDPOUR, Y.; ISLAM, M. N.; MUSTAPHA, A. *et al.* Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, 99, p. 649-665, 2014.

HAHN-HÄGERDAL, B.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G. Production of ethanol from lignocellulosic materials. **Animal Feed Science and Technology**, 21, n. 2, p. 175-182, 1988.

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

HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; QURESHI, N. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for xylose fermentation and comparison for switchgrass conversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 38, n. 9, p. 1193-1202, 2011.

HICKERT, L. R.; CRUZ, M. M.; DILLON, A. J. P.; FONTANA, R. C. *et al.* 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**, 88, p. 61-67, 2014.

HICKERT, L. R.; DA CUNHA-PEREIRA, F.; DE SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A. *et al.* Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, 131, p. 508-514, 2013.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S. *et al.* Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HO, N. W. Y.; LIN, F. P.; HUANG, S.; ANDREWS, P. C. *et al.* Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, 12, n. 1, p. 33-39, 1990.

ISIKGOR, F.; BECER, R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. **Polymer Chemistry**, 6, 2015.

JAHNZ, U.; WITTLICH, P.; PRÜBE, U.; VORLOP, K. D. New Matrices and Bioencapsulation Processes. In: HOFMAN, M.; THONART, P. Engineering and Manufacturing for Biotechnology. Berlin: Springer; p. 293-307, 2002.

JEPPSSON, M.; BENGTSSON, O.; FRANKE, K.; LEE, H. *et al.* The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher KM for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, 93, n. 4, p. 665-673, 2006.

JIMÉNEZ, L.; PÉREZ, A.; DE LA TORRE, M. J.; MORAL, A.; SERRANO, L. Characterization of vine shoots, cotton stalks, *Leucaena leucocephala* and *Chamaecytisus proliferus*, and of their ethyleneglycol pulps. **Bioresource Technology**, 98, n. 18, p. 3487-3490, 2007.

JUNYAPATE, K.; JINDAMORAKOT, S.; LIMTONG, S. *Yamadazyma ubonensis* f.a., sp nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. **Antonie van Leeuwenhoek**, 105, 2013.

KAMM, B.; KAMM, M.; GRUBER, R.; KROMUS, S. Biorefinery Systems – An Overview. In: KAMM, B.; GRUBER, P.; KAMM, M. Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions. Nova Jersey: John Wiley & Sons; p. 1 - 40, 2006.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, 40, n. 8, p. 1321-1354, 1985.

KIM, S.; DALE, B. Global Potential bioethanol Production from Wasted Crops and Crop Residues. **Biomass and Bioenergy**, 26, p. 361-375, 2004.

KIM, T.; TAYLOR, F.; HICKS, K. Bioethanol Production from Barley Hull Using Saa (Soaking in Aqueous Ammonia) Pretreatment. **Bioresource Technology**, 99, p. 5694-5702, 2008.

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. **Biotechnol Progress**, 25, n. 2, p. 340-348, 2009.

KIM, Y.; XIMENES, E.; MOSIER, N.; LADISCH, M. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, 48, p. 408-415, 2011.

KOSSEVA, M. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. **Food Bioprocess Technology**, 4, p. 1089-1118, 2011.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, 45, n. 5, p. 437-447, 2009.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 38, n. 6, p. 776-783, 1993.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. *et al.* Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, 21, n. 4, p. 377-397, 2004.



