

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Fermentação de xaropes artificiais constituídos de glicose e xilose e de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras não convencionais e cocultivos

Fernanda Roberta Rech

Caxias do Sul, 2016

R296f Rech, Fernanda Roberta

Fermentação de xaropes artificiais constituídos de glicose e xilose e de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras não convencionais e cocultivos / Fernanda Roberta Rech. – 216.

150 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 216.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Coorientação: Marli Camassola, Marco Antônio Záchia Ayub.

1. fermentação de xilose. 2. etanol de segunda geração. 3. dinâmica de crescimento. 4. seleção de leveduras. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Camassola, Marli, coorient. III. Ayub, Marco Antônio Záchia, coorient. IV. Título.

Fernanda Roberta Rech

Fermentação de xaropes artificiais constituídos de glicose e xilose e de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras não convencionais e cocultivos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadores: Profa. Dra. Marli Camassola

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Caxias do Sul, 2016

Fernanda Roberta Rech

Fermentação de xaropes artificiais constituídos de glicose e xilose e de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras não convencionais e cocultivos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Coorientadores: Profa. Dra. Marli Camassola

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

TESE APROVADA EM 23 DE SETEMBRO DE 2016

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Zachia Ayub

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Profa. Dra. Giandra volpato

Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

“A única maneira de se fazer um ótimo trabalho é amando aquilo que se faz”

(Steve Jobs)

Dedico este trabalho aos meus amados pais Antônio e Maria, aos meus irmãos Marcelo e Vanessa e ao meu noivo Carlos Adriano, pelo apoio, confiança e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido mais uma conquista em minha vida. Por ter me dado forças para prosseguir nos momentos em que fraquejei e pensei em desistir.

Ao meu orientador, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, por toda a dedicação e orientação despendidas na realização do presente trabalho, mas, principalmente, pela paciência com que me orientou ao longo destes quatro anos. Pelas palavras de sabedoria ditas nos momentos em que não obtive os resultados desejados e que o desânimo parecia ser maior que a vontade de continuar. Muito obrigada por me motivar a buscar o conhecimento e me mostrar que podemos ser melhores do que somos!

À minha coorientadora, Dra. Marli Camassola, pela orientação e amizade. Por ter aberto as portas do seu laboratório e ter acreditado no meu trabalho. Pela disposição e dedicação que sempre demonstrou no atendimento de minhas necessidades, principalmente pela parceria na coleta e no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Ao meu coorientador, Dr. Marco Antônio Záchia Ayub, pela colaboração na redação dos meus artigos.

Ao professor Carlos Augusto Rosa, por ter cedido as linhagens para a realização do presente trabalho e pela colaboração na leitura dos meus artigos.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e aos funcionários do Instituto de Biotecnologia, desde a equipe de limpeza até a secretária do programa, Lucimara Serafini Rech. Um agradecimento especial à minha banca de acompanhamento, Dra. Fernanda Bettin e Dr. Maurício Moura da Silveira.

Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassa, pela colaboração de todos, pelos momentos de descontração proporcionados, os quais tornavam resultados péssimos, motivo de risos. Gostaria de agradecer a algumas pessoas em especial: Sheila Montipó, obrigada por sua amizade desde a graduação e por ter me ajudado nos planejamentos experimentais, assim como na discussão de resultados. Daiane Menegol, obrigada por dividir comigo seu conhecimento em hidrólise e pré-tratamento. Caroline Hartmann, que aventura vivemos juntas em Capivari do Sul! Obrigada pelo auxílio (prático e psicológico) na “trituração” do bagaço! Vanessa Basso, obrigada pela sua grande amizade! Gina Seabra, pelas conversas e troca de experiência. À minha amiga (irmã) Laísa dos Reis e à técnica Dra. Roselei Claudete Fontana, pelos longos períodos passados juntas no laboratório, pelo auxílio com os biorreatores,

discussão de resultados e pelas colaborações psicológicas e concretas. Muito obrigada pelas conversas, conselhos e amizade, que contribuíram para a conclusão desta tese.

À bolsista de iniciação científica Letícia Clara Formolo Fonseca, por ter me auxiliado em alguns experimentos, na fase final do meu doutorado. A todos os bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Enzimas e Biomassa e também aos bolsistas de ensino médio, Jaíne e Rafael, que estavam sempre dispostos a me auxiliar na preparação dos meios de cultivo, quando não estavam trabalhando em seus projetos.

Ao Carlos Adriano, meu noivo, para o qual me faltam palavras de agradecimento. Pela paciência, dedicação e companheirismo. Por ter compartilhado meus anseios, minhas reclamações por nem sempre ter atingido os resultados desejados. Por me acompanhar nos finais de semana no Laboratório. Agora divido contigo essa conquista, afinal, ela também é tua. Obrigada meu amor!

À minha sogra Solange, pelo apoio e palavras de incentivo durante a realização deste trabalho! Obrigada!

Aos meus irmãos, Marcelo e Vanessa, por acreditarem e dividirem comigo este sonho. Aos meus sobrinhos, Maria Eduarda, Eduardo e Gustavo, por nem sempre ter dado a atenção que mereciam, devido à distância e às exigências dos experimentos.

Aos meus amados pais... toda a minha admiração e carinho não são suficientes para agradecer tudo o que fizeram por mim. Agradeço à minha mãe, por toda a paciência e audiência de meus pesares, pelo apoio e incentivo, acreditando nesse trabalho, muitas vezes mais do que eu mesma. Ao meu pai, pelo exemplo de garra e dedicação. Muito obrigada por tudo, amo vocês!

À Universidade de Caxias do Sul e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que eu subisse mais um degrau na escada de minha vida. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 A importância econômica do etanol	4
2.2 Biomassa lignocelulósica	6
2.3 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	9
2.4 Hidrólise enzimática	15
2.5 Fermentação de açúcares	17
2.5.1 Sacarificação e fermentação separadas	18
2.5.2 Sacarificação e fermentação simultâneas.....	19
2.6 Microrganismos fermentadores de pentoses.....	20
2.7 Rota de fermentação das pentoses	25
2.8 Cofermentação de leveduras para a produção de etanol.....	27
2.9 Melhoramento de linhagens produtoras de etanol a partir de pentoses	29
3. Resultados e Discussão	32
Artigo I.....	32
Ethanol production by <i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG-CM-Y303	33
2.7 Saccharification and separate fermentation (SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation).....	41
Artigo II	62
Dynamics of microbial growth during co-cultivation of	62
Dynamics of microbial growth during co-cultivation of <i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG-CM-Y303 with <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 in the presence of glucose and xylose	63
3.3. Artigo III	84

Produção de etanol a partir dos açúcares liberados da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar por cocultivo	85
3.4. Artigo IV.....	114
Incremento no consumo de xilose e produção de etanol por um variante genético de <i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG-CM-Y303 obtido por mutagênese e seleção em 2-deoxiglicose	115
4. DISCUSSÃO GERAL	131
5. CONCLUSÕES	134
6. PERSPECTIVAS	136
7. ANEXO I.....	137
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Arquitetura da parede da célula.....	06
Figura 2. Etapas da produção de etanol proveniente da biomassa lignocelulósica.....	10
Figura 3. Mecanismo para despolimerização da celulose por celulasas.....	17
Figura 4. Via metabólica do catabolismo de D-xilose e L-arabinose em fungos.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de diferentes materiais lignocelulósicos	08
Tabela 2. Principais vantagens e desvantagens de microrganismos fermentadores de pentoses.....	24
Tabela 3. Principais resultados obtidos na realização desta tese.....	133

RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como o bagaço da cana-de-açúcar, podem ser usados como matéria-prima para a produção biotecnológica de compostos com valor agregado, como o etanol 2G e o xilitol, visto que esses materiais possuem grandes quantidades de celulose e hemicelulose. No presente trabalho, observou-se a capacidade de leveduras não convencionais de converterem misturas de glicose e xilose em etanol e xilitol. Entre as leveduras avaliadas, *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 apresentou a melhor conversão de xilose. Em cultivos em frascos sob condições de aerofilia e microaerofilia, os fatores de rendimento de etanol foram de 0,25 e 0,39 g.g⁻¹, respectivamente. Condições de microaerofilia foram testadas com hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar e obteve-se um fator de conversão de 0,47 g.g⁻¹, rendimentos próximos à conversão teórica. A mesma linhagem foi usada em cocultivos com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 para avaliação da dinâmica de crescimento das leveduras, através do uso de um meio diferencial, para distinguir as colônias das duas linhagens. A metodologia possibilitou avaliar a cinética de crescimento e qual linhagem predomina na fermentação. O estudo foi realizado inicialmente com meio sintético, em Erlenmeyers, para a otimização dos parâmetros pH e quantidade inicial de células do inóculo, e os resultados mais promissores foram reproduzidos em biorreatores com 5 L de volume de trabalho. Os cocultivos foram avaliados também em hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor a 200 °C por 8 min, conduzidos sob condição de hidrólise e fermentação separadas (SHF) e hidrólise e fermentação simultâneas (SSF). O uso do cocultivo possibilitou a conversão de glicose e de xilose presentes no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado a etanol, atingindo uma produção de 15 g.L⁻¹ em biorreatores com volume de trabalho de 5 L na condição SSF. Como a linhagem *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 mostrou potencial para a produção de etanol 2G, foram selecionados variantes genéticos desta linhagem com capacidade de crescer em meio sintético contendo xilose e 2-deoxiglicose, após terem sido submetidos à mutagênese por radiação ultravioleta. Um variante selecionado foi submetido à pressão de seleção e estudado quanto à fermentação de misturas de glicose e de xilose em meio sintético e em meio formulado com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sendo avaliados os consumos de xilose e de glicose e a produção de etanol. Um variante denominado M13 apresentou uma produção de etanol de 36% e 68% superior ao parental, em meio sintético e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

Palavras chave: dinâmica de crescimento, etanol 2G, pressão de seleção, 2-deoxiglicose, xilose, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The agro-industrial lignocellulosic residues such as sugarcane bagasse can be used as feedstock in biotechnological production of value-added compounds such as ethanol and xylitol, due to its high cellulose and hemicellulose content. In the present work it was observed the ability of non-conventional yeasts to convert mixtures of glucose and xylose to second-generation ethanol and xylitol. Among them, one strain of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 showed good bioconversion of xylose. This strain was grown in 5 L bioreactors under aerobic and microaerophilic conditions, with the yields of ethanol ($Y_{P/S}$) of 0.25 and 0.39 g.g⁻¹ respectively. Microaerophilic conditions were tested with sugarcane bagasse enzymatic hydrolyzate and was obtained a $Y_{P/S}$ of 0.47 g.g⁻¹, near theoretical yields. This strain was used in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 to evaluate the yeast growth dynamics, using a differential medium to distinguish the colonies of the two species. This methodology was efficient to evaluate the growth kinetics and which strain is predominant in fermentation. The study was initially performed on synthetic medium using flasks for pH and inoculum optimization and the best results were reproduced in 5 L bioreactors. Co-cultures were evaluated in sugarcane bagasse pretreated by steam explosion at 200 °C for 8 min, under Separate Hydrolysis and co-Fermentation (SHF) and Hydrolysis Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). The co-cultures were able to metabolize the xylose and glucose present in pretreated sugarcane bagasse to ethanol, reaching a final concentration of 15 g L⁻¹ in bioreactor with 5 L of working volume in SSF conditions. Since *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 showed potential for producing ethanol, genetic variants of this strain that were capable of growing in synthetic medium containing xylose and 2-deoxyglucose were selected after being treated with ultraviolet (UV) light. One variant selected was subjected to selection pressure and studied for fermentation of mixtures of glucose and xylose in synthetic medium and medium containing sugarcane bagasse hydrolyzates, and xylose and glucose consumption and ethanol production were evaluated. The variant M13 showed ethanol production 36% and 68% higher than the parental strain in synthetic medium and medium containing sugarcane bagasse hydrolyzates, respectively.

Keywords: growth kinetics, second generation ethanol, selection pressure, 2-deoxyglucose, xylose, agro-industrial.

1. INTRODUÇÃO

As fontes de energia renováveis vêm ganhando cada vez mais destaque, por diminuírem a dependência pelo uso de combustíveis fósseis. No contexto das fontes de energias sustentáveis, o etanol é uma das alternativas mais promissoras para o desenvolvimento de tecnologias limpas, visto a possibilidade desse biocombustível de substituir os combustíveis derivados do petróleo, permitindo a diminuição da dependência por recursos não renováveis e, ao mesmo tempo, a redução das emissões de gases de efeito estufa.

Atualmente, a maior parte do etanol produzido é oriunda de matérias-primas amiláceas ou sacaríneas, como o milho e a cana-de-açúcar. Entretanto, há um grande esforço na pesquisa pelo desenvolvimento de processos economicamente viáveis, visando ao aproveitamento da biomassa lignocelulósica, que se constitui de resíduos agrícolas (palha e bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, palha e sabugo de milho), resíduos florestais (serragem e restos de madeira) e, também, as culturas que se constituem em biomassa, como capim-elefante, sendo o produto mais visado o etanol, que vem sendo conhecido como etanol de segunda geração ou etanol 2G.

No Brasil, dois grandes investimentos para o etanol 2G já estão em atividade, a planta da GranBio[®], localizada no Estado de Alagoas e a planta da Raízen[®], localizada no Estado de São Paulo.

Entre os gargalos para a aplicação da tecnologia do etanol 2G, está a disponibilidade de microrganismos capazes de fermentar tanto glicose, proveniente da celulose, como xilose, oriunda da hidrólise da hemicelulose. Do ponto de vista da economia do processo, se as frações da matéria-prima (celulose e hemicelulose) forem utilizadas eficientemente, o custo do processo pode ser reduzido e a produção de etanol 2G pode ser viabilizada, além de não

ser necessário o aumento das áreas plantadas de matéria-prima, o que evita a competição com a produção de alimentos.

Na atualidade, o microrganismo utilizado na maioria dos processos de fermentação alcoólica é *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, esta levedura não expressa as enzimas que fermentam pentoses. Entre as leveduras mais usadas capazes de fermentar pentoses, destacam-se *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* e *Spathaspora arborariae*; porém, estas não são eficientes para produzir etanol, pois algumas linhagens, na presença de glicose e de xilose, fermentam preferencialmente a glicose. Outras linhagens, como *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, possuem baixa tolerância a altas concentrações de etanol.

Uma alternativa para o consumo de todos os açúcares presentes nos hidrolisados é o emprego de microrganismos geneticamente modificados ou o uso de consórcios microbianos - um microrganismo tradicional para a fermentação de hexoses e outro para a fermentação de pentoses. São relevantes as tentativas de encontrar “novos” microrganismos para a fermentação de glicose e de xilose, a utilização de pressão evolutiva para aumentar os rendimentos de fermentação, ou mesmo utilizar estes “novos” microrganismos fermentadores de xilose em estudos de cocultivo com leveduras da espécie *S. cerevisiae*, que são empregadas convencionalmente em fermentação alcoólica.

Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol 2G, avaliando leveduras não convencionais e cocultivos. Para tanto, trabalhou-se para atingir os seguintes objetivos específicos:

- ✓ avaliar a produção de etanol e de xilitol em aerobiose e em anaerobiose por diferentes linhagens de leveduras em meio sintético constituído de glicose e de xilose;
- ✓ aplicar programa de melhoramento genético na linhagem *S. hagerdaliae*;

- ✓ obter variantes genéticos desreprimidos para fermentação de pentoses, com o uso de 2-deoxiglicose;
- ✓ otimizar as variáveis do processo pH e quantidade de inóculo, em meio sintético com a linhagem *Spathaspora hagerdaliae* e do cocultivo com a linhagem *S. cerevisiae* CAT-1;
- ✓ aplicar as condições otimizadas para a fermentação em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar;
- ✓ avaliar a presença de inibidores no bagaço de cana-de-açúcar tratado por explosão a vapor e a influência que exercem sobre a linhagem *S. hagerdaliae* e sobre o cocultivo com a linhagem *S. cerevisiae*;
- ✓ analisar a dinâmica de crescimento do cocultivo pelo uso de um meio diferencial;
- ✓ avaliar rendimentos de hidrólise enzimática e fermentação em separado e de hidrólise e fermentação simultâneas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A importância econômica do etanol

Devido às crescentes preocupações com a exaustão dos combustíveis fósseis e com o aumento da emissão dos gases de efeito estufa, o etanol 2G tem sido visto como uma alternativa aos combustíveis não renováveis (Wang *et al.*, 2014). Entre os países produtores de etanol no mundo, o Brasil se destaca como o segundo maior produtor deste biocombustível, sendo que, no período de 2014/2015, produziu 28,39 bilhões de litros de etanol oriundos da cana-de-açúcar (ÚNICA, 2016). Os EUA são os maiores produtores de etanol, porém, utilizam o milho como matéria-prima, uma cultura menos eficiente se comparada à cana-de-açúcar.

Entre os anos de 1968 e 1973, o Brasil passava por um momento de crescimento econômico. No entanto, no ano de 1973, ocorreu a primeira crise mundial do petróleo e isso acabou afetando o setor econômico brasileiro (Kohlhepp, 2010). Os governantes da época, preocupados com a situação do país, lançaram, em 14 de novembro de 1975, o Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), que visava à substituição de carros movidos à gasolina por carros movidos a etanol (Canilha *et al.*, 2010).

Os idealizadores do Pró-Álcool estimularam o desenvolvimento de uma tecnologia pioneira no Brasil, uma vez que estavam preocupados com a possibilidade de uma nova crise do petróleo. O resultado é que o País ficou menos dependente da gasolina e reduziu o número de carros movidos pelo derivado de petróleo (Balat *et al.*, 2008). A matéria-prima escolhida para a produção do biocombustível foi a cana-de-açúcar, que estava com o preço do açúcar em baixa. Devido a esta política, o Brasil praticamente não foi afetado pela crise energética de 1979 (Balat *et al.*, 2008). No entanto, logo depois da crise, o preço do barril de petróleo

baixou e a produção do etanol não era vantajosa; paralelamente, o preço do açúcar também voltou a aumentar (Lehtonen, 2011).

A discussão da importância da produção de etanol ressurgiu no final da década de 80, devido ao grande aumento de gases de efeito estufa e à pressão dos países pelo desenvolvimento de fontes renováveis de energia. Em março de 2003, foram desenvolvidos os primeiros carros com motores *flex-fuel* no Brasil – carros que funcionam com etanol e/ou com gasolina. As misturas de etanol combustível são usadas em todos os tipos de veículos e motores que exijam gasolina (Kohlhepp, 2010).

O etanol ou álcool etílico é um combustível líquido, com fórmula molecular C_2H_6O , que pode ser utilizado em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto) de duas maneiras, basicamente: 1) como etanol puro, geralmente hidratado; ou 2) em misturas de gasolina e etanol anidro (20 a 25% (v/v)) (Balat *et al.*, 2008; BNDES & CGEE, 2008).

A maior parte do etanol produzido, atualmente, é descrito convencionalmente na literatura como etanol de “primeira geração”, obtido diretamente da fermentação de matérias-primas sacaríneas ou amiláceas; o chamado etanol 2G é o proveniente da biomassa lignocelulósica; e o etanol de “terceira geração”, proveniente de algas (Baeyens *et al.*, 2015).

O etanol 2G pode ser obtido de materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz, a palha e o sabugo de milho, entre outros agrosíduos (Dias *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2012). No Brasil, investimentos na pesquisa e desenvolvimento da tecnologia do etanol 2G têm aumentado consideravelmente. Como exemplo, podem-se destacar as plantas industriais GranBio[®] e Raízen[®]. A GranBio[®] foi pioneira na produção de etanol 2G, iniciando seus trabalhos em setembro de 2014, em Alagoas, já a Raízen[®] inaugurou a primeira unidade de produção em julho de 2015, no Estado de São Paulo.

2.2 Biomassa lignocelulósica

O complexo lignocelulósico é o maior componente estrutural de plantas lenhosas e não lenhosas, como a cana-de-açúcar, sendo que os resíduos agrícolas e florestais são os materiais lignocelulósicos mais abundantes e renováveis da biosfera (Kuhad & Singh, 2007; Canilha *et al.*, 2010). Eles são constituídos por três tipos de macromoléculas majoritárias, celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1), unidas por ligações químicas covalentes e não covalentes (Pérez, 2002). A composição química dos materiais lignocelulósicos varia em função do tipo de biomassa; geralmente, a celulose e a hemicelulose constituem 36-61% e 13-39% da massa seca total do material, respectivamente, que podem ser utilizadas para a produção de etanol (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996; Gírio *et al.*, 2010). A Tabela 1 apresenta a composição de diferentes materiais lignocelulósicos.

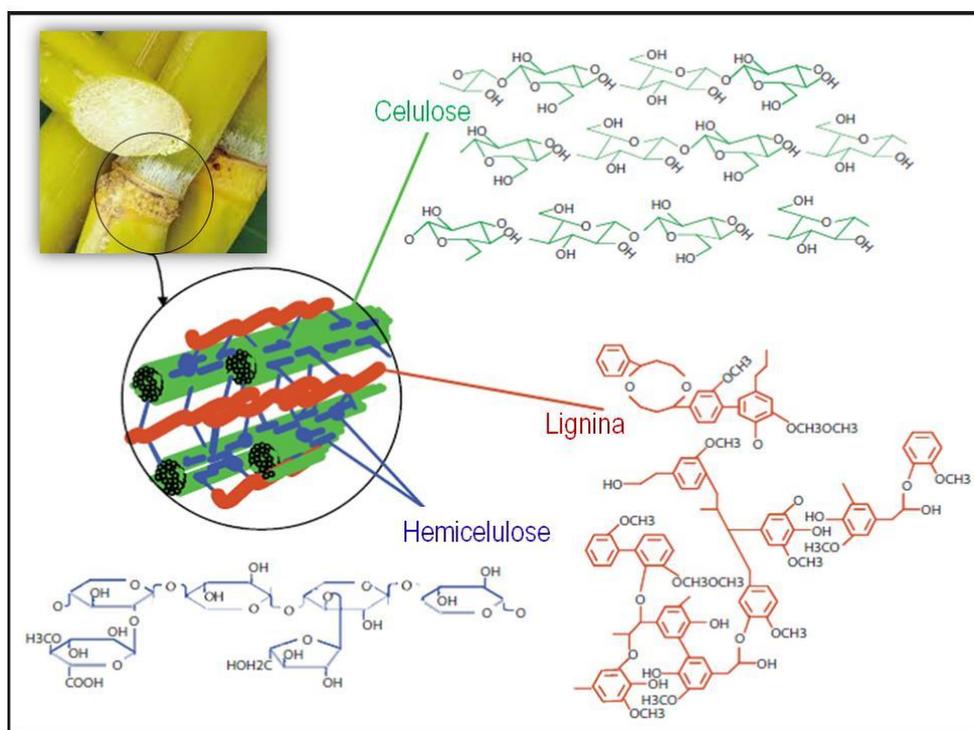


Figura 1: Arquitetura da parede celular vegetal, destacando-se a presença dos polissacarídeos celulose e hemicelulose e da macromolécula lignina (adaptado de: <http://www.biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose>).

Tabela 1. Composição de diferentes materiais lignocelulósicos (% massa seca).

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Autor
Casca de arroz	34,5	15,3	28,0	15,9	Hickert <i>et al.</i> (2013b)
Capim-elefante não tratado	37,0	22,4	20,7	8,53	Menegol <i>et al.</i> (2014)
Capim-elefante pré-tratado	47,0	23,9	22,6	4,6	Menegol <i>et al.</i> (2014)
Palha de arroz	37,1	23,5	15,8	8,0	Merali <i>et al.</i> (2015)
Bagaço de cana-de-açúcar	39,8	28,6	22,5	2,4	Oliveira <i>et al.</i> (2012)
Palha de arroz	33,2	17,7	14,7	6,1	Park <i>et al.</i> (2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	38,8	26,0	32,4	2,8	Silva <i>et al.</i> (2010)
Palha de cana-de-açúcar	33,6	28,9	31,8	5,7	Silva <i>et al.</i> (2010)
Sabugo pré-tratado	31,2	43,1	16,5	2,0	Silvério <i>et al.</i> (2013)

A celulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica, juntamente com a hemicelulose e a lignina (Pérez, 2002). Trata-se de um polímero linear estrutural da parede celular de plantas, sendo constituída por longas cadeias de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β -1-4 (Lymayem & Ricke, 2012). As fibras de celulose contêm regiões cristalinas e regiões amorfas. A estrutura amorfa é mais susceptível à degradação enzimática se comparada à estrutura cristalina (Walker & Wilson, 1991; Pérez, 2002).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (Saha, 2003). Esse heteropolímero é composto por diferentes unidades de açúcares, de cinco ou seis átomos de carbono, incluindo as pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácidos glucorônico, 4-*O*-metil-éter e acetil) (Saha, 2003; Canettiere, 2004; Gírio *et al.*, 2010). Sua estrutura apresenta ramificações laterais de cadeias curtas que interagem com a celulose e que são facilmente hidrolisados quando submetidos a pré-tratamento (Pérez, 2002; Ramos, 2003).

A lignina é uma macromolécula tridimensional amorfa, de elevada massa molecular, insolúvel em água, cuja principal função é conferir resistência e rigidez à planta (Hofrichter, 2002). Ela age como uma parede cobrindo os polissacarídeos celulose e hemicelulose, dificultando o acesso do complexo enzimático aos carboidratos (Conde-Mejía *et al.*, 2012). Sua estrutura não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares, formada pela união de anéis aromáticos unidos por ligações covalentes (Walker & Wilson, 1991). Em função de sua estrutura, a lignina é de difícil degradação quando comparada aos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) (Silva & Gomes, 2004). Sua composição varia de acordo com o material lignocelulósico, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (Lu *et al.*, 2002).

Os resíduos lignocelulósicos requerem um processamento extensivo para a transformação em açúcares fermentescíveis, devido à forte ligação existente entre os três componentes poliméricos da biomassa e, posteriormente, uma conversão biológica para produção de etanol. A disponibilidade da biomassa, as estratégias de pré-tratamento, os agentes hidrolíticos eficientes e a disponibilidade de microrganismos fermentativos influenciam nos custos para viabilizar a produção de etanol (Knauf & Moniruzzaman, 2004; Canilha *et al.*, 2010).

2.3 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

A presença de lignina envolvendo as cadeias de celulose e hemicelulose dificulta o acesso de agentes químicos e biológicos, tornando necessária a realização de pré-tratamento para a desestruturação das ligações entre a lignina e os polissacarídeos (Sun & Cheng, 2002; Moiser *et al.*, 2005). O pré-tratamento é um fator chave para a bioconversão da biomassa lignocelulósica em etanol, uma vez que esse processo tem sido visto como a etapa mais onerosa do sistema de produção de combustíveis 2G (Moiser *et al.*, 2005; Soccol *et al.*, 2010). Assim, muitos processos de pré-tratamento têm sido desenvolvidos com o objetivo de converter os carboidratos presentes nos resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis, buscando por melhores rendimentos de produto e menores custos de processamento (Jorgensen *et al.*, 2007; Delabona *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013).

A produção de etanol 2G a partir de resíduos agroindustriais (Figura 2) envolve quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação do produto (Moiser *et al.*, 2005). O principal objetivo do pré-tratamento é gerar uma desestruturação do complexo lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) (Agbor *et al.*, 2011),

aumentando a área superficial e diminuindo o grau de cristalinidade da celulose, o que possibilita incrementos na digestibilidade do complexo enzimático e, conseqüentemente, em elevados rendimentos de carboidratos fermentescíveis (Wooley *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.*, 2007).

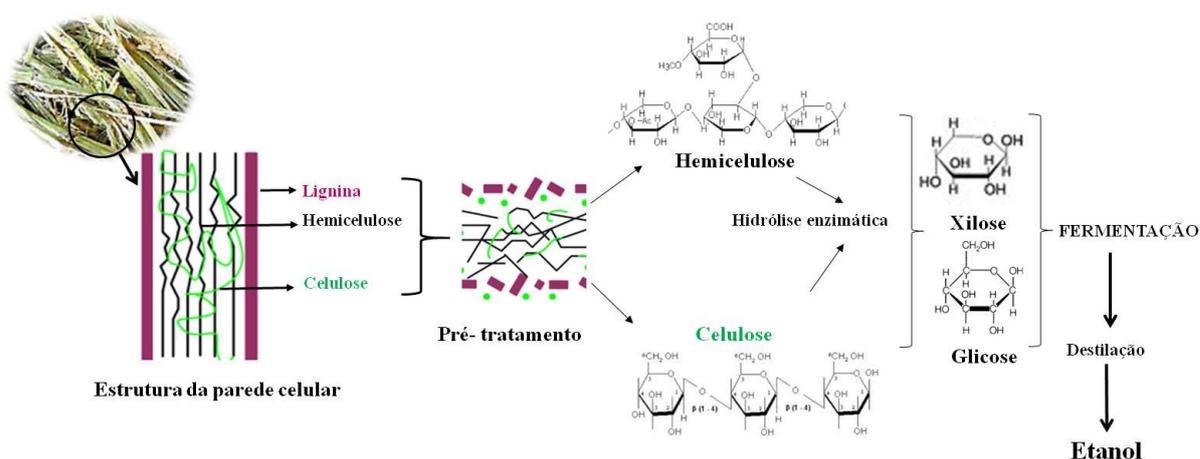


Figura 2. Etapas da produção de etanol proveniente da biomassa lignocelulósica (adaptado de Santos *et al.*, 2012).

É importante destacar que a eficácia do pré-tratamento é resultante da interação entre temperatura, acidez do meio e tempo. Alguns trabalhos (Scholl, *et al.*, 2015; Pappas, *et al.*, 2014; Pitarelo, 2013) têm sido desenvolvidos com um parâmetro denominado grau de severidade, que relaciona os três fatores, com o objetivo de determinar o grau de severidade ótimo. Pappas, *et al.*, 2014 avaliaram o efeito do grau de severidade no pré-tratamento de alpista-da-água (*Phalaris aquatica L.*). Os pré-tratamentos foram expressos em grau de severidade que variou de 0,13-1,16. Os resultados mais promissores foram obtidos com grau de severidade de 1,16 (T = 130°C; t = 60 min; Ác. Sulfúrico = 2% (v/v)). Nesta condição os autores obtiveram a maior quantidade de açúcares fermentescíveis (85,05%)

Várias estratégias para a bioconversão de resíduos agroindustriais em açúcares fermentescíveis têm sido apresentadas em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve pré-tratar a biomassa para, então, submetê-la à hidrólise enzimática (Jorgensen *et al.*, 2007; Canilha *et al.*, 2010). É importante destacar que a escolha do método de pré-tratamento também depende do material lignocelulósico (Karimi & Taherzadeh, 2016).

Na teoria, um pré-tratamento ideal deve resultar em uma elevada recuperação de todos os polissacarídeos, grande digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática, elevada concentração de carboidratos fermentescíveis no mosto e requerer uma baixa demanda energética, assim como baixos investimentos e custo operacional. Adicionalmente, deve evitar a formação de compostos inibitórios (fenol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) que interfiram no crescimento do microrganismo e no processo fermentativo (Moiser *et al.*, 2005; Galbe *et al.*, 2007; Conde- Mejía *et al.*, 2012; Menon & Rao 2012).

Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados em físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes, sendo que o objetivo principal de qualquer um dos métodos é desestruturar a biomassa lignocelulósica (Sun & Cheng, 2002; Menon & Rao, 2012; Karimi & Taherzadeh, 2016).

A maior parte dos materiais lignocelulósicos requer algum tipo de processamento mecânico, como a moagem, para reduzir o tamanho da partícula do material (Menon & Rao, 2012). Os pré-tratamentos físicos caracterizam-se por aumentarem a área superficial específica e diminuírem tanto o grau de polimerização quanto a cristalinidade da celulose (Agbor *et al.*, 2011). Porém, a demanda de energia depende do tamanho da partícula do material, que geralmente é grande e torna o custo

do processo muito elevado e economicamente inviável (Canilha *et al.*, 2010; Karimi & Taherzadeh, 2016).

Os pré-tratamentos químicos caracterizam-se pelo uso de produtos químicos associados à matéria-prima, podendo estar aliado a altas temperaturas e pressões para torná-lo realmente efetivo (Hickert, 2014).

Os pré-tratamentos químicos foram originalmente desenvolvidos pela indústria de papel para a deslignificação da celulose com o objetivo de produzir um papel de alta qualidade (Menon & Rao, 2012). As técnicas de pré-tratamento estudadas têm a finalidade de melhorar a biodegradabilidade da celulose através da remoção da lignina e/ou da hemicelulose, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose (Mosier *et al.*, 2005). Entre os vários pré-tratamentos químicos existentes, estão os pré-tratamentos por organossolventes, ácidos, bases, ozonólise e líquidos iônicos, entre outros (Canilha *et al.*, 2010; Menon & Rao, 2012; Toscan, 2013; Hickert, 2014).

O pré-tratamento que faz uso de álcalis é bastante usado para aumentar a digestibilidade da celulose; no entanto, a grande desvantagem deste processo está no custo do hidróxido de sódio, na dificuldade de sua recuperação e na geração de efluentes tóxicos em grandes quantidades (Sun & Cheng, 2002). Outra desvantagem é que, durante o processo de deslignificação, parte da hemicelulose é hidrolisada, ou seja, o efeito não ocorre exclusivamente sobre a lignina (Menon & Rao, 2012).

Os pré-tratamentos ácidos envolvem tanto o uso de ácidos concentrados como diluídos para quebrar a estrutura rígida do material lignocelulósico. O ácido mais usado é o ácido sulfúrico e considera-se a junção de ácido diluído e temperaturas intermediárias como um dos processos mais eficientes no que diz respeito à relação custo-benefício, atuando de maneira a expandir a parede celular através da degradação da hemicelulose (Sivakuman *et al.*, 2008). A realização de um pré-tratamento ácido

(remoção da hemicelulose), seguido por um pré-tratamento alcalino (remoção da lignina), resulta numa celulose relativamente pura (Menon & Rao, 2012). Uma das desvantagens desse processo é a geração de compostos secundários, como o furfural e o hidroximetilfural, que podem inibir o crescimento dos microrganismos na etapa de fermentação (Hickert, 2014).

Os líquidos iônicos são uma nova classe de solventes que têm sido usados em processos de pré-tratamento. Eles são, geralmente, líquidos que consistem somente de íons, definidos como sais, cujo ponto de fusão é menor do que 100 °C. Esses líquidos têm sido usados para a dissolução dos materiais lignocelulósicos. Uma das principais vantagens do uso desses solventes é que, após o pré-tratamento, o tempo de hidrólise enzimática pode ser reduzido drasticamente e os rendimentos de conversão de celulose em glicose podem chegar a 100% (Menon & Rao, 2012).

Outra classe de pré-tratamento químico é a ozonólise, onde o ozônio é utilizado para degradar a hemicelulose e a lignina da biomassa lignocelulósica. Entre as vantagens deste processo estão: as reações são realizadas em pressão e temperatura ambiente, não ocorre geração de produtos tóxicos e ocorre remoção eficiente da lignina (Vidal & Molinier, 1988). No entanto, esse processo requer uma grande quantidade de ozônio, o que o torna inviável economicamente.

Os pré-tratamentos biológicos empregam o uso de microrganismos, tais como fungos da podridão branca e marrom e bactérias para a deslignificação parcial da biomassa lignocelulósica (Alvira *et al.*, 2010). Até o momento, o pré-tratamento biológico tem sido pouco utilizado devido às suas limitações, pois o processo é extremamente lento e requer um controle rigoroso das condições de crescimento do microrganismo, além de exigir um amplo espaço para a realização do processo (Menon & Rao, 2012). No entanto, eles apresentam vantagens, por não necessitarem de adição

de produtos químicos tóxicos, não gerarem resíduos causadores de poluição ambiental e demandarem baixas quantidades de energia (Camassola & Dillon, 2009).

De modo geral, a combinação de processos físicos e químicos geram os resultados mais promissores (Scholl *et al.*, 2015). Tratamentos físicos associados aos químicos, onde se incluem a explosão de fibra com amônia (AFEX) e explosão a vapor, são citados na literatura como sistemas de pré-tratamentos mais eficientes (Sun & Cheng, 2002).

A AFEX (*Ammonia Fiber Explosion*) é um pré-tratamento que envolve o uso de amônia líquida combinado ao processo de explosão a vapor. Os materiais lignocelulósicos são expostos a altas temperaturas e pressão, seguida por uma descompressão rápida. Este processo descristaliza a celulose, hidrolisa a hemicelulose, remove e despolimeriza a lignina, aumentando o tamanho e o número de microporos na parede celular, resultando no aumento significativo da velocidade da hidrólise enzimática (Bals *et al.*, 2010). Uma das principais desvantagens do método é a geração de compostos inibitórios e, também, o custo do processo.

O método de pré-tratamento por explosão a vapor é um dos mais estudados (Ramos *et al.*, 1992; Galbe & Zacchi, 2002). O processo consiste no aquecimento da biomassa com vapor saturado, seguido por uma súbita descompressão do sistema pressurizado. O vapor penetra dentro do material lignocelulósico e condensa em forma de água líquida dentro da fibra. Depois da súbita descompressão, o vapor é rapidamente evaporado, gerando, literalmente, uma explosão dentro da fibra (Allen *et al.*, 2001; Silvério *et al.*, 2013). Por outro lado, o pré-tratamento por altas temperaturas conduz à hidrólise de grupos acetil e à liberação de ácido acético catalisado pela hidrólise de polissacarídeos, principalmente pela hemicelulose, num processo conhecido como auto-hidrólise (Fengel & Wegener, 1989). Além disso, pode ocorrer a transformação ou

degradação parcial da lignina (Chen *et al.*, 2008). A eficácia do pré-tratamento por explosão a vapor tem sido mostrada em experimentos em laboratório e em escala piloto (Rocha *et al.*, 2012). No entanto, não existem muitos trabalhos sobre esse pré-tratamento, aplicado ao bagaço e à palha da cana-de-açúcar em escala industrial (Silvério *et al.*, 2013).