- KRASŇAN, V.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats<sup>®</sup>. **Applied and Environmental Microbiology**, 100, n. 6, p. 2535-2553, 2016.
- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C. *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, 24, n. 3, p. 151-159, 1999.
- LENIHAN, P.; OROZCO, A.; O'NEILL, E.; AHMAD, M. *et al.* Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, 156, p. 395-403, 2010.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, 38, n. 4, p. 449-467, 2012.
- LIN, F.-M.; QIAO, B.; YUAN, Y.-J. Comparative Proteomic Analysis of Tolerance and Adaptation of Ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to Furfural, a Lignocellulosic Inhibitory Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, 75, n. 11, p. 3765, 2009.
- LINGA, V.; GOLI, J.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of Lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, 213, p. 299-310, 2016.
- LOPES, D.; ROSA, C.; HECTOR, R.; DIEN, B. *et al.* Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 44, p. 1-14, 2017.
- LOPES, M. R.; MORAIS, C. G.; KOMINEK, J.; CADETE, R. M. *et al.* 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 Res**, 16, n. 4, 2016.
- MAGUIRE, A.; RUGG-GUNN, A. J. Xylitol and caries prevention is it a magic bullet? **British Dental Journal**, 194, n. 8, p. 429-436, 2003.
- MANDLEKAR, N.; CAYLA, A.; RAULT, F.; GIRAUD, S. *et al.* An Overview on the Use of Lignin and Its Derivatives in Fire Retardant Polymer Systems. In: POLETTO, M. Lignin: Trends and Applications. Londres: Intechopen; p 207-231, 2018.
- 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**, 84, n. 1, p. 37-53, 2009.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. **Biotechnology Letters**, 19, n. 5, p. 407-409, 1997.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, 38, p. 522-550, 2012.

MICHELIN, M.; RUIZ, H.; SILVA, D.; RUZENE, D. *et al.* Cellulose from Lignocellulosic Waste. In: Ramawat K., Mérillon JM. Polysaccharides. Berlin: Springer; p. 1-11, 2014.

MICHELIN, M.; POLIZELI, M. d. L. T. M.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; RUIZ, H. A. *et al.* Production of xylanase and  $\beta$ -xylosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 35, n. 7, p. 1185-1192, 2012.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, 4, n. 3, p. 324-329, 2001.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A. *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVA, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 69, p. 20-28, 2007.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, 110, n. 10, p.1232-1241, 2006.

NILSSON, A.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G. Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, 71, n. 12, p. 7866-7871, 2005.

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

PAL, S.; MONDAL, A.; SAHOO, D. Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, 51, p. 809-819, 2016.

PARAJÓ, J. C.; GARROTE, G.; CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, H. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**, 15, n. 3, p. 115-120, 2004.

PELLOUX, J.; RUSTÉRUCCI, C.; MELLEROWICZ, E. J. New insights into pectin methylesterase structure and function. **Trends in Plant Science**, 12, n. 6, p. 267-277, 2007.

PEREGO, P.; CONVERTI, A.; PALAZZI, E.; DEL BORGHI, M.; FERRAILOLO, G. Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology**, 6, n. 3, p. 157-164, 1990.

PETERSSON, A.; THOMSEN, M.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; BJERRE, A. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. **Biomass and Bioenergy**, 31, p. 812-819, 2007.

PITKÄNEN, J. P.; ARISTIDOU, A.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L. *et al.* Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, 5, n. 1, p. 16-31, 2003.

RADOČAJ, O.; DIOSADY, L. L. Continuous Ethanol Fermentation in Immersed, Cross-Flow Microfiltration Membrane Bioreactor with Cell Retention. **Journal of Basic & Applied Sciences**, 10, p. 543-553, 2014.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, 26, p. 863-871, 2003.

REN, Y.; CHEN, L.; NIU, Q.; HUI, F. Description of *Scheffersomyces henanensis* sp. nov., a New D-Xylose-Fermenting Yeast Species Isolated from Rotten Wood. **PLOS ONE**, 9, n. 3, p. e92315, 2014.

ROCHA-MENESES, L.; FERREIRA, J. A.; MUSHTAQ, M.; KARIMI, S. *et al.* Genetic modification of cereal plants: A strategy to enhance bioethanol yields from agricultural waste. **Industrial Crops and Products**, 150, p. 112408, 2020.

RODRUSSAMEE, N.; SATTAYAWAT, P.; YAMADA, M. Highly efficient conversion of xylose to ethanol without glucose repression by newly isolated thermotolerant *Spathaspora passalidarum* CMUWF1-2. **BMC Microbiology**, 18, p. 1-11, 2018.

RUIZ, H.; RUZENE, D.; SILVA, D.; QUINTAS, M.; VICENTE, A. *et al.* Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw effect of particle size and process conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 86, p. 88-94, 2011.

SAHA, B.; ITEN, L.; WU, Y. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, 40, p. 3693-3700, 2005.