2.4 Hidrólise enzimática

A sacarificação é uma etapa importante no processo de produção de etanol 2G, onde os hidratos de carbono mais complexos são convertidos em monômeros simples pela ação de enzimas (Sarkar *et al.*, 2012). As enzimas requerem condições ótimas de temperatura (45-50°C) e pH (4-5) para que o processo de sacarificação seja eficiente. A hidrólise enzimática apresenta vantagens quando comparada à hidrólise ácida, principalmente em termos de diminuição de custos totais do processo, devido às menores temperaturas, o que faz com que o consumo de energia seja baixo e, também, por evitar problemas de corrosão (Balat *et al.*, 2008). A principal desvantagem deste processo ainda continua sendo o custo das enzimas; no entanto, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a produção de enzimas e elaborar coquetéis enzimáticos para aplicação em materiais lignocelulósicos (Banerjee *et al.*, 2010).

A classificação das celulasas é fornecida de acordo com a região de atuação na fibra de celulose, que as divide em três grupos: endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.91) e β -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21) (Dillon *et al.*, 2008; Arantes & Saddler, 2010). Essas enzimas atuam em sinergia para a liberação dos açúcares. As endoglucanases são propostas para iniciar o ataque aleatório nas regiões

amorfias internas da fibra de celulose, abrindo essas regiões para o ataque posterior pelas exoglucanases. As exoglucanases são o principal constituinte do sistema de celulases de fungos, contabilizando de 40 a 70 % das proteínas totais capazes de hidrolisar a celulose cristalina. As exoglucanases removem os monossacarídeos e dissacarídeos das extremidades da cadeia de glicose. A β -glucosidase hidrolisa celobiose e oligossacarídeos solúveis em monômeros de glicose (Lima *et al.*, 2005; Castro, 2010).

As hemicelulases são enzimas responsáveis pela hidrólise da hemicelulose em açúcares fermentescíveis. Entre as hemicelulases, destacam-se as xilanases, que atuam na despolimerização da hemicelulose e catalisam a hidrólise da xilana, produzindo xilooligossacarídeos. As xilanases atuam em sinergia junto com outras hemicelulases: β -xilosidases, manases e arabinofuranosidases, dentre outras (Gírio *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011). O processo de despolimerização da celulose e hemicelulose pela ação das enzimas é ilustrado na Figura 3.

As celulases e hemicelulases podem ser produzidas por uma grande variedade de microrganismos, no entanto, poucos são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, capazes de degradar naturalmente a celulose e a hemicelulose. Nos processos industriais, destacam-se os fungos filamentosos, devido às suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e enzimológicas (Florencio, 2011). O fungo *Trichoderma reesei* foi um dos primeiros organismos celulolíticos isolados e que serviu de modelo para os estudos de celulases e hemicelulases. *T. reesei* e seus mutantes são usados para a produção comercial de celulases e hemicelulases (Scheufele, 2012). Outro microrganismo que tem apresentado um alto potencial na produção de celulases é *Penicillium echinulatum*. Sua capacidade secretora é comparável ao *T. reesei* (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006; Camassola & Dillon, 2010; Dillon *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2013; Reis *et al.*, 2014).

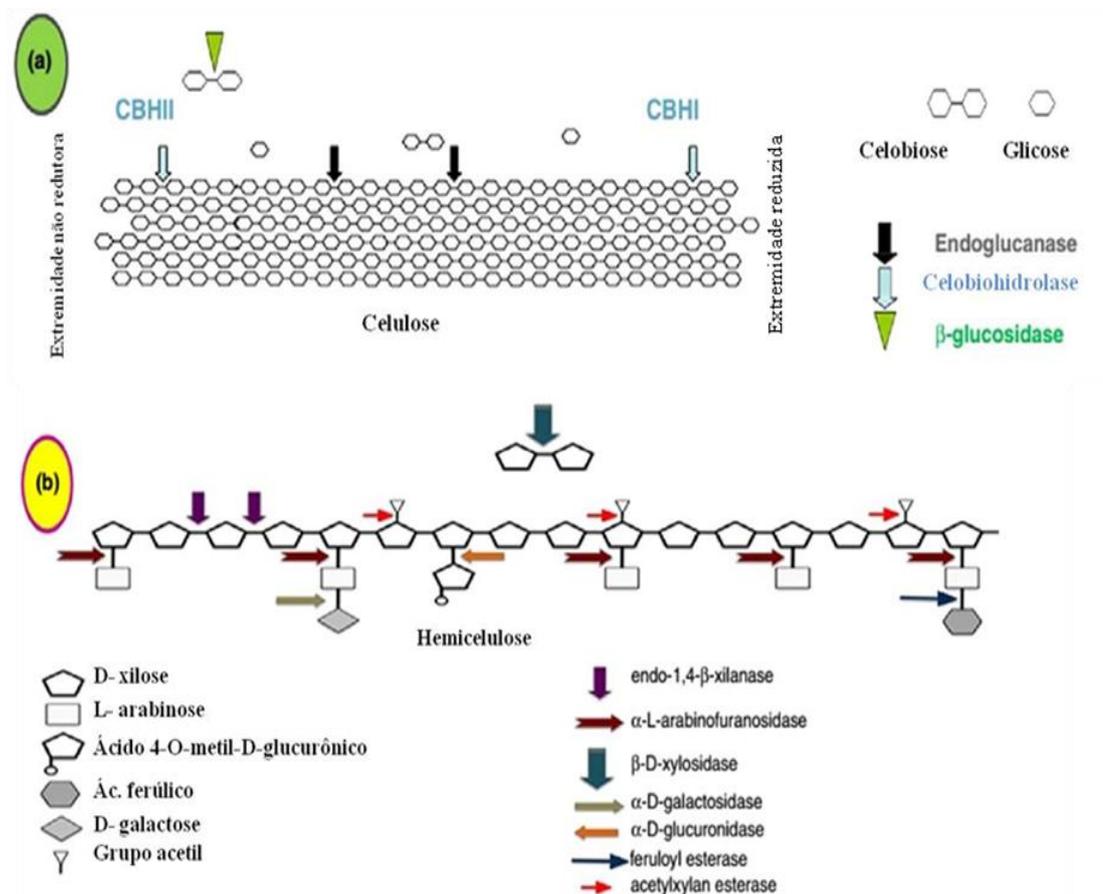


Figura 3. Enzimas envolvidas no mecanismo de despolimerização da celulose (a) hemicelulose (b) (adaptado de Zabed *et al.*, 2016).

2.5 Fermentação de açúcares

Os açúcares provenientes da hidrólise da biomassa lignocelulósica podem ser fermentados a etanol pela ação de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos (Hamelinck *et al.*, 2005).

Para que o processo de fermentação de materiais lignocelulósicos se torne economicamente viável, é necessário ter um microrganismo que fermente tanto pentoses quanto hexoses. De acordo com as reações abaixo (Equação 1a e 1b), o máximo rendimento teórico para glicose é de 0,51 g de etanol por g de açúcar (Balat *et al.*,

2008), já o rendimento teórico de etanol para a xilose (usando a via oxidativa) é de 0,46 g de etanol por g de açúcar (Kim *et al.*, 2013). É importante destacar que se a conversão de xilose for realizada utilizando a via da Xilose isomerase (XI), a conversão de açúcares em etanol é a mesma que para glicose (0,51 g.g⁻¹).



extra requerida para regeneração do NADPH e abastecimento de NAD⁺ (b)

Equação 1: (a) e (b) (Kim, *et al.*, 2013).

O processo de fermentação pode ser conduzido por sacarificação e fermentação separadas (SHF - *separate hydrolysis and fermentation*) ou sacarificação e fermentação simultâneas (SSF - *simultaneous saccharification and fermentation*), conforme descrito a seguir.

2.5.1 Sacarificação e fermentação separadas

O processo de sacarificação e fermentação ocorre em duas etapas: primeiramente, a celulose é hidrolisada em celobiose e glicose pela ação das enzimas e na segunda etapa, os açúcares são fermentados pela ação dos microrganismos (Paulová *et al.*, 2014). Neste processo, pode haver um controle mais eficiente das condições operacionais, como a temperatura. A principal vantagem dessa estratégia é permitir que a hidrólise e a fermentação sejam operadas em condições ótimas. A temperatura ótima para as celulasas está entre 45°C e 50°C, enquanto que a temperatura ideal para o metabolismo e crescimento dos microrganismos produtores de etanol está na faixa de

30°C e 37°C (Olsson *et al.*, 2006). Nestas condições, portanto, a atividade de ação das enzimas não é concomitante com a produção de etanol e a viscosidade do meio é reduzida antes da fermentação, ao contrário do processo de SSF (Paulová *et al.*, 2014). No entanto, uma das principais desvantagens desse processo é que as celulases são inibidas pelo produto, ou seja, quando ocorre acúmulo de glicose e celobiose no meio, a taxa de hidrólise reduz progressivamente, levando a baixos rendimentos em etanol (Szczo drak & Fiedurek, 1996; Balat *et al.*, 2008). Segundo Taherzadeh & Karimi (2007), a atividade celulolítica pode ser reduzida em até 60% quando a concentração de celobiose atinge 6 g.L⁻¹.

Embora o processo de SHF possa ser realizado no mesmo biorreator, alguns autores enfatizam o custo elevado deste método quando o processo é realizado em dois biorreatores (Santos *et al.*, 2010). Na literatura, existem trabalhos que mencionam o uso de SHF (da Cunha Pereira *et al.*, 2011; Hickert *et al.*, 2013a e 2013b; Hansen *et al.*, 2014). No entanto, para tornar a produção de etanol 2G economicamente viável, é necessário alcançar uma produção mínima de 100 g.L⁻¹ em etanol. Porém, isso pode ser atingido somente com o aumento da carga de substrato inicial, o que acaba desencadeando o acúmulo de glicose no meio e a conseqüentemente inibição enzimática (Paulová *et al.*, 2014).

2.5.2 Sacarificação e fermentação simultâneas

A SSF tem sido o método mais usado para a produção de biocombustíveis, pois, nesse processo, a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas concomitantemente, no mesmo reator, reduzindo os custos operacionais e evitando a inibição das celulases pela glicose, resultante da hidrólise (Brodeur *et al.*, 2011). Este processo requer um menor tempo de fermentação e possui menores riscos de

contaminação, devido à alta temperatura de operação, presença de etanol e condições anaeróbias. Apesar destas vantagens, a SSF tem alguns pontos negativos, entre eles as diferentes temperaturas ótimas para hidrólise enzimática (45-50°C) e fermentação (28-35°C), a inibição dos microrganismos fermentativos e das celulases pelo etanol e por subprodutos formados na etapa de pré-tratamento, como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (Szcodrak & Fiedurek, 1996). Uma possível solução para resolver estes problemas é o uso de leveduras termotolerantes que permitem altas temperaturas de processamento (Kádar *et al.*, 2004). Neste caso, a temperatura a ser utilizada passa a contemplar a atividade do microrganismo e das enzimas da hidrólise de matéria-prima. Algumas pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de combinar o pré-tratamento com SSF, com a finalidade de maximizar a produtividade e tornar o processo geral mais eficiente (Ballesteros *et al.*, 2004; Brodeur *et al.*, 2011). Ballesteros *et al.*, 2004 avaliaram a produção de etanol a partir de diferentes materiais lignocelulósicos (resíduos de álamo e eucalipto, palha de trigo, bagaço de sorgo, entre outros), pelo processo SSF usando *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Os experimentos foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers* de 100 mL, T = 42°C por 160 h. As maiores concentrações de etanol (19 e 18,1 g.L⁻¹) foram obtidas com resíduos de álamo e palha de trigo, respectivamente, após 72 h de cultivo. Segundo Keller *et al.* (2003), o uso de um pré-tratamento microbiano pode melhorar o rendimento em etanol, já que minimiza a formação de substâncias tóxicas.

2.6 Microrganismos fermentadores de pentoses

Para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, o microrganismo ideal deve ser capaz de metabolizar tanto pentoses quanto hexoses

(Cheng *et al.*, 2008). A levedura *S. cerevisiae*, mais utilizada na fermentação alcoólica, é capaz de fermentar apenas hexoses em etanol, já que ela não expressa as enzimas da via das pentoses. Sua incapacidade de fermentar xilose pode ser revertida através do uso de xilose isomerase exógena ou por transformação gênica (Walker, 1998).

Dentre as principais espécies descritas como fermentadoras de xilose estão: *Kluyveromyces marxianus* (Margaritis & Bajpai, 1982), *Candida guilliermondii* (Arruda & Felipe, 2009), *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces naardenensis*, *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polymorpha* e *Schizosaccharomyces pombe* (Walker, 1998). As espécies de leveduras reconhecidas com potencial para fermentar xilose a etanol são *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*, sendo que a primeira configura-se como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que é capaz de converter xilose e quase todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos a etanol, com fatores de conversão de 0,30 – 0,44 g.g⁻¹ de substrato (Stambuck *et al.*, 2008).

Segundo Van Vleet & Jeffries (2009), a levedura *S. stipitis* apresenta um conjunto de características fisiológicas que a torna muito interessante para a bioconversão em etanol, apresenta capacidade para fermentar xilose e, também, é capaz de fermentar hexoses. Um problema para o emprego de *S. stipitis* é a existência de repressão catabólica, que ocorre em meio de cultivo contendo glicose e xilose e também a baixa resistência desta levedura a altas concentrações de etanol. Killan & Van Uden (1988) realizaram um estudo com *S. stipitis* IGC e demonstraram o efeito inibitório da glicose no transporte da xilose. A presença de glicose no meio de cultivo inibiu a capacidade de metabolizar xilose eficientemente. Conforme estudo realizado por Bicho *et al.* (1988) com *S. stipitis* NRRL Y7124, a presença de glicose reprimiu as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. *P. tannophilus*, também é uma levedura muito

estudada na fermentação de pentoses, mas também apresenta repressão catabólica, assim como ocorre com a levedura *S. stipitis* (Maleszka & Scheneider, 1982).

Gong *et al.* (1983), com o intuito de estudar a habilidade de linhagens em fermentar xilose, testaram vinte espécies de *Candida*, 21 linhagens de *Saccharomyces* e oito linhagens de *Schizosaccharomyces*. A maior produção de etanol foi obtida com as linhagens de *Candida* e a menor produção com as linhagens de *Schizosaccharomyces*.

Outra levedura que tem se destacado na produção de etanol 2G é a linhagem *Spathaspora arborariae*. Hickert *et al.* (2013a) investigaram a produção de etanol por cocultura entre *S. cerevisiae* ICV D254 e *S. arborariae* NRRL Y-48658 em meio hidrolisado de casca de arroz em processo de fermentação e sacarificação simultâneas e obtiveram uma produção de 0,50 g.g⁻¹ de etanol, resultados próximos à conversão teórica.

Boeira (2013) avaliou a produção de etanol por linhagens de *S. arborariae* em biorreatores de cultivo submerso empregando meio sintético e hidrolisado de casca de arroz em condições anaeróbias e microaerófilas. O autor observou que uma cepa produziu etanol em meio sintético (0,22 g.L⁻¹.h⁻¹) e não apresentou produção no meio hidrolisado, devido à presença de compostos inibitórios.

Da Cunha Pereira *et al.* (2011) investigaram a produção de etanol em hidrolisado de casca de arroz, em monocultura de *S. arborariae* e em cocultivo com *S. cerevisiae*. Observaram que *S. arborariae* foi capaz de metabolizar xilose e glicose presentes no hidrolisado, com rendimento de etanol de 0,45 g.g⁻¹. Já no cocultivo, o rendimento foi de 0,62 g.g⁻¹. Os autores também estudaram a adição de compostos tóxicos (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) ao meio sintético e observaram que sua presença produziu efeitos negativos sobre a formação de biomassa e a produtividade de etanol.

Os microrganismos capazes de metabolizar pentoses podem ser aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos. Os aeróbios necessitam de oxigênio para o seu crescimento e realização das reações bioquímicas; os anaeróbios crescem na ausência de oxigênio e os facultativos crescem em presença ou ausência de oxigênio. Em cultivos em que não há suprimento de ar, os microrganismos utilizam inicialmente o oxigênio dissolvido no meio de cultivo, resultando em uma condição que pode ser considerada como de microaerofilia (Zayed *et al.*, 1996; Zaldivar *et al.*, 2001; Jeffries *et al.*, 2007). A Tabela 2 apresenta algumas características dos microrganismos fermentadores de pentoses quanto ao metabolismo em diferentes condições de oxigenação, pH, açúcares e inibidores.

Tabela 2. Principais vantagens e desvantagens de microrganismos fermentadores de pentoses (adaptado de Lymayem *et al.*, 2012).

Microrganismo	Característica	Vantagem	Desvantagem	Autor
<i>Candida shehatae</i>	Levedura microaerofílica	- Fermenta xilose	- Baixa tolerância a etanol - Baixa tolerância a inibidores - Baixo rendimento em etanol	Zaldivar <i>et al.</i> (2001)
<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i>	Levedura anaeróbia facultativa	- Fermenta xilose - Fermenta ambos os açúcares (glicose e xilose) - Alto rendimento de etanol (82%)	- Intolerante a concentrações de etanol acima de 40 g.L ⁻¹ - Baixa tolerância a inibidores - Não fermenta xilose em baixos valores de pH	Jeffries <i>et al.</i> (2007)
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Levedura aeróbia	- Fermenta xilose	- Baixo rendimento de etanol - Requer condições microaerofílicas para a fermentação - Não fermenta xilose em baixos valores de pH	Zayed <i>et al.</i> (1996)
<i>Spathaspora arborariae</i>	Levedura anaeróbia facultativa	- Fermenta ambos os açúcares (glicose e xilose)	- Baixa tolerância a inibidores - Não fermenta xilose em baixos valores de pH	Hickert <i>et al.</i> (2013a)

2.7 Rota de fermentação das pentoses

O catabolismo de pentoses em fungos e bactérias requer o uso de quatro cofatores, NADP /NADPH e NAD⁺/NADH (Verho *et al.*, 2003). Em leveduras, a xilose é transportada para o interior da célula (Figura 4), onde ocorrem duas reações de oxirredução. Inicialmente, a xilose é reduzida a xilitol, o qual é posteriormente oxidado a xilulose, que, por sua vez, é fosforilada para xilulose 5-fosfato, envolvendo o consumo de ATP (Aguiar *et al.*, 2002). A conversão da xilose a xilitol é catalisada pela enzima xilose redutase (XR), que é a primeira enzima desta via metabólica, sendo esta reação dependente de coenzimas reduzidas NADH ou NADPH (Jeffries, 1983; Weeb & Lee, 1990). O xilitol formado pode, então, ser liberado no meio ou ser oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, com a participação da coenzima NAD⁺ (Slininger *et al.*, 1987). A xilulose produzida é fosforilada pela xilulose quinase, formando xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das pentoses-fosfato (Weeb & Lee, 1990). Já em bactérias a xilose é levada a xilulose pela ação da enzima xilose isomerase (XI) (Figura 4), e as demais etapas são iguais a via oxidativa de leveduras e fungos.

Os metabólitos frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, gerados na via das pentoses-fosfato, são também componentes da via glicolítica. Em leveduras produtoras de etanol, estão acoplados com a oxidação do NADH, após a descarboxilação do piruvato, gerando aldeído acético que, ao oxidar o NADH, resulta em etanol.

O metabolismo anaeróbio, além da formação de etanol e CO₂, leva também à formação de outros compostos, tais como glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol. Além disso, ocorre, ao mesmo tempo, o crescimento das leveduras. Calcula-se que 5% do açúcar metabolizado pelo microrganismo seja desviado para formação de metabólitos

secundários da fermentação, resultando num rendimento de 95% em etanol. Contudo, em condições industriais, nas quais fatores químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos e inibidores), físicos (temperatura e pressão osmótica) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração do microrganismo e contaminação bacteriana) afetam a levedura, são obtidos rendimentos de 90% (Gutierrez *et al.*, 1991; Alvez, 1994; Deesuth *et al.*, 2016).

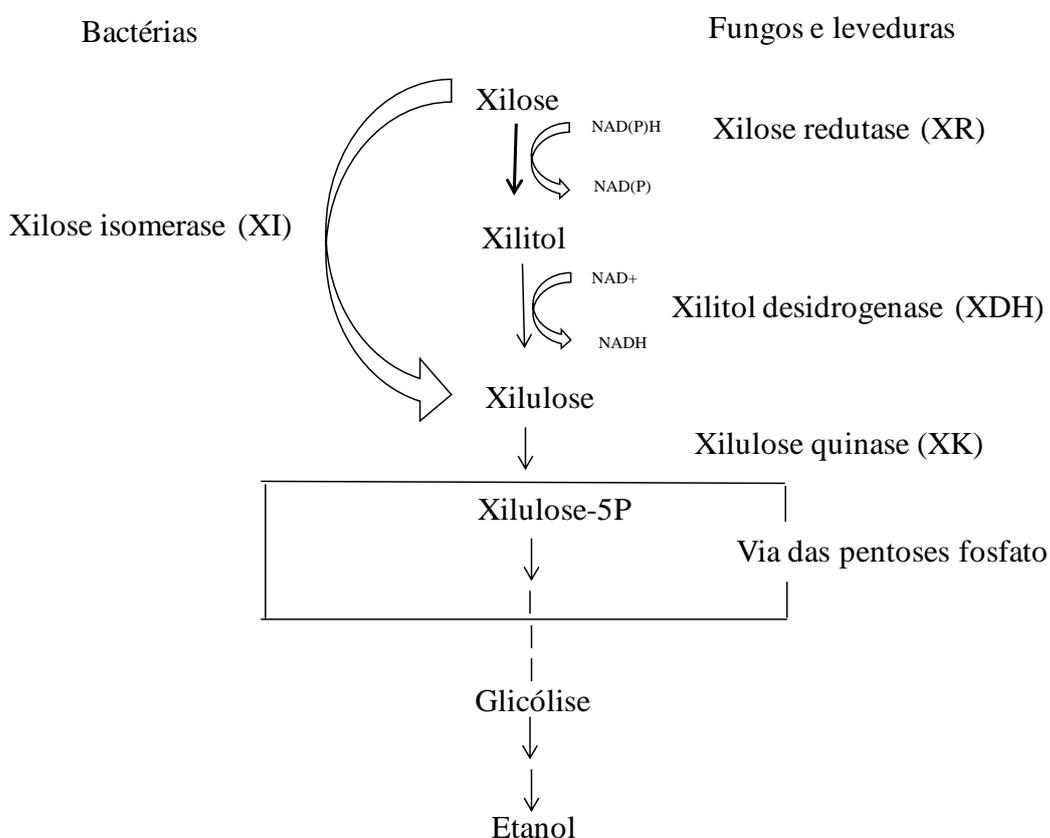


Figura 4- Vias metabólicas de assimilação de xilose – Xilose isomerase (XI) - em bactérias; Xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) - em fungos e leveduras. Ambas as vias requerem a superexpressão da Xilulose quinase (XK). (Adaptado de Kim *et al.*, 2013).

2.8 Cofermentação de leveduras para a produção de etanol

Para que o processo de produção de etanol 2G se torne economicamente viável, é necessário converter todos os açúcares provenientes da hidrólise da biomassa lignocelulósica. No entanto, o microrganismo que mais tem sido usado para fermentação, a levedura *S. cerevisiae*, não fermenta pentoses, apenas hexoses. Uma alternativa é o uso de cocultura. Por isso, no momento em que se escolhe trabalhar com cocultivo, o primeiro passo é escolher um microrganismo para fermentar glicose e outro para fermentar xilose e, em seguida, avaliar sua compatibilidade e o seu comportamento na cofermentação (Chen, 2011).

Alguns trabalhos relatam um aumento de produção de etanol quando os dois microrganismos são utilizados (Da Cunha-Pereira *et al.*, 2011; Hickert *et al.*, 2013a e 2013b; Karagöz & Özkan, 2014; Ndaba *et al.*, 2014). No entanto, existem alguns fatores que limitam o uso de coculturas, um deles é o pH ideal para as duas linhagens e o outro é encontrar um microrganismo resistente à presença de inibidores (Huang *et al.*, 2009).

Grootjen *et al.* (1991) relataram que, enquanto a fermentação de glicose numa mistura de açúcares contendo tanto pentoses quanto hexoses ocorre eficientemente, a fermentação de xilose é mais lenta. Tal fato pode ser explicado pelo fenômeno de repressão catabólica que ocorre na levedura que fermenta xilose, ocasionado pela presença de glicose, ocorrendo inibição da transcrição de diversos genes para o metabolismo de xilose (Fromanger *et al.*, 2010).

Hickert *et al.* (2013a) avaliaram a produção de etanol em hidrolisado de casca de arroz por *S. cerevisiae* ICV D254 em cocultura com *S. arborariae* NRRL Y-48658 e obtiveram um rendimento de 0,45 g.g⁻¹ com a monocultura de *S. arborariae* NRRL Y-48658 e 0,48 g.g⁻¹ com a cocultura em condições limitadas de oxigênio. Já os autores Fu *et al.* (2009) relataram o uso de *Zymomonas mobilis* imobilizada e células livres de *S.*

stipitis em meio sintético composto por glicose e xilose e obtiveram um rendimento de 0,49 - 0,50 g.g⁻¹; rendimento semelhante foi obtido em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com De Bari *et al.* (2013), a levedura *S. stipitis* é um dos microrganismos mais promissores para ser usado em cocultura com *S. cerevisiae*, pois ela não exerce nenhum efeito inibitório sobre a outra linhagem e também apresenta parâmetros de pH e temperatura semelhantes aos de *S. cerevisiae*. Em estudo realizado pelos autores em 2013, usando cocultura entre *S. stipitis* e *S. cerevisiae* eles obtiveram um rendimento de 0,45 g.g⁻¹ de etanol quando utilizaram uma quantidade inicial de açúcar de 40 g.L⁻¹. Os autores também usaram quantidades iniciais de açúcares de 50 e 60 g.L⁻¹, no entanto, os resultados de rendimento de etanol foram inferiores aos obtidos com 40 g.L⁻¹. O resultado pode ser explicado pelo estresse osmótico causado pelo aumento da concentração de açúcar, onde verificaram uma maior produção de glicerol que ocorreu provavelmente devido a danos causados na membrana celular.

Ndaba *et al.* (2014) investigaram a produção de etanol pelo cocultivo de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* em meio hidrolisado de bagaço de sorgo pré-tratado com ácido sulfúrico (os autores não informaram a concentração) e radiação microondas, utilizando diferentes estratégias de inóculo, e observaram um rendimento de 0,50 g.g⁻¹. Da Cunha Pereira *et al.* (2011) avaliaram a produção de etanol pelo cocultivo de *S. cerevisiae* e *S. arborariae* em hidrolisado de casca de arroz pré-tratado por hidrólise ácida diluída em autoclave, usando ácido sulfúrico 1% (v/v) e obtiveram um rendimento de etanol de 0,62 g.g⁻¹. Estes resultados disponíveis na literatura indicam que a realização de cocultivos são promissores para produção de etanol utilizando tanto de hexoses como de pentoses.

2.9 Melhoramento de linhagens produtoras de etanol a partir de pentoses

A engenharia genética tem sido usada com o objetivo de introduzir ou aumentar a eficiência de uma nova via metabólica ou para a obtenção de um produto de interesse. Os alvos das alterações genéticas são geralmente genes estruturais ou mesmo genes regulatórios envolvidos na expressão gênica do produto desejado (Ingrand & Dora, 1995).

Na literatura, alguns autores reportam o uso de microrganismos geneticamente modificados para a produção de etanol usando como fonte de carbono a xilose. Uma linhagem de *Z. mobilis* foi metabolicamente modificada para fermentar glicose e xilose, ampliando a produção de etanol (Ingrand & Dora, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Sun & Cheng, 2002).

S. cerevisiae foi geneticamente modificada com a introdução dos genes da xilose redutase e de xilitol desidrogenase para desenvolver a capacidade de fermentar xilose e cofermentar xilose e glicose. O estudo evidenciou que *S. cerevisiae* modificada fermentou eficientemente a xilose e, no meio contendo xilose e glicose, fermentou os dois açúcares (Ho *et al.*, 1998).

Olofsson *et al.*, (2011) usaram *S. cerevisiae* modificada com a introdução do gene xilose redutase mutado (mXR) e um gene de uma proteína facilitadora (Gxf1). Estudos foram realizados com as linhagens recombinantes contendo os dois genes, linhagens recombinantes contendo apenas um dos genes e linhagens nativas. Os resultados mostraram que a linhagem recombinante contendo os dois genes produziu etanol numa relação $0,39 \text{ g.g}^{-1}$ de xilose, já a linhagem nativa produziu $0,33 \text{ g.g}^{-1}$.

De Sales *et al.* (2015) utilizaram linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes contendo genes transportadores de açúcares de *S. stipitis*, com ausência dos principais genes transportadores de hexoses (*hxt1Δ-hxt7Δ* e *gal2Δ*) e com altas atividades das

enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase. Os autores observaram que a linhagem recombinante contendo o transportador *xut1* produziu etanol usando como fontes de carbono xilose ou xilose e glicose; enquanto que a linhagem contendo o gene *hxt2.6* produziu etanol e xilitol e a linhagem expressando o gene *qup2* produziu, principalmente, xilitol.

Em estudos mais recentes, Li *et al.* (2016) usaram duas cepas de *S. cerevisiae*: em uma das cepas introduziram o gene para expressar xilose isomerase (XI), já na outra cepa introduziram os genes para expressão da xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Os autores realizaram cultivo com as cepas e verificaram que a levedura que continha o gene para expressar XI apresentou rendimento de etanol de 0,38 g.g⁻¹. Já a linhagem que continha os genes para expressar XR e XDH apresentou um rendimento de etanol de 0,45 g.g⁻¹. Os autores utilizaram meio sintético contendo misturas de glicose e xilose.

Outra estratégia empregada com frequência nos últimos anos é a engenharia evolutiva, uma estratégia de seleção de microrganismos baseada no princípio da seleção natural, desde que seja possível se impor uma pressão seletiva adequada em laboratório, torna-se viável “forçar” um fenótipo desejado ao microrganismo em estudo. O fenótipo desejado, neste caso, pode ser, por exemplo, uma maior tolerância a fatores como oxigênio ou altas concentrações de glicose ou, ainda, xilose. Assim, a pressão seletiva é imposta através da variação das concentrações de oxigênio, glicose ou xilose (Alexandrino, 2012). A obtenção de linhagens evoluídas em laboratório é uma estratégia comprovadamente eficiente para diversas finalidades. A lógica da seleção é que uma população de microrganismos, que contém milhões de células num mililitro, os quais se duplicam num intervalo de poucas horas, após várias gerações, acabam sofrendo mutações e, dentro de um ambiente que confira pressão seletiva, passará

também por seleção através das células com melhores condições de desenvolvimento neste ambiente (Alexandrino, 2012).

Um exemplo de um processo de seleção é a metabolização de xilose e arabinose em anaerobiose utilizando tanto bateladas repetidas como quimiostatos (Sonderegger & Saur, 2003; Kuyper *et al.*, 2004, 2005a, 2005b; Wisslink *et al.*, 2007, 2009). Outro exemplo é o aumento da tolerância ao etanol (Brow & Oliver, 1982). As ferramentas usadas para a seleção do microrganismo dependem do objetivo do estudo.

Diante dos assuntos abordados na revisão bibliográfica, verifica-se que ainda existem muitos gargalos na produção de etanol 2G, principalmente, em relação ao microrganismo usado para fermentação de xilose presente nos materiais hidrolisados, mas também existem muitos esforços de pesquisadores para o desenvolvimento de novas técnicas, tanto no que se refere ao pré-tratamento do material lignocelulósico, quanto ao melhoramento de linhagens para uso industrial. Isto tem contribuído para o aumento da produção de etanol 2G e para a instalação de plantas piloto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os artigos constituintes desse capítulo estão apresentados como Artigos I, II, III e IV, respectivamente. Em cada um, é apresentada uma introdução ao assunto abordado, materiais e métodos detalhados, resultados, discussão e referências bibliográficas.

Artigo I

Este artigo consiste no *screening* de treze linhagens de leveduras com capacidade para a fermentação de xilose e glicose. A levedura *Spathaspora hagerdaliae* (UFMG-CM-Y303) apresentou bons resultados na bioconversão de xilose a etanol. Foram realizados testes em meio sintético simulando o hidrolisado e estudos também foram realizados em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em biorreatores de 10 L com volume operacional de 5 L.

Ethanol production by *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303

Fernanda Roberta Rech^a, Roselei Claudete Fontana^a, Carlos A. Rosa^b, Marli Camassola^a, Marco Antônio Záchia Ayub^c, Aldo J. P. Dillon^a

^a Enzymes and Biomass Laboratory, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.
Phone/Fax: +55 54 3218 2149

^b Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

^c Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author

ajpdillo@ucs.br

Abstract

In this study, thirteen strains of yeasts recently isolated from natural environments were evaluated in relation to their ability to produce ethanol and xylitol. Among them, one strain of *Spathaspora hagerdaliae* (UFMG-CM-Y303) showed good bioconversion of xylose. This strain was cultured in bioreactors using working volume of 5 L under aerobic and microaerophilic conditions in medium containing glucose and xylose as carbon sources, producing yields of ethanol ($Y_{P/S}$) of 0.25 and 0.39 g g⁻¹, respectively. When the pH was controlled, the strain produced $Y_{P/S} = 0.31$ g g⁻¹ in microaerophilic. The same conditions were tested using hydrolysate sugarcane bagasse, which contained 15.5 g of glucose and 3 g L⁻¹ of xylose, producing $Y_{P/S} = 0.47$ g g⁻¹, very close to the

theoretical yields for glucose conversion into ethanol. These results indicate to the possible application of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 for the fermentation of lignocellulose hydrolysates for the production of second-generation ethanol.

Keywords: bioconversion, lignocellulosic biomass, second-generation ethanol.

1. Introduction

Second-generation ethanol is a promising alternative to fossil fuels, being a source of clean and renewable energy (Young et al., 2010). The lignocellulosic materials from agricultural wastes, and industrial wood residues, represent the greatest amount of globally biomass (Kumar et al., 2008), and is considered an important source of raw material for the production of ethanol, since these sources are renewable, are available in large quantities, show low prices, and represent environmental benefits from use instead of recycling (Bothast et al., 1999; Talebnia et al., 2010; Chen, 2012; Wang et al., 2014).

For second-generation ethanol production become economically viable, an effective conversion of all sugars present in lignocellulosic materials is required. Since the largest components of lignocellulose are cellulose and hemicellulose, their respective monomers glucose and xylose are the main sugars released as hydrolysates. These sugars can be fermented to ethanol by microorganisms possessing specific metabolic routes. However, this approach remains a challenge in the use of biotechnological lignocellulosic biomass, because there are no known microorganisms that can efficiently convert glucose simultaneously with xylose, except when genetically modified (Hou, 2012). The microbial metabolism in the presence of glucose interferes

with the genetic controls leading to the repression of the production of enzymes responsible for the transportation of xylose (Chen, 2012).

Saccharomyces cerevisiae is the most commonly used yeast for alcoholic fermentation because it presents high capacity to ferment glucose. Unfortunately, this yeast does not convert xylose to ethanol (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Hande et al., 2013), adversely affecting the production of ethanol from lignocellulosic hydrolysates, in yield terms (Gong et al., 1983).

One important scientific approach has been the search for new yeast strains capable of metabolising both C-6 and C-5 sugars. For example, strains of *Schizosaccharomyces pombe*, *Scheffersomyces stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Spathaspora arborariae* and *S. passalidarum*, have been reported as strains capable to ferment xylose into ethanol (Hou, 2012; Long et al., 2012; Hickert et al., 2013a 2013b).

Several strategies of metabolic engineering have been adopted for the fermentation of xylose (Kuyper et al., 2005; Van Maris et al., 2006; Ha et al., 2010; Zhou et al., 2012), but the recombinant strains suffer repression of the catabolic reaction in medium containing glucose (Hou, 2012). Another strategy used to obtain microorganisms able to ferment sugars into second-generation ethanol has been the use of induced selection for the ability to ferment C-6 and C-5 sugars (Toivola et al., 1984; Lu et al., 2013).

In this context, the main objective of this work was to evaluate the metabolic capacity of thirteen yeast strains, recently isolated from natural environments, for the production of ethanol or xylitol from xylose and glucose, comparing their abilities to control strains of *S. stipitis* and one of *S. arborariae*, known to metabolise xylose. Initially, yeast cultures were run in synthetic medium containing 20 g of glucose and 20 of xylose, under aerobic or microaerophilic conditions. Further on the best strain and

culture conditions were tested for fermentation of hydrolysate sugarcane bagasse in bioreactors using working volume of 5 L, following the kinetics of sugars consumption, cellular growth, and the production of ethanol and xylitol.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms and cell maintenance

The yeast strains used in this study are described in Table 1. The cultures were grown in a medium containing the following, in g L^{-1} : yeast extract, 3; malt extract, 3; bacteriological peptone, 5; and glucose, 10. The cultures were maintained in glycerol (20%) and stored in a freezer at -80°C . This medium used for conservation and inoculums.

2.2 Culture media

For fermentation, YMPX medium was used. This medium was composed of g L^{-1} : yeast extract, 3; malt extract, 3; bacteriological peptone, 5; and xylose, 45. In the YMPG medium, the glucose concentration was 20 g L^{-1} , whereas YMPXG medium having 10 g L^{-1} of xylose and glucose, each. All media were sterilized at 121°C for 15 min.