SAINI, J.; GUPTA, R.; HEMANSI; VERMA, A. *et al.* Integrated Lignocellulosic Biorefinery for Sustainable Bio-Based Economy: From Current Status to Practical Implementation. In: SRIVASTAVA, N; SRIVASTAVA, M; MISHRA, P.K.; UPADHYAY, S.N.; RAMTEK, P. Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies. Berlin: Springer; p. 25-46, 2019.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. d.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, 35, p. 1004-1010, 2012.

SARTHY, A. V.; MCCONAUGHY, B. L.; LOBO, Z.; SUNDSTROM, J. A. *et al.* Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 53, n. 9, p. 1996-2000, 1987.

SCHIRMER-MICHEL, Â. 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**, 84, n. 2, p. 223-228, 2009.

SHIKIDA, P. F. A.; PEROSA, B. B. Alcool combustível no Brasil e path dependence. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 50, p. 243-262, 2012.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. **Polymers**, 2, 2010.



SONG, J.-M.; WEI, D. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass and Bioenergy**, 34, p. 1930-1934, 2010.

SRIVASTAVA, N.; RAWAT, R.; OBEROI, H.; RAMTEKE, P. A Review on Fuel Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass. **International Journal of Green Energy**, 12, p.1-10, 2014.

SUH, S.-O.; HOUSEKNECHT, J. L.; GUJJARI, P.; ZHOU, J. J. *Scheffersomyces parashehatae* f.a., sp. nov., *Scheffersomyces xylosifermentans* f.a., sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implications. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63, p. 4330-4339, 2013.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, 9, p. 1621-1651, 2008.

TAN, K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. **Energy Policy**, 36, p. 3360-3365, 2008.

TÉBÉKA, I. R. M.; SILVA, A. G. L.; PETRI, D. F. S. Hydrolytic Activity of Free and Immobilized Cellulase. **Langmuir**, 25, n. 3, p. 1582-1587, 2009.

TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M. *et al.* Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, 98, n. 8, p. 1655-1663, 2007.

TOIVARI, M. H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, n. 6, p. 1-6, 2004.

VÁZQUEZ, M.; TÉLLEZ-LUIS, S.; RAMÍREZ DE LEÓN, J. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**, 98, p. 3053-3060, 2007.

VAN DER WALT, J. P.; FERREIRA, N. P.; STEYN, R. L. *Candida lyxosophila* sp. nov., a new D-xylose fermenting yeast from southern Africa. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 53, n. 2, p. 93-97, 1987.

VAN DYK, J.; PLETSCHKE, B. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, 30, p. 1458-1480, 2012.

VARIZE, C. S.; CADETE, R. M.; LOPES, L. D.; CHRISTOFOLETI-FURLAN, R. M. *et al.* *Spathaspora piracicabensis* f. a., sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 111, n. 4, p. 525-531, 2018.

VERBELEN, P. J.; DE SCHUTTER, D. P.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J. *et al.* Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, 28, n. 19, p. 1515-1525, 2006.

VIRKAJÄRVI, I. Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. **Technical Research Centre of Finland**, v. 430, 87 p., 2001.

WILLAERT, R. Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology. In: EL-MANSI, E. M. T.; NIELSEN, J.; MOUSDALE, D; CARLSON, R. P. Fermentation Microbiology and Biotechnology. Nova York: CRC Press; p.313-367, 2011.

YANG, S. T.; ZHONG, J. Bioreactor Engineering. In: YANG, S. T. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Amsterdã: Elsevier; p. 131-161, 2007.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BOM, E.P.S., *et al.* Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p.1147-1161, 2000.

ZHANG, W.; FRANCO, C. M. M. Characterizing the Heterogeneity of an Immobilized Cell Gel Matrix. **Engineering in Life Sciences**, 2, n. 12, p. 409-414, 2002.

ZHANG, Z.-T.; HUI, F.-L.; REN, Y.-C.; WANG, Y. *et al.* *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabeid beetle *Allomyrina dichotoma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 66, 2016.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **The Journal of Biotechnology**, 144, n. 1, p. 23-30, 2009.

ZIEGLER, I.; HOLMGREN, A.; FORSLING, W.; LINDBERG, M. *et al.* Mechanism of the Adsorption Process of Pinosylvin and Some Polyhydroxybenzenes onto the Structure of Lignin. **Vibrational Spectroscopy**, 36, p. 65-72, 2004.