Table 1. Yeast strains screened in this work for xylose metabolism

Strains	Source
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Y 698	Department of Agriculture (USA)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBMAI 0536	CBMAI- collection of microorganisms and Industry Environment (Brazil)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	CentraalbureauvoorSchimmel-Cultures (Amsterdam, The Netherlands)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086	Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> CCT 2653	Tropical Culture Collection of André Tosello Foundation (Campinas, Brazil)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFMG-HB63-b	Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais
<i>Scheffersomyces stipitis</i> UFMG-43-2	Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais
<i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM19-19	Collection of Microorganisms and cells of the Federal University of Minas Gerais
<i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG- CM-Y303	Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UFMG-R-428	Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UFMG-CM-Y1263	Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> -1 ATM	Laboratory of Applied Microbiology (UCS- Brazil)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> -2 ITF	Laboratory of Applied Microbiology (UCS- Brazil)
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> BTI-1	Laboratory of Applied Microbiology (UCS- Brazil)
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> BO-1	Laboratory of Applied Microbiology (UCS- Brazil)

2.3 Conditions for fermentation and the selection of strains for ethanol

The selection of yeasts with the ability to metabolise xylose was performed in a shaker with reciprocal agitation in 250 mL–conical flasks containing 25 mL of YMPX medium. The pre-inoculum was prepared in 500 mL Erlenmeyer, containing 100 mL volume of medium, using the same medium for the growth of yeast cultures, after incubation for 48 h, until the stationary phase was reached. The cells were recovered by centrifugation and the pellet was washed twice with sterile water and resuspended in sterilized water. The culture was proceeded with inoculation of 3×10^8 cells mL⁻¹ in 25 mL of YMPX medium, at 28°C for 72 h in a shaker with reciprocal agitation of 180 rpm. The aerobic culture flasks were closed with a cotton-gauze plug; for cultivation under anaerobic conditions, the flasks were closed with a rubber plug containing a hypodermic needle for the output of carbon dioxide. With the purpose of obtaining initial anoxic conditions, vials were submitted to the aspersion of gas nitrogen for 10 min before addition of the inoculum.

2.4 Cultivation of *Spathaspora hagerdaliae* strains under aerobiosis and microaerophilic conditions

The aerobic and microaerophilic cultivations were performed with the selected strains in synthetic YMPX, YMPG, and YMPXG medium. The consumption of sugar, ethanol production and xylitol was investigated. The experiment was carried out in 50 mL Duran flasks, containing 20 mL of medium, maintained at 28°C with stirring at 180 rpm, inoculated with 1×10^7 cells mL⁻¹. Samples were obtained in the times: 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 and 48 h. To each sample, all contents of flasks were used for the analyses and analytical growth measurements. The flasks maintained under aerobic conditions were closed with a cotton-gauze plug, while the cultures incubated in

microaerophilic conditions were closed with the own flask cover. All experiments were performed in duplicate, and were destructive tests. A volume of 10 mL of sample was centrifuged for 10 minutes at 2504 *g* and 4°C. The supernatant was used for the sugar and ethanol determinations. For biomass data, the pellet was washed twice with distilled water and was then dried at 105°C until a constant weight was achieved.

2.5 Experimental design to optimisation of the production of ethanol by *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in relation to inoculum and pH

A full 2² factorial design with three encoded levels totalling eleven experiments was performed to optimise the production of ethanol, as a function of the quantity of inoculum and pH. For the statistical calculations, the variables were coded according to Eq. (1):

$$xi = (Xi - Xo) / \Delta Xi$$

Where xi is the value of the independent variable, Xi is the real value of the independent variable, Xo is the real value of the independent variable in relation to the centre point and ΔXi is the step change value. The interval and levels of the variables investigated in this study are described in Table 2.

The quadratic model for prediction of the ideal point was expressed in accordance with Eq. (2):

$$Yc = \beta o + \sum \beta i xi + \sum \beta ij xi xj + \sum \beta ii xi^2$$

Where Yc is the response variable, βo is the constant, βi is the coefficient for the linear effects, βii is the coefficient for the effects quadratics, βij is the coefficient for the interaction of effect and $xi xj$ was coded levels of variables $Xi Xj$.

Table 2. Process variables and their levels used in central composite design of ethanol study

Trial no.	Coded variables		Uncoded variables		Ethanol (g L ⁻¹)
	X1	X2	X1	X2	
1	-1	-1	4	1x10 ⁸	2.0
2	-1	0	4	2x10 ⁸	3.5
3	-1	+1	4	3x10 ⁸	3.7
4	0	-1	5	1x10 ⁸	4.4
5	0	0	5	2x10 ⁸	4.5
6	0	0	5	2x10 ⁸	4.9
7	0	0	5	2x10 ⁸	4.8
8	0	+1	5	3x10 ⁸	5.6
9	+1	-1	6	1x10 ⁸	1.6
10	+1	0	6	2x10 ⁸	2.3
11	+1	+1	6	3x10 ⁸	2.8

2.6 Cultivation in bioreactors

The fermentations were carried out in duplicate, in a 10 L capacity (*New Brunswick*[®]-USA) containing 5 L of medium. Here, 500 mL volumes were used for inoculums in the bioreactors containing 4.5 L of medium YPMGX. Cultivation in the bioreactor was conducted under microaerophilic conditions, with stirring at 200 rpm, at a temperature of 28°C and with the pH controlled at 5 with solutions of 1 mol L⁻¹ of NaOH and 1 mol L⁻¹ of HCl. Experiments with an initial pH 5 and without control were also conducted during cultivation.

The test was monitored with 5 mL of samples at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours. The collected samples were stored in a freezer (-80°C) for analytic determinations. There was no analysis of biomass, because the amount of the initial inoculum was the amount of cells present in the stationary phase.

Enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse pre-treated by steam explosion, above 200°C for 8 min, was performed. The bagasse concentration used was 30 g L⁻¹. The studies were initially performed in 250 mL Erlenmeyer flasks, with a total volume

of 100 mL, including the bagasse, the citrate buffer, the enzyme and the cell suspension. The studies were conducted by hydrolysis and simultaneous fermentation or by separate hydrolysis and fermentation. The condition found to be the most promising was reproduced in the 10 L bioreactor containing 5 L of medium.

2.7 Saccharification and separate fermentation (SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation)

The bagasse pre-treated by steam explosion was hydrolysed for a period of 72 h using the enzymatic complex Celluclast[®] 1.5, Novozymes[®] (15 FPU g⁻¹) in citrate buffer with a pH 4.8 and a temperature of 50°C. After this period, the temperature and pH were adjusted to 28°C and pH 4, respectively, and the medium was supplemented with 0.1% ammonium sulphate and 0.4% crude yeast extract. The quantity of inoculated yeast was 3×10^8 cells mL⁻¹.

2.8 Analytical methods

The xylose, glucose, ethanol and xylitol were analysed by HPLC (Shimadzu, Japan), using the refractive index detector equipped with a column Aminex HPX-87 H (Bio-Rad Laboratories Ltd, USA). The conditions of the reaction were: temperature of 55°C; flow of 0.6 mL min⁻¹ and 5 mmol L⁻¹ H₂SO₄ as a mobile phase.

2.9 Calculation of kinetic parameters

The yields of ethanol $Y_{P/S}$ were defined as the ratio between the quantity of ethanol produced and total sugars consumed until the emergence of the production of xylitol or ethanol. For yields in relation to xylitol ($Y_{P/S}$ g g⁻¹), the ratio between the xylitol produced and the xylose consumed was calculated.

3. Results and Discussion

3.1 Selection of yeast producing ethanol and xylitol

Thirteen strains of yeast and two strains controls were evaluated in relation to the ability to produce ethanol and xylitol from xylose. The tests were conducted in both anaerobic and aerobic conditions. Table 3 shows the results obtained in the cultures performed in the absence of oxygen. Under these conditions, all thirteen isolates produced xylitol and only four produced ethanol, including the two control strains. The two strains that produced ethanol were *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 and *Kluyveromyces marxianus* UFMG-HB63-B. In Table 4, the data from fermentation under aerobic conditions are presented.

Table 3. Conversion of D- xylose into xylitol and ethanol by yeasts under anaerobic conditions at 72 h.

Strain	Xylose consumed (g)	Xylitol (g L ⁻¹)	Xylitol (Y _{P/S} g g ⁻¹)	Ethanol (g L ⁻¹)	Ethanol (Y _{P/S} g g ⁻¹)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBMAI 0536	4.2±0.03	0.26± 0.02	0.06± 0.02	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UFMG-CM-Y 1263	8.1±0.01	0.38 ± 0.10	0.05± 0.09	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> CCT 2653	9.2±0.03	0.32 ± 0.01	0.03± 0.03	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	17±0.05	0.37 ± 0.00	0.02± 0.05	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Y 698	8.3±0.00	0.15 ± 0.00	0.01± 0.00	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086	18.1±0.15	1.71 ±0.07	0.09± 0.11	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> R 428	11.5±0.28	0.80 ±0.18	0.06± 0.02	0	0
<i>Sacharomycopsis crataegensis</i> BO-1	10.4±0.30	1.01±0.12	0.1± 0.03	0	0
<i>Sacharomycopsis crataegensis</i> BTI-1	10±0.85	2.85 ±0.63	0.28± 0.7	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ITF -2	13±0.00	2.72± 0.07	0.2± 0.07	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATM -1	22.6±0.00	3.50 ±0.35	0.15± 0.35	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFMG-HB63-b	41.2±0.03	9.6± 0.00	0.23± 0.03	1.4± 0.00	0.03± 0.03
<i>Scheffersomyces stipitis</i> UFMG-43-2	45±0.00	0	0	8.2 ±0.63	0.18 ±0.63
<i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM19-1	44.2±0.01	0	0	8.1±0.11	0.19±0.09
<i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG-CM-Y 303	42.0 ± 0.1	3.25± 0.05	0.07± 0.01	6.2 ± 0.4	0.15 ± 0.03

Table 4. Conversion of D-xylose into xylitol and ethanol by yeasts under aerobic conditions at 72 h.

Strain	Xylose consumed(g)	Xylitol (g L ⁻¹)	Xylitol (Y _{P/S} g g ⁻¹)	Ethanol (g L ⁻¹)	Ethanol (g g ⁻¹)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBMAI 0536	3.6±0.01	0.20±0.00	0.05± 0.01	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> UFMG-Y 1263	6±0.10	0.43±0.02	0.07± 0.08	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> CCT 2653	2.5±0.05	0	0	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS 6556	9.1±0.00	0.24±0.00	0.02± 0.05	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Y 698	6.8±0.00	0.41±0.02	0.06± 0.02	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086	12±2.20	0.36±0.00	0.03± 1.3	0	0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> R 428	15±0.00	1.70±0.00	0.11± 0.00	0	0
<i>Sacharomycopsis crataegensis</i> BO-1	9.3±0.09	0.11±0.00	0.01± 0.09	0	0
<i>Sacharomycopsis crataegensis</i> BTI-1	25±0.00	0	0	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> -2 ITF	45±0.00	0	0	0	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> -1 ATM	45±0.00	0	0	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFMG-HB63-b	45±0.00	0.50±0.00	0.01±0.00	0	0
<i>Scheffersomyces stipitis</i> UFMG-43-2	45±0.00	0	0	0	0
<i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM19-1	37.5±0.01	0	0	0	0
<i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG- CM-Y303	45 ± 0.00	0.3 ± 0.00	0.006 ± 0.00	2.75± 0.00	0.06± 0.02

Under anaerobic conditions, of the thirteen strains evaluated, nine produced xylitol and only the yeast *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 produced ethanol. *K. marxianus* UFMG-HB63-b showed a high yield of xylitol ($Y_{P/S}$, 0.23 g g⁻¹), while the *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 showed a yield of ethanol ($Y_{P/S}$) of 0.15 g g⁻¹, similar to the results obtained for the control strains. Wilkins et al. (2008) also verified strain IMB4 of *K. marxianus* to have the highest yield of ethanol ($Y_{P/S}$ 0.1 g g⁻¹) in relation to other strains studied. Already for xylitol production, the strains IMB 2 and IMB 5 of *K. marxianus* presented the highest yield, 0.28 g g⁻¹ and 0.21 g g⁻¹, respectively.

Data reported in the literature (Gong et al., 1983) showed that some *S. pombe* ferment xylose; however, the strains of *S. pombe* tested in this work did not produce ethanol. One interesting fact was that verified for strain *Saccharomycopsis crataegensis* BTI-1, which produced xylitol under anaerobic conditions, with $Y_{P/S}$ of 0.28 g g⁻¹, but under aerobic conditions produced neither ethanol nor xylitol. Lu et al. (2013) evaluated 120 yeast strains isolated from the soil and verified that only six strains were able to convert xylose to ethanol. These yeasts were identified as being mainly of the genera *Candida* and *Scheffersomyces* and presented a high consumption of xylose (98.8%) and high yield of ethanol (0.46 g g⁻¹).

The data shown in Table 4, under aerobic conditions, did not show ethanol or xylitol production. Probably, the xylose was used without NADPH oxidation by an organic carbon source, with the use of mitochondrial system. Silva et al. (2012) investigated the supplementation of medium with the same nutrients to maximise the conversion of xylose to ethanol by *Pichia (Scheffersomyces) stipitis*. The authors also studied the transfer conditions of oxygen and observed that there was no production of ethanol when the medium was not supplemented with nutrients (urea, yeast extract and

MgSO₄). In the absence of these components, the cells used the carbon sources available only for growth.

Hande et al. (2013) evaluated the production of ethanol by *Meyerozyma caribbica*, in batch fermentation, referring the conversion of 30 g L⁻¹ of xylose in ethanol, with a yield of 0.5 g g⁻¹. Hou (2012) found that *Spathaspora passalidarum* showed the high production of ethanol under anaerobic conditions, with fast cell growth and rapid consumption of sugars, while glucose was consumed before xylose. The higher production of xylitol was verified to *K. marxianus* UFMG-43-2, (9.6 g L⁻¹); under anaerobic conditions, it also showed ethanol production.

Through the optimisation of cultivation parameters, the production of ethanol and xylitol can be increased (Chen, 2011). Hongzhi et al. (2011) optimised the culture medium of *Candida tropicalis* HDY-02, through the use of statistical planning to determine the ideal conditions for the production of xylitol. The authors obtained a production of 58 g L⁻¹ and yield of 0.73 g g⁻¹ in fed batch processes. According to studies found in the literature, the yields for the production of ethanol and xylitol depend on the strain and cultivation conditions (Hahn-Hägerdal et al., 1986; Barbosa et al., 1988; Furlan et al., 1993; Mueller et al., 2011).

Studies described in the literature demonstrate the need to optimise and control some parameters of cultivation, such as air flow to increase the rate of absorption of xylose, controlling the production of biomass, reducing the production of xylitol and increasing the production of ethanol. The fermentation of xylose is greatly affected by the limitation of oxygen, probably due to the role of oxygen which is the final acceptor of electrons, and is necessary for the redox balance partial in the two stages of the initial metabolism of xylose (du Preez, 1994).

3.2 *Spathaspora hagerdaliae* growth in different culture media

Before the results, it is possible to assert that the *S. hagerdaliae* presents potential for production of ethanol from glucose and xylose. In this way, it becomes necessary the evaluation of different conditions of cultivation in order to maximise the production of ethanol. The kinetic parameters were evaluated from *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in different media, YPMX, YPMG and YPMXG being employed under aerobic conditions and microaerophilic conditions. The data obtained in aerobic conditions are shown in Figure 1 and the microaerophilic data are in Figure 2. Data of the production and yield of ethanol are presented in Table 5. The yeast *S. hagerdaliae*, in aerobic conditions, produces virtually the same amount of biomass and ethanol, using xylose or glucose as a source of carbon; the same occurs for the cultivation in microaerophilic conditions, as observed for *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus* by Stambuck et al. (2003). However, in cultures performed with mixtures of glucose and xylose, the higher production of biomass and lower ethanol was observed in aerobic condition and a smaller production of biomass and higher ethanol in microaerophilic conditions. However, as for all other yeasts that ferment pentose, in the presence of glucose and xylose, this preferably consumes glucose (Cadete et al., 2009).

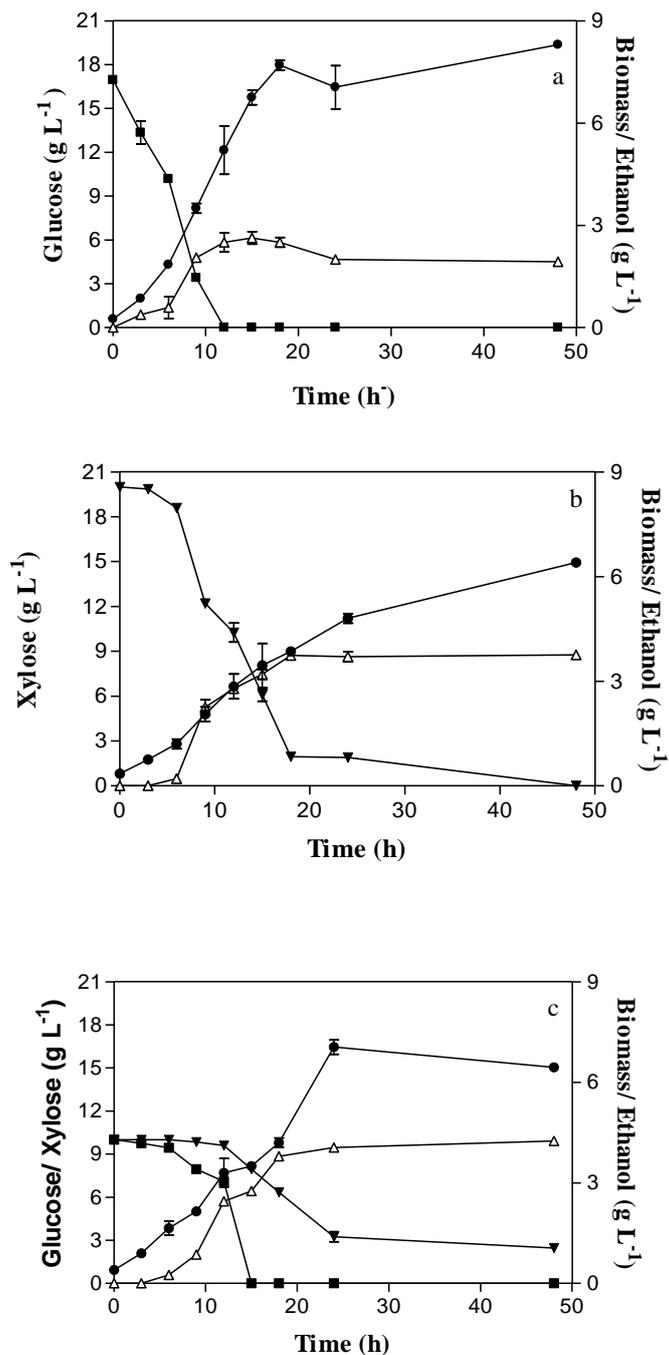


Figure 1. Biomass and ethanol production of *Spathaspora hagerdaliae* in flasks in aerobic conditions (a) medium with glucose; (b) medium with xylose; medium with xylose and glucose. Glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ) and biomass (●). Results in the mean of duplicates.

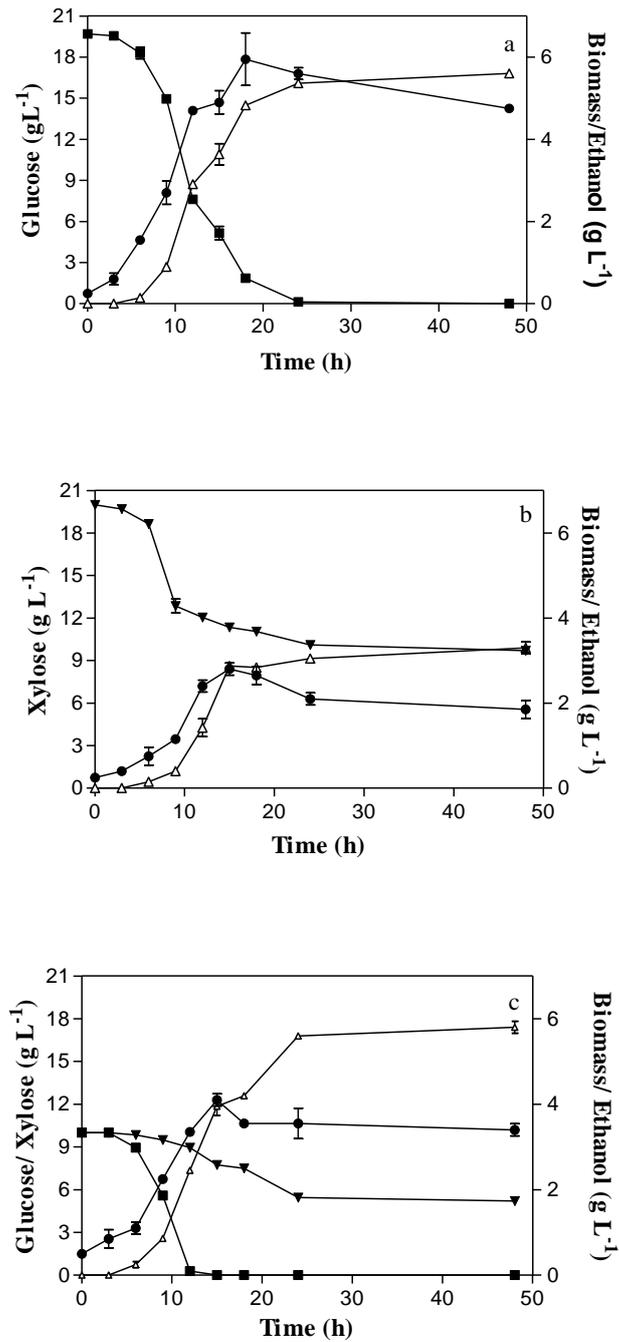


Figure 2. Biomass and ethanol production of *Spathaspora hagerdaliae* in flasks in microaerophilic conditions (a) medium with glucose; (b) medium with xylose; medium with xylose and glucose. Glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ) and biomass (●). Results are mean of duplicates.

Table 5. Ethanol concentration (g L^{-1}), yields ($Y_{P/S}$), and ethanol productivity (Q_P) of *Spathaspora hagerdaliae* under aerobic and microaerophilic conditions.

	Substrate	Concentration (g L^{-1})	$Y_{P/S}$ (g g^{-1})	Q_P ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Aerobic conditions	Xylose	3.75	0.18	0.31
	Glucose	2.65	0.15	0.14
	Xylose/glucose	4.25	0.25	0.23
Microaerophilic Conditions	Xylose	3.4	0.33	0.14
	Glucose	5.6	0.28	0.24
	Xylose/glucose	5.9	0.39	0.25

In aerobic conditions, both in the medium containing only glucose and in the medium containing glucose and xylose, glucose was completely exhausted in 12 h of cultivation. It is particularly interesting that, under these conditions, the two sugars were consumed concomitantly. Already in cultivation in microaerophilic conditions, in the medium containing glucose only, the substrate was totally consumed in 20 h of cultivation, and in the medium containing the two sugars, the consumption of glucose occurred in 12 h; however, the xylose was not fully exhausted and it was found that this was only consumed after glucose had been consumed. The glucose consumption in the first place can be explained by the existence of catabolic repression that occurs by inhibition of the transcription of several genes when microorganisms such as *S. cerevisiae* are cultivated in carbon sources with easily fermentable components such as glucose (Fromanger et al., 2010).

The higher production of ethanol was observed under microaerophilic conditions if compared with aerobic conditions, probably because the fermentation process under microaerophilic conditions that were used for growth and energy, as previously observed by Lima et al. (2001). *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 simultaneously

consumed glucose and xylose in already restricted oxygen conditions suggests that this yeast can possibly use different systems for the transport of xylose under aerobic conditions and strict oxygen conditions. There are two systems for the transport of xylose in yeasts, one of which occurs by facilitated diffusion and is driven by the sugar gradient, and the other via an active transport system utilising the driving force of protons (H^+) and sugar with ATP consumption (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Hou 2012). Hou (2012), in studies conducted with *S. passalidarum* observed similar behaviour in means consisting of glucose and xylose.

In synthetic medium, on microaerophilic conditions *S. hagerdaliae* produced 0.39 g g^{-1} of ethanol. These results are similar to other studies reported in the literature with yeasts which ferment pentose. Hou (2012) evaluated the production of ethanol in *S. passalidarum* on synthetic medium containing mixtures of glucose and xylose, under orbital shaker with stirring of 120 rpm and temperature of 32°C in anaerobic conditions and obtained a $Y_{P/S} = 0.45 \text{ g g}^{-1}$. The author also evaluated the production of ethanol by *S. stipitis* under the same conditions and obtained a $Y_{P/S} = 0.16 \text{ g g}^{-1}$. Cadete et al. (2009) evaluated the production of ethanol by *S. arborariae* in medium containing mixtures of glucose, in an orbital shaker with stirring of 160 rpm, at 28°C and observed a $Y_{P/S} = 0.50 \text{ g g}^{-1}$.

The study conducted with *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in aerobic and anaerobic conditions showed the efficient conversion of xylose to ethanol. It is important to emphasise that the quantity of inoculum used in this study was high (1×10^8 cells mL^{-1}) because the objective was not to evaluate growth, but the conversion of substrate in ethanol.

There is a need to optimise and control the flow of air during cultivation, because it influences the production of secondary compounds, and increases the consumption of xylose and also biomass production (Bullet et al., 2001; Agbogbo and Wenger, 2007; Agbogbo & Coward-Kelly, 2008).

3.3 Optimization of the amount of inoculum and pH

The quantity of inoculum and the pH are two very important parameters in the production of ethanol. The quantity of inoculum exerts an influence in the point of view of industrial fermentation, including biomass production, the duration of lag phase, specific growth rate and also the quality of the final product (Sen Swaminathan, 2004). Information about the variation of the initial quantity of inoculum has great importance for the fermentation process at an industrial level (Verbelen et al., 2009) since it is described in the literature that the ethanol concentration produced increases with the increased quantity of inoculum (Edelen et al., 1996; Verbelen et al., 2009).

The pH in a fermentation process can influence the control of bacterial contamination as in the consumption of the substrate (Hahn-Hägerdal et al., 2007). In this work, the effect of pH and quantity inoculums combined parameters was evaluated on ethanol production from pentose. The data showed a high significance of linear effects of pH and quantity of inoculum, with the quadratics effects of the quantity of inoculum indicating that these variables can act as limiting factors in the ethanol production process, even when small variations occur. The results also show that the quadratic effects of the pH were not significant. The reduced model of second order polynomial equation can be expressed as Eq 3.

$$Y_1 = 5,66 + 0,63x_1 + 0,71x_2 - 2,52x_2^2$$

Where Y_1 represents the value of concentration of ethanol as a function of pH (x_1) and quantity of inoculum (x_2).

ANOVA showed that the model was highly significant ($p < 0.000001$), with $R^2 = 0.9859$, indicating that 98% of the total variation can be explained by the model. This suggests a satisfactory representation of the process model and a good correlation between the experimental and predicted values.

The relationship between the process variables and the responses may be best understood by analysing the surface graph response in Figure 3, plotted based on the model of the equation that shows an interaction between the pH and quantity of inoculum.

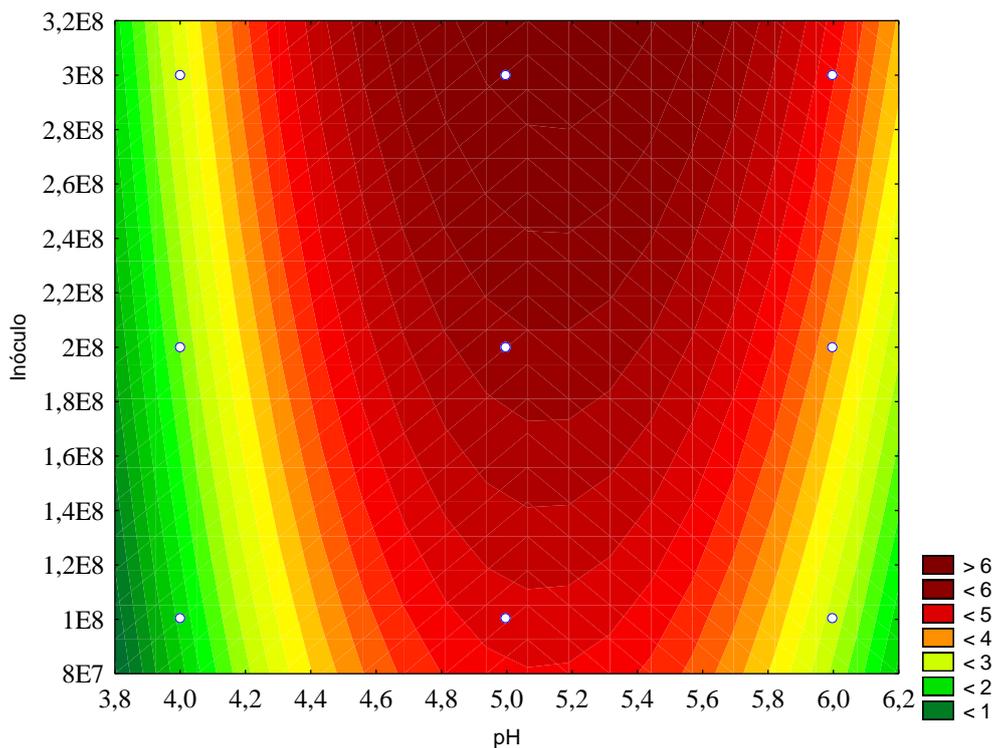


Figure 3. Contour plots of ethanol determination of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in different pH and inoculum size.

The optimal condition for ethanol production was pH 5.0 and 3.0×10^8 cells mL⁻¹ in twenty four hours of cultivation ($Y_{P/S} = 0.33$). As this condition was one of the points of planning, the model did not need to be validated. From the optimisation of some conditions of fermentation, cultivations with an increase in scale in the bioreactor were performed for complete mixing with a volume of 5 L.

3.3 Ethanol production of *Spathaspora hagerdaliae* in bioreactor using synthetic medium or hydrolysate sugar cane bagasse

The efficiency of a bioprocess is affected by the composition of the medium and the operational conditions used. The data obtained in the planning step were used in the bioreactor in two ways: in the first, the pH was maintained at 5.0 during the whole period of cultivation, and in the second, the initial pH was 5.0 and the rest of the cultivation was free pH. The best results were those submitted when the pH was kept constant.

The results of the consumption of substrate and the production of ethanol can be observed in Fig. 4. The glucose was completely consumed in both conditions, but the xylose was not exhausted in the medium. However, it is observed that the rate of consumption of this substrate was higher when the pH was kept constant.

The concentration of ethanol was 6.7 g L⁻¹ in pH free medium and 9.5 g L⁻¹ in medium with controlled pH. This resulted in a $Y_{P/S} = 0.26$ and $Q_P = 0.28$ for the medium without pH control and $Y_{P/S} = 0.31$ and $Q_P = 0.39$ for the medium with pH control. It is important to emphasise that this microorganism had never been previously tested in bioprocesses and that the results are also promising, since these experiments were performed in 5 L bioreactors, and also because the majority of the studies described in

the literature using micro-fermenters of xylose were performed in flasks or 2 L bioreactors (Hou 2012; Long et al., 2012; Hickert et al., 2013a).

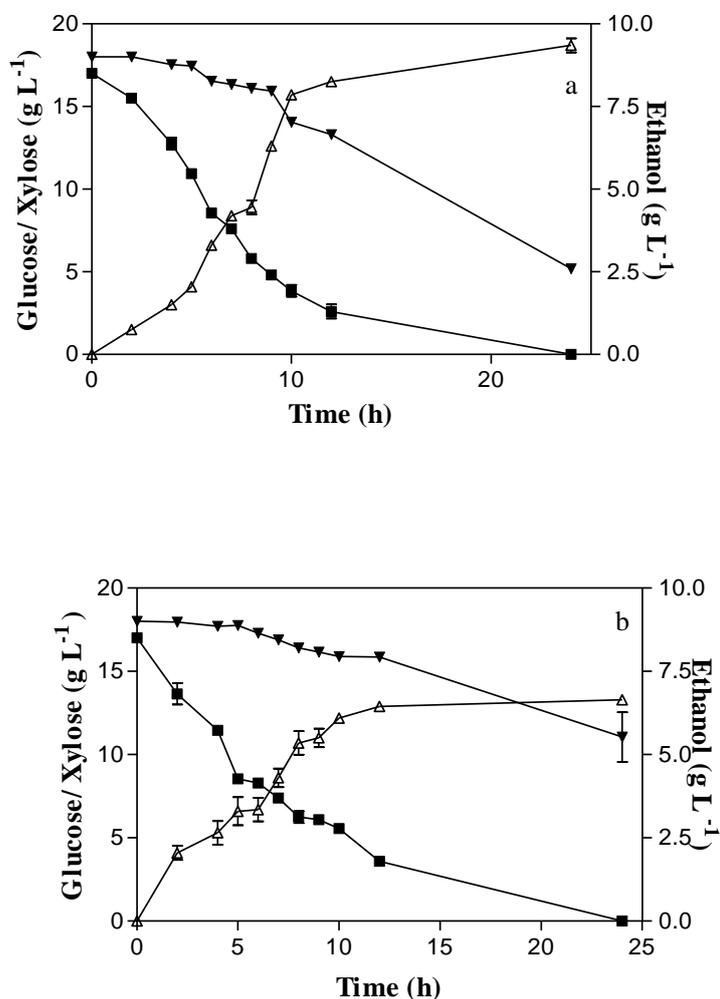


Figure 4. Ethanol production of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in bioreactors in microaerophilic conditions in synthetic medium (a) pH controlled; (b) pH uncontrolled; glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ). Results represent the mean of duplicates.

The pH control may have favoured the consumption of xylose and the accumulation of ethanol. In the literature, there are works on the fermentation of

pentose, which investigated the influence of aeration, but there are few reports on the role of pH. Hickert et al. (2013b) reported ethanol production of 0.50 g L^{-1} in synthetic medium under anaerobic conditions, using a microbial consortium of *S. cerevisiae* and *C. shehatae* and keeping the pH controlled at 5.0 Gutiérrez-Rivera et al. (2011) evaluated the production of ethanol in synthetic medium and obtained a production of 0.46 g g^{-1} under strict oxygen conditions and 0.46 g g^{-1} in anaerobic conditions, using a microbial consortium of *S. cerevisiae* ITV01 and *S. stipitis* NRRL Y-7124 and keeping the pH controlled at 5.0.

In this study, the production of ethanol by *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 was also evaluated in non-detoxified hydrolysate sugar-cane bagasse. The conditions applied were the same as in a synthetic medium, but the results for the production of ethanol were greater in the hydrolysate (5.7 g g^{-1} , $Y_{P/S} = 0.47$ and $Q_P = 0.24$). The data are shown in Figure 5.

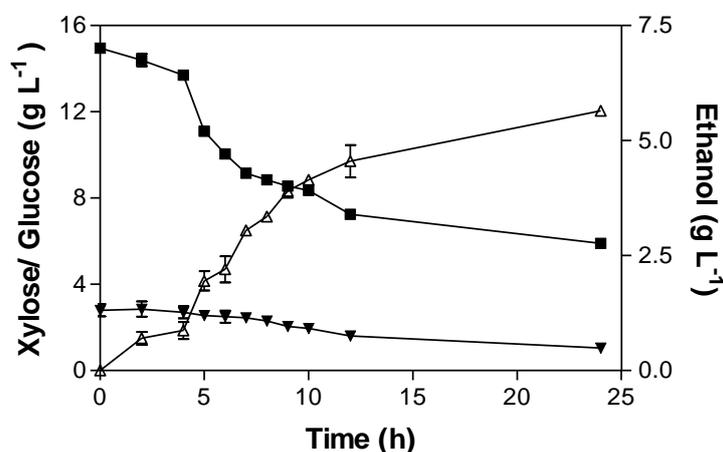


Figure 5. Ethanol production of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in bioreactors with hidrolysate sugar cane bagasse under microaerophile condition. Glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ). Results represent the mean of duplicate.

It is important to highlight that the initial concentration of sugars in a synthetic medium was greater than the concentration obtained in bagasse hydrolysates. Initially, the studies with hydrolysates were performed in flasks and conducted by separate saccharification and fermentation (SHF) and saccharification and simultaneous fermentation (SSF). In SSF, an ethanol yield of 0.29 g g^{-1} was obtained, but in SHF, this was 0.24 g g^{-1} . As a result, SSF was chosen to be employed in the bioreactor.

Hande et al. (2013) evaluated the production of ethanol from non-detoxified and detoxified hydrolysate sugarcane bagasse, using a yeast strain belonging to clade of *Scheffersomyces*; they reported the production of 0.33 g g^{-1} and 0.45 g g^{-1} of ethanol, respectively. Hickert et al. (2013b) reported an ethanol production of 0.44 g g^{-1} in the hydrolysate of non-detoxified husk rice medium, using a microbial consortium of *S. cerevisiae* and *C. shehatae* and keeping the pH controlled at 5.0.

The results found in the literature (Hande et al., 2013; Hickert et al., 2013b) are similar to those obtained in this work; however, it should be highlighted that the present study was performed with a new strain of *Spathaspora* and was conducted in a 5 L bioreactor, which is a larger volume.

4. Conclusion

Only *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 among thirteen strains studied converted xylose in synthetic medium as well in hydrolysate sugar cane bagasse. The microaerophilic conditions favoured the production of ethanol, while aerobic conditions favoured the production of biomass. The optimisation of pH and quantity of inoculum parameters demonstrated the influence of these variables on the production and yield of ethanol. The *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 cultures conducted at controlled pH were

more effective than those conducted at free pH and the results using hydrolysate sugar cane bagasse were not different to those obtained in the synthetic medium in 5 L bioreactors.

Acknowledgments: The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Universidade de Caxias do Sul (UCS). This research was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS (10/1972-5), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (310177/2011-1).

References

1. Agbogbo, F.K., Coward-Kelly G., 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* 9, 1515-1524.
2. Agbogbo, F.K., Wenger K.S., 2007. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 11, 723-727.
3. Bullet, M. Sharma, A.K. Goel, H.C., 2001. Effects of 2-deoxy-d-glucose on DNA repair and mutagenesis in UV-irradiated yeast. *J. Radiat. Res.* 42, 285-294.
4. Barbosa, M.F.S., Medeiros, M.B., Mancilha, I.M., Scheneiders, H., Lee, H., 1988. Screening of yeasts is production of xylitol from D- xylose and add factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 3, 241-251.
5. Bothast, R.J., Nichoes, N.N., Dien, B.S., 1999. Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnol. Prog.* 15, 857-875.
6. Cadete, R.M., Santos, R.O., Melo, M.A., Moorish, A., Goncalves, D.L., Stambuk, B.U., Gomes, F.C.O., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2009. *Spathaspora arborariae* sp. nov, a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS. Yeast. Res.* 9, 1338-1342.

7. Chen, W.H., Xu, Y.Y., Hwang, W.S., Wang, J.B., 2012. Pretreatment of rice straw using an extrusion building/extraction process taa bench-scale for producing cellulosic ethanol. *Bioresour. Technol.* 102, 10451-10458.
8. Edelen, C.L., Miller, J.L., Patino, H., 1996. Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality. *Tech. Q-Master. Brew. Airline Assoc.* 33, 30-32.
9. Fromanger, R., Guillouet, S. E., Uribelarrea, J.L., Molina- Jouve, C., Cameleyre, X., 2010. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology is ethanol production from xylose and glucose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 437-445.
10. Furlan, S.A., Bouilloud, P., de Castro, H.F., 1993. Influence of oxygen on the ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process. Biochem.* 29, 657-662.
11. Gong, C.S., Claypool, T.A., Mccracken, L.D., Maun, C.M., Ueng, P.P., Tsao, G.T., 1983. Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 1, 85-102.
12. Gutierrez-Rivera, B., Waliszewski-Kubiak, K., Zarrabal, O.C., Aguilar-Uscanga, M.G., 2011. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures is ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y 712. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 263-270.
13. Ha, S.J., Galazka, J.M., Kim, S.R., Choi, J. H., Yang, X., Seo, J.H., Glass, N.L., Cate, J.H.D., Jin, Y.S., 2010. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *PNAS.* 108, 504-509.
14. Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Martins, J.S., Gorwa-Grawlund, M.F., 2007. Toward industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 74,937-953.
15. Hahn-Hägerdal, B., Berner, S., Skoog, K., 1986. Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cererisiae* using respiratory inhibitor azide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24,287-293.
16. Hande, A., Mahajan, S., Prabhune, A., 2013. Evaluation of ethanol production by the new isolate of yeast te fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Ann. Microbiol.* 63, 63-70.
17. Hickert, L.R., Cunha-Pereira, F., Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z., 2013a. Ethanogenic fermentation of co-grandes cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate, *Bioresour. Technol.* 131, 508-514.
18. Hickert, L.R., Cunha-Pereira, F., Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z., 2013b. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 131, 508-514.

19. Hongzhi, L., Keke, C., Jingping, G., Wenxiang, P., 2011. Statistical optimization of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. *New. Biotechnol.* 28, 673-678.
20. Hou, X., 2012. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 94,205-2014.
21. Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 377-391.
22. Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2005. Will make an evolutionary engineering of mixed sugar utilization by the xylose *Saccharomyces cerevisiae* fermenting strain. *FEMS. Yeast. Res.* 5, 925-934.
23. Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., *Industrial biotechnology III: Fermentation processes and enzymatic.* São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.3.
24. Long, T.M., Su, Y.K., Headman, J., Higbee, A., Willis, L.B., Jeffries, M.R.S, 2012. Xylose cofermentation of glucose, and cellobiose by the beetle- associated yeast, *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5492-5500.
25. Lu, Z.T., Lin, S.X., Zhang, D.W., Dong, H., 2013. Screening of microorganisms capable of producing ethanol by direct fermentation of D-xylose. *Appl. Mech. Mater.* 291-294, 230-233.
26. van Maris, A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., Van Den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, W., Scheffers, A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2006. Alcoholic beverage fermentation of carbon sources in the biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek.* 90, 391-418.
27. Mueller, M., Wilkins, M.R., Banat, I.M., 2011. Production of xylitol by the IMB *Kluyveromyces marxianus* thermotolerant strains. *J. Bioprocess. Biotechniq.* 1: 102 doi:10.4172/2155-9821.1000102.
28. du Preez, J.C., 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme. Microb. Technol.* 16, 944-956.
29. Sen, R., Swaminathan, T. 2004. Response surface modelling and optimization to elucidate and analyse the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochem. Eng. J.* 21,141-148.
30. Silva, J.P.A., Mussatto, S.I., Roberto, 25.4-36, Teixeira, J.A., 2012. Fermentation médium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renew. Energ.* 1, 259-265.
31. Stambuk, B.U., Franden, M.A., Singh, A., Zhang, M., 2003. D- xylose transport by *Candida Succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Biochem. Biotech.* 106, 255-263.

32. Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 4744-4753.
33. Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A., 1984. Alcoholic beverage fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1221-1223.
34. Verbelen, P.I., Dekoninck, T.M., Saerens, S.M.G., van Mulders, S.E., Thevelein, I. M., Delvaux, F.R., 2009. Impact of pitching rate on beer flavor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 155-167.
35. Wang, L., Quiceno, R., Price, C., Malpas, R., Woods, J., 2014. Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. *Renew Sust Energ Rev* 40, 571-582.
36. Wilkins, M.R., Meller, M., Eichling, S., Ibrahim, M., Banat, I.M., 2008. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. *Process. Biochem.* 43, 346-350.
37. Zhou, H., Cheng, J.S., Wang, B., Fink, G.R., Stephanopoulos, G., 2012. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and will make an evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 14, 611-622.
38. Young, E., Lee, S., Alper, H., 2010. Optimizing pentose utilization in yeast: the need is novel tools and approaches. *Biotechnol. Biofuels.* 3, 24.

Artigo II

Dynamics of microbial growth during co-cultivation of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 with *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in the presence of glucose and xylose

Este artigo consiste na avaliação da dinâmica de crescimento do cocultivo entre *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, através do uso de um meio diferencial para identificar qual das duas linhagens predominam na fermentação. Neste trabalho, também foram otimizados os parâmetros pH e quantidade de inóculo inicial da cocultura.

Dynamics of microbial growth during co-cultivation of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 with *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in the presence of glucose and xylose

Fernanda Roberta Rech^a, Letícia Clara Formolo Fonseca^a, Roselei Claudete Fontana^a, Marli Camassola^a, Marco Antônio Záchia Ayub^b, Carlos A. Rosa^c, Aldo J. A Dillon^a

^aEnzymes and Biomass Laboratory, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil. Phone/Fax: +55 54 3218 2149.

^bBiotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cBiological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

* Corresponding author

fernandarec@gmail.com

Abstract

This study evaluated growth dynamics during the co-cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 using a differential agar medium Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN) with modifications to differentiate the colonies of the two different species. This methodology allowed to evaluate which strain predominated during the fermentation process. The optimization of the

parameters pH (4.0) and quantity of inoculum (3×10^8) provided an ethanol yield ($Y_{P/S}$) of 0.44 g g^{-1} and a productivity (Q_P) of $1.11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The conditions were reproduced in 5 L bioreactors, and $Y_{P/S} = 0.48$ and $Q_P = 1.17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ were obtained. Different amounts of inoculum were studied with the purpose of observing the behavior of the strains and their influence on ethanol production. The combination of *S. cerevisiae* and *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 showed promising results for the production of second-generation ethanol in medium containing glucose and xylose.

Keywords: bioprocesses, differentiation, dynamic growth, optimization, fermentation.

1. Introduction

Conventional maize and sugar cane crops for ethanol production by fermentation are unable to satisfy the global demand for ethanol production, since these crops are also used for the production of food. The employment of lignocellulosic material present in agricultural waste may be an alternative to increasing ethanol production (Sarkar et al., 2012; Karagöz and Özkan, 2014; Ndaba et al., 2014). The most commonly studied lignocellulosic materials include agricultural residues such as straw from cereals, corn cobs, sugarcane bagasse, forest residues, sawdust and scraps, and grasses (Sims et al., 2010; Sarkar et al., 2012; Karagöz and Özkan, 2014; Ndaba et al., 2014). However, the process to produce bioethanol or second generation ethanol presents some difficulties related to the transport and handling of biomass and the efficiency of the pre-treatment methods for the delignification of lignocellulose. Other issues are concerned with the release of polysaccharides to promote the action of enzymes in the process of enzymatic saccharification, as well as enzyme costs and the availability of a microorganism able to ferment sugars such as glucose and

xylose concomitantly to produce ethanol. These sugars need to be fully converted to bioethanol become an economically viable process (Sarkar et al., 2012).

One of the major obstacles to be overcome is the employment of microorganisms that effectively ferment all sugars present in the hydrolysates of lignocellulosic material due that the most commonly applied yeast for the production of ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, does not ferment xylose. Therefore, it is of great relevance microorganisms which have the natural ability to ferment both glucose and pentose to ethanol. Another strategy is the use of genetically modified strains that ferment both sugars (Kuyper et al., 2005; Feng and Zhao, 2013).

The co-fermentation of two different yeasts may be also an alternative for the concomitant fermentation of glucose and xylose. For the fermentation of C5 sugars, the most promising yeasts are *Candida shehatae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum* and *Spathaspora arborariae* (Da Cunha Pereira et al., 2011, Su et al., 2015). There are studies in the literature that describe the use of co-cultures for the fermentation of both sugars (Taniguchi et al., 1997; de Bari et al., 2013; Hickert et al., 2013b; Karagöz and Özkan, 2014; Ndaba et al., 2014). However, none of these studies carried out an evaluation of the dynamics of microbial growth during co-cultivation. In this context, the main objective of this work was to evaluate the growth dynamics of co-culture between *S. cerevisiae* CAT-1, an industrial strain used by the ethanol industry in Brazil, and a strain of *Spathaspora hagerdaliae*, a recently described D-xylose-fermenting species, that has demonstrated the ability to convert efficiently pentose to ethanol (Lopes et al., 2016). The study was conducted in a synthetic medium and the study of the dynamics of the growth of the colonies was performed in the differential medium in flasks and bioreactors cultures.

2. Material and Methods

2.1 Microorganisms and maintenance

In this work, it was used *S. cerevisiae* CAT-1, commonly used in the Brazilian fuel ethanol industry, obtained from Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), University of São Paulo, Piracicaba/SP, kindly donated by Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes. The other yeast used was the *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, obtained from the Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas Gerais, isolated from rotting wood of Atlantic Rain Forest (Lopes et al., 2016). The stock cultures were maintained in a freezer at -80°C with 20% (v/v) glycerol after growth in medium containing (in g L^{-1}): yeast extract, 3; malt extract, 3; bacteriological peptone, 5; and glucose 10.

2.2 Media used for cultivation

2.2.1 Preparation of the inoculum

For the *S. cerevisiae* CAT-1 inoculum, cells were grown in YMPG medium composed of (in g L^{-1}): yeast extract, 3; malt extract, 3; bacteriological peptone, 5; and glucose, 18. The cells of the *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 inoculum were grown in YMPX medium composed of (in g L^{-1}): yeast extract, 3; malt extract, 3; bacteriological peptone, 5; and xylose, 18. For co-fermentation cultures, YMPGX medium was used, composed of (in g L^{-1}): yeast extract, 3; malt extract, 3; bacteriological peptone, 5; glucose, 18 and xylose, 18.

2.2.2. Growth under aerobic and microaerophilic conditions in different media of *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 and *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

The cultivation of the strains was performed under aerobic conditions and under microaerophilic conditions. The consumption of the substrate, as well as xylitol and ethanol production in the medium containing glucose, xylose or a mixture of both sugars (YMPG, YMPX and YMPGX) were evaluated. The experiment was carried out in 50 mL Duram flasks, containing 20 mL of medium and 1×10^7 cells mL⁻¹ as inoculums. The flasks were incubated at 28°C under 180 rpm of agitation. Samples were collected at the following time points (h): 0, 3, 6, 9, 12, and 15. For each time, two flasks were sampled. For the microaerophilic culture, the flasks were closed with a flask cover, while under aerobic conditions the flasks were closed with cotton gauze. For the biomass determination, 10 mL of the sample was collected and centrifuged for 10 min at 2504 g at 4°C in previously weighed tubes. The supernatant was stored for sugar and ethanol analysis and the pellet was washed twice with distilled water and dried at 75°C to a constant weight.

2.3 Development of co-fermentation

For co-fermentation, YMPGX medium was used. The experiments were conducted in 1 L Erlenmeyer flasks, containing 300 mL of medium, incubated at 28°C, stirred at 180 rpm, with an initial pH of 5.0 and under microaerophilic conditions. Initially 1×10^7 cells mL⁻¹ of each strain was used as inoculum samples were collected at 0, 12, 18, 24, 30, 36, 48 and 72 h to evaluate the sugar consumption, ethanol production and growth kinetics. All experiments were carried out in duplicate.

Co-fermentations were also performed varying the amount of inoculum, i.e. 1×10^7 cells mL⁻¹ of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 and 1×10^6 cells mL⁻¹ of *S.*

cerevisiae CAT-1. Another strategy was to inoculate 1×10^7 cells mL^{-1} of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y-303 after 24 h of fermentation starting.

2.4 Growth dynamics study using agar plates with differential medium

For the evaluation of population growth, WLN medium plates were used with modifications in the composition the amount of the bromocresol green. The medium was prepared and autoclaved at 121°C for 15 min. After sterilization, 20 mL was distributed onto each plate. For the evaluation of viable cells, the samples were collected at the following time points (h): 0, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 and 72, diluted in series, plated and incubated at 28°C for 72 h. After this period, the colonies were counted and also differentiated, using the color (white and green) characteristic of each strain in the differential medium.

2.5 Experimental design for the optimization of ethanol production by *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 and *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

With the purpose of optimizing the production of ethanol as a function of pH and the quantity of inoculum, a complete 2^2 factorial design was proposed. In total, eleven experiments were performed containing five levels. For the statistical calculation, the variables were coded according to Eq.(1):

$$xi = \frac{(Xi - Xo)}{\Delta Xi} \quad \text{Eq 1.}$$

where xi is the value of the independent coded variable, Xi is the real value of the independent variable, Xo is the real value of the independent variable in relation to

the center point and ΔX_i is the step change value. The intervals and the levels of the variables investigated in this study are described in Table 1.

Table 1. Process variables and their levels used in the central composite design of ethanol study.

Trial no.	Coded and uncoded variables		Ethanol g L ⁻¹
	X1	X2	
1	4 (-1)	1x10 ⁸ (-1)	4.4
2	4 (-1)	2x10 ⁸ (0)	6.2
3	4 (-1)	3x10 ⁸ (+1)	8.9
4	5 (0)	1x10 ⁸ (-1)	2.1
5	5 (0)	2x10 ⁸ (0)	3.5
6	5 (0)	2x10 ⁸ (0)	3.4
7	5 (0)	2x10 ⁸ (0)	3.5
8	5 (0)	3x10 ⁸ (+1)	6.8
9	6 (+1)	1x10 ⁸ (-1)	1.0
10	6 (+1)	2x10 ⁸ (0)	2.4
11	6 (+1)	3x10 ⁸ (+1)	3.5

The quadratic model for the prediction of point great was expressed in accordance with Eq. (2)

$$Y_c = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Eq 2.}$$

where Y_c is the response variable, β_0 is the constant, β_i is the coefficient for the linear effects, β_{ii} is the coefficient for the effects quadratics, β_{ij} is the coefficient for the interaction of effects are coded levels of variable e $x_i x_j$

2.6 Fermentation in the bioreactor

In this work, a bioreactor (New Brunswick –USA) was employed with a total capacity of 10 L, using a working volume of 5 L. A 500 mL aliquot previously standardized for 3x10⁸ cells mL⁻¹ (1.5x10⁸ cells mL⁻¹ de *S. hagerdaliae* and 1.5x10⁸ cells mL⁻¹ de *S. cerevisiae*) was used as the inoculum in the bioreactor containing 4.5

L of YPMGX medium. The cultivation in the bioreactor was conducted in anaerobic conditions, with stirring of 200 rpm, at 28°C. The test pH was conducted automatically controlled at pH 4 with 1 mol L⁻¹ NaOH and 1 mol L⁻¹ HCl; some tests were also conducted without controlling the pH in bioreactor. Aliquots of 5 mL were removed on 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h for analytical analyses.

2.7 Analytical methods

The quantification of the consumption of the substrate and xylitol as well as ethanol production were analyzed by HPLC (Shimadzu, Japan), using a refractive index detector equipped with a Aminex HPX-87 H column (Bio-Rad Laboratories Ltd., USA). The conditions of the analysis were: temperature 55°C; flow 0.6 mL min⁻¹ using as the mobile phase 5 mol L⁻¹ H₂SO₄.

2.8 Fermentation parameters

The ethanol yield ($Y_{P/S}$ g g⁻¹) was defined as the ratio between the quantity of ethanol produced and the total sugars consumed until the emergence of the production of xylitol. The productivity of ethanol [Q_P (g L⁻¹ h⁻¹)] was determined by the ratio between the concentration of ethanol (g L⁻¹) and the fermentation time (h).

3. Results and Discussion

As first step before the co-culture study was relevant to know the kinetic parameter to both strains the *S. cerevisiae* CAT-1 and *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303. However informations about kinetic parameter for *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303

were previously obtained (data not showed). The Figure 1 shows the kinetic parameters of *S. cerevisiae* CAT-1 evaluated in the medium containing only glucose and a medium containing a mixture of glucose and xylose. As expected for *S. cerevisiae*, due it does not express the enzymes required for the assimilation of xylose, this strain not metabolize xylose. The goal of the study in the medium containing both sugars was to assess the influence of xylose on the kinetics of the microorganism. However, the behavior of *S. cerevisiae* CAT-1 was similar in both media. It must be emphasized that the biomass production was greater under aerobic conditions, reaching a 3.8-4.1 g L⁻¹, while under microaerophilic conditions the mass production was 2.3-3.1 g L⁻¹.

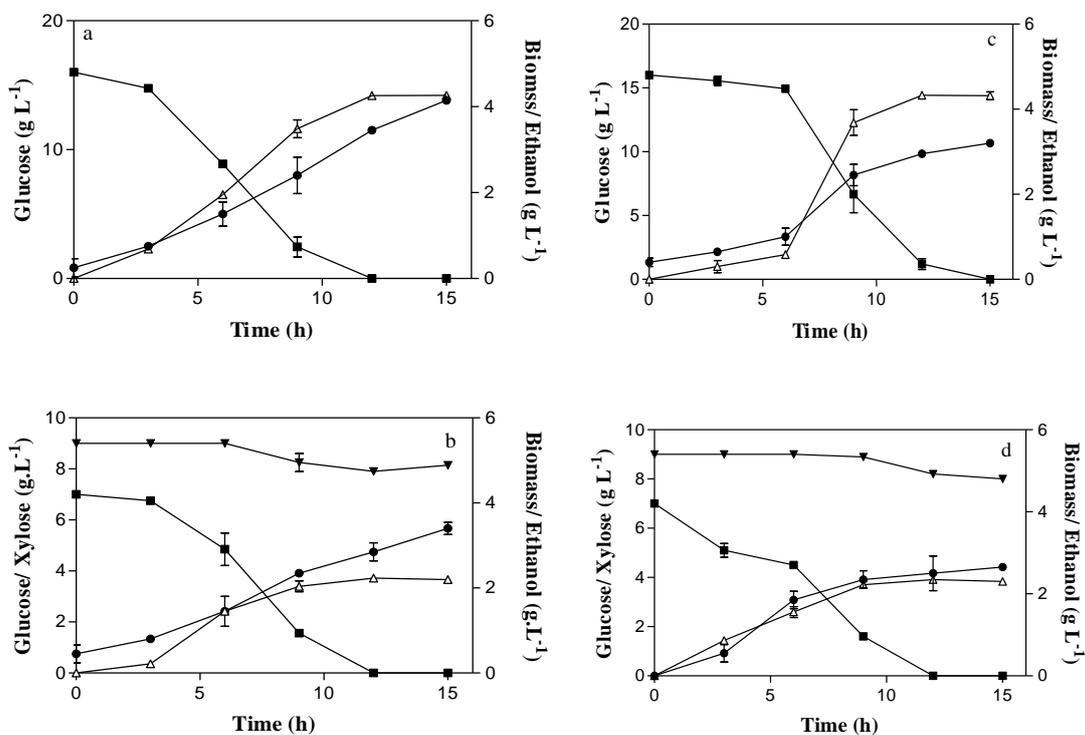


Figure 1. Biomass and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in flasks in aerobic conditions. (a) YPMG (medium with glucose). (b) YPMXG (medium with xylose and glucose). Microaerophilic conditions (c) YPMG (medium with glucose); (d) YPMXG (medium with xylose and glucose). Glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ) and biomass (●). Results are the mean of duplicates.

The data on ethanol concentration, yield and productivity are presented in Table 2. The yields of ethanol for *S. cerevisiae* CAT-1 under microaerophilic and aerobic conditions were similar to the results of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 under the same conditions (data not published). The productivity of CAT-1 under microaerophilic conditions was higher than that of *S. hagerdaliae*.

Table 2. Data on the concentration (g L^{-1}), yield ($Y_{P/S}$) and ethanol productivity (Q_P) of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 in flasks.

Strain	Condition	Substrate	Conc (g L^{-1})	$Y_{(P/S)}$	Q_P
<i>S. cerevisiae</i>	Aerobic conditions	Glucose	4.3	0.26	0.28
		Xylose/glucose	2.2	0.24	0.14
	Microaerophilic condition	Glucose	4.4	0.27	0.30
		Xylose/glucose	2.5	0.35	0.17

The medium with the highest ethanol production was YPMXG under microaerophilic conditions. As can be seen in Figure 1, YPMG medium under aerobic conditions after 12 h of culture produced 4.1 g L^{-1} of ethanol; however, the yeast culture consumed ethanol, probably as an energy source for their growth (Fromanger et al., 2010). Thus, the medium chosen for the other experiments was YPMXG under microaerophilic conditions.

3.1 Optimization of pH and quantity of inoculum

The fermentation conditions to co-cultivation are principally dependent on the choice of microorganism, however, every fermentation process also presents optimum values for growth parameters (Chen, 2011).

The pH is an important parameter when used in lower values to control of bacterial contamination and also in relation to its effect on the consumption of the substrate (Hahn-Hägerdal et al., 2007). The quantity of inoculum is a determinant for

industrial fermentation, because it influences the product concentration (Edelen et al., 1996), the quality of the final product, the production of biomass, the duration of the lag phase and the specific growth rate (Sen Swaminathan, 2004). Obtaining information about the variation in the initial quantity of inoculum is of great importance for the fermentation process on the industrial scale (Verbelen et al., 2009). There are many studies that evaluated the aeration parameter in co-cultures (Taniguchi et al., 1997; Skoog and Hahn-Hägerdal, 1990; Hickert et al., 2013b), but there are few data on the influence of inoculum size, pH or both. In respect this, it was evaluated the effect of two combined parameters on co-culture looking forward to obtain higher ethanol production. The high significance of the linear effects of pH and the quantity of inoculum and the effects of the interaction between these two parameters indicate that these variables can act as limiting factors in the ethanol production process, even when small variations occur. The results also show that the quadratic effect of pH and the quantity of inoculum were not significant. The reduced model of the second order polynomial equation can be expressed as Eq. 3.

$$Y_1 = 3.64 - 2.12x_1 + 1.97x_2 \quad \text{Eq 3.}$$

where Y_1 represents the concentration of ethanol as a function of pH (x_1) and the quantity of inoculum (x_2).

ANOVA showed that the model was highly significant ($p < 0.000018$), with $R^2 = 0.9814$, which means that 98% of the total variation is explained by the model. This suggests a satisfactory representation of the process and a good correlation between the experimental values and the predicted values.

A Pareto diagram was used to show the effects of the studied variables (pH and quantity of inoculum) and their interactions and their influence on ethanol production. It

comprises a horizontal bar graph that is associated with the effects of each variable individually and their interactions; effect is meaningful to the right of the red line at a significance level of 95% confidence, confirming the results shown in Figure 2.

The calculation of the linear and quadratic effects indicates how much of the effect is statistically significant. In Figure 2, it is possible to observe that variables 1 and 2 linear had significant effects. The quadratic effect of the two variables was not statistically significant, nor was the interaction.

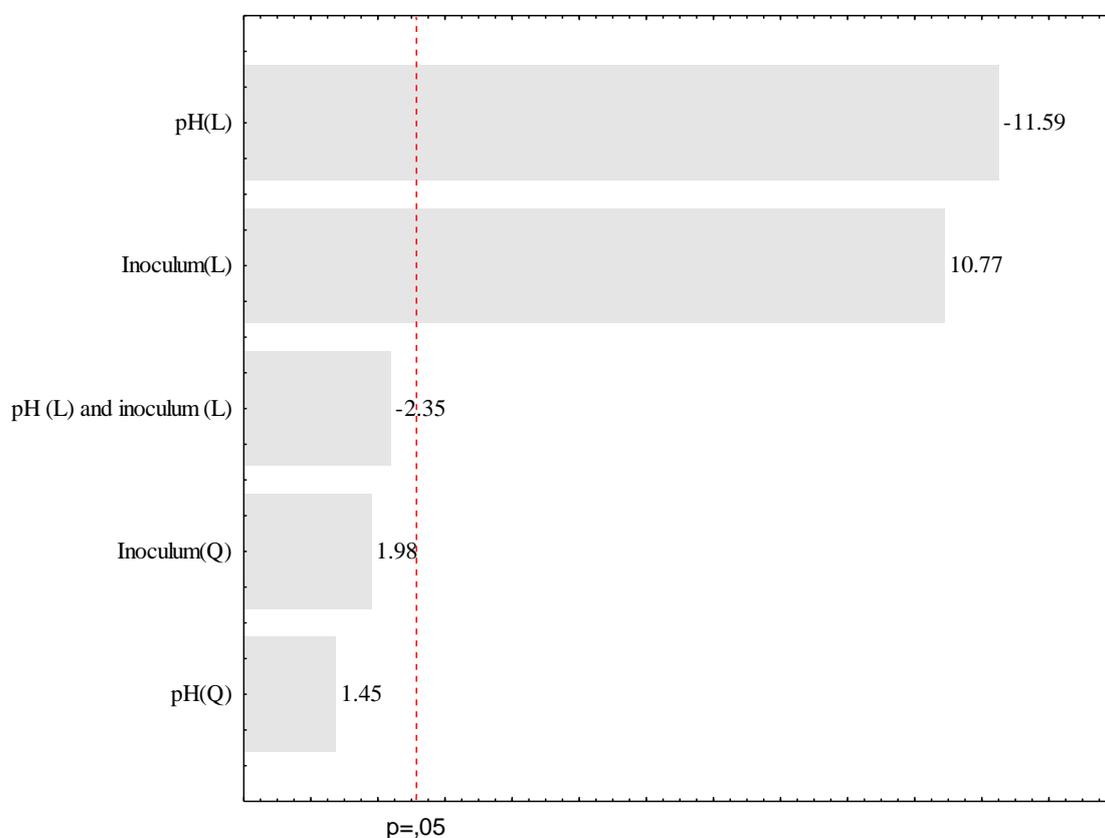


Figure 2. Pareto chart of the standardized effects of independent variables ethanol pH and amount of inoculums depends on the variable ethanol.

The optimal conditions for ethanol production were pH 4.0 and 3.0×10^8 cells mL^{-1} for 8 h of cultivation ($Y_{P/S} = 0.44 \text{ g g}^{-1}$ and $Q_P = 1.11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). This point was also indicated by the Statistical® software; as this condition was one of the points of the

planning experiment. These conditions were reproduced in the 10 L bioreactor with a working volume of 5 L. It should be highlighted that most co-culture studies in the literature were developed at the laboratory scale with a maximum working volume of 1.5 L (Cunha Pereira et al., 2011; Hou 2012; Long et al., 2012; Hickert et al., 2013b).

3.2 Growth dynamic evaluation of co-cultivation using differential media

As already mentioned in the course of this work, in the literature, there are various studies that use yeast co-cultures, however, none of them occurred a study in dynamic of population growth. The majority of authors evaluates the growth per colony-forming unit (CFU) in YEPD medium or by dry weight. However these methodology does not allow assess the real quantities of a strains present in the fermentation, or if one of them is predominantly the cultivation.

Colonies belong different strains growth in WLN differential medium can be distinguish by staining (Pasqual et al., 1990). As can be seen in Figure 3 of this work. The colonies of *S. cerevisiae* CAT-1 are distinguished easily by its green coloration (Figure 3a), showing that the acid-base indicator, bromocresol green, is incorporated in the cells and become green due these cell have an internal alkaline pH (Schuller et al., 2000). Already the colonies of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 also incorporated the dye but exhibit a creamy-white coloration (Figure 3c) due to higher acidity of the cells. Thus, it was possible to distinguish colonies of two species of yeasts when grown together in the co-culture and are spread in the WLN plate (Figure 3b). It is important to highlight that this color in the colonies occurred after 72 h of growth in the WLN plate.

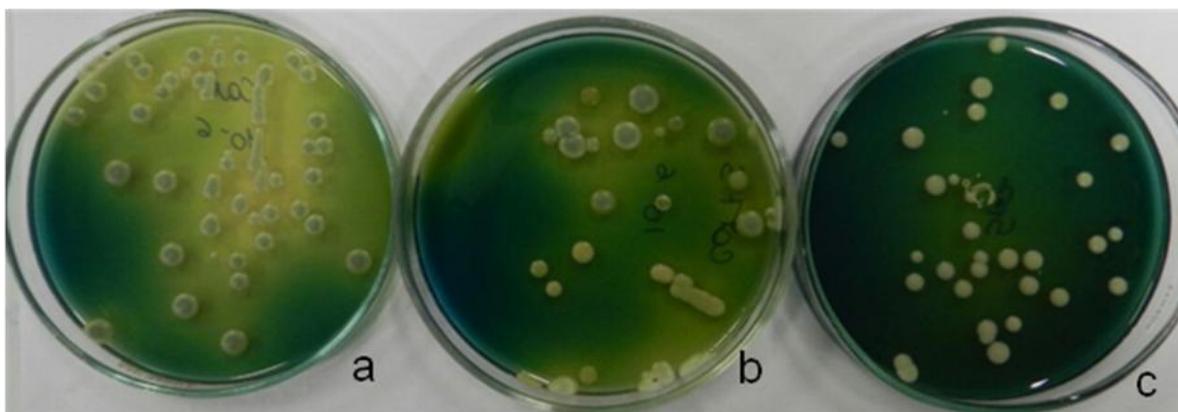


Figure 3. Morphology of the colonies of yeast in pure or mixed culture. (a) *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1; (b) mixed culture; (c) *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303.

3.3 Dynamic of growth in submerged cultivation in shaker flasks for the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303

As in previous studies, it was observed that *S. cerevisiae* CAT-1 has more accelerated growth compared to *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, thus, the cultures were conducted under microaerophilic conditions using three strategies of inoculation: the first batch was inoculated with the same amount of cells for the two strains, the second was inoculated with a ten times larger quantity of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, and the third strategy used the same quantity of inoculum, but *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 was added 24 h after the beginning of the cultivation. The results for the production of ethanol and growth can be seen in Figure 4.

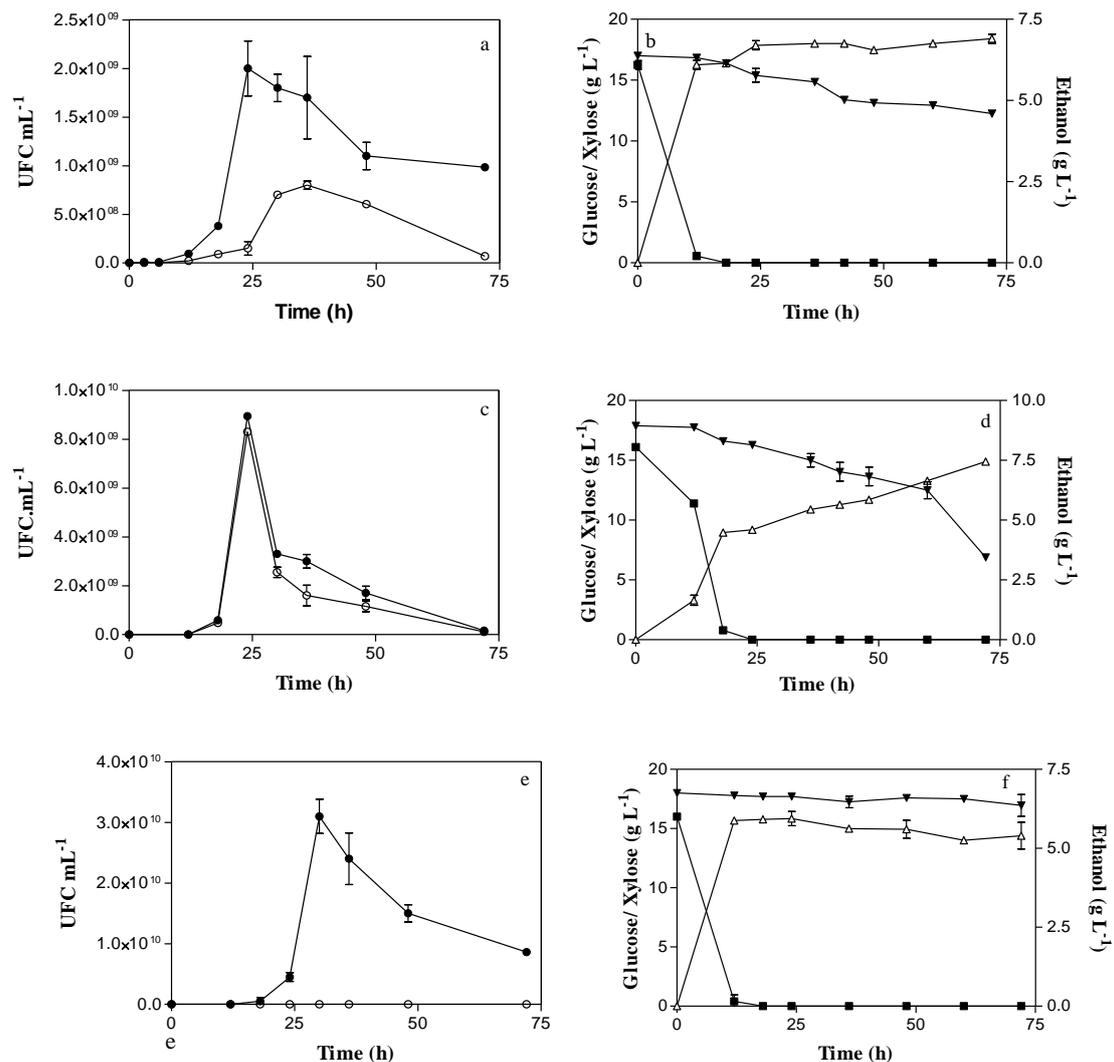


Figure 4. Biomass and ethanol production of co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Spathaspora hagerdalis* UFMG-CMY-303 in medium YPMGX. In flasks in anaerobic conditions. (a) Biomass in medium with the same amount of size. (b) Ethanol production in medium with the same amount of size. (c) Biomass in medium with ten times more *Spathaspora hagerdalis* UFMG-CMY-303. (d) Ethanol production in medium with ten times more *Spathaspora hagerdalis* UFMG-CMY-303. (e) Biomass in medium inoculated 24 hours late (f) Ethanol production in medium inoculated 24 hours late. Glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ) biomass of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (●) and biomass of *Spathaspora hagerdalis* UFMG-CMY-303 (○). Results represent the mean of duplicates.

As can be observed, in the first condition (the same inoculation quantity to both strains) more accelerated growth of *S. cerevisiae* CAT-1 occurred. The glucose was completely consumed within of a period of less than 20 h and xylose consumption was slower and at the end of fermentation this sugar was present in the medium. Under these conditions, the ethanol production was 7 g L^{-1} with $Y_{P/S} = 0.31 \text{ g g}^{-1}$. In the second strategy (when the inoculum of *S. hagerdaliae* UFMG-CMY-303 was ten times greater than that of *S. cerevisiae*), the growth of the strains was similar and greater consumption of xylose was observed. The production of ethanol was 7.5 g L^{-1} with $Y_{P/S} = 0.33 \text{ g g}^{-1}$. In the third test (*S. hagerdaliae* UFMG-CMY-303 was added 24 h after the beginning of the cultivation) only *S. cerevisiae* CAT-1 growth was observed. This can be explained by the high cell concentration of *S. cerevisiae* CAT-1 the growth which prohibited *S. hagerdaliae* UFMG-CMY-303 growth. When *S. hagerdaliae* UFMG-CMY-303 was added, there was no more glucose in the medium and only xylose was available; moreover, the cell concentration was very high. Under these condition, xylose was not consumed and the production of ethanol was 5 g L^{-1} with $Y_{P/S} = 0.27 \text{ g g}^{-1}$. Competition may have occurred between strains, or some important nutrient for the growth of cells *S. hagerdaliae* may have been depleted during the first 24h.

Ndaba et al. (2014) also evaluated different strategies of inoculation in the co-fermentation of mixtures of glucose and xylose and hydrolysate bagasse of sorghum using the strains of *S. cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. Initially, the conditions were optimized in synthetic medium and then tested in the mean hydrolysate. The inoculation strategies used were 1:3 and 5:10 g L^{-1} *Z. mobilis* to *S. cerevisiae*. The amount of *S. cerevisiae* was less than that of *Z. mobilis*, which can be explained by the fact that *Z. mobilis* is a bacterium and has more accelerated metabolism compared to yeasts. The authors observed that the best strategy for a mixture of glucose and xylose was

5:10 g L⁻¹ with a production of 9.3 g L⁻¹ and $Y_{P/S} = 0.23 \text{ g g}^{-1}$. In hydrolysate bagasse sorghum medium the authors observed $Y_{P/S} = 0.50 \text{ g g}^{-1}$ with 5:10 g L⁻¹ of *Z. mobilis* for *S. cerevisiae*.

3.4 Submerged cultivation with both *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora hagerdaliae* in bioreactors containing mixtures of glucose and xylose

For co-culture in submerged cultivation in bioreactor using working volume of 5 L of medium, the start conditions were pH 4.0 with or without control during fermentation and $3 \times 10^8 \text{ cell mL}^{-1}$ as of inoculum with the same concentration of *S. cerevisiae* CAT-1 and *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 strains. The results can be observed in Figure 6.

As can be seen (Figure 5) with without pH control (a), the ethanol production was 4.85 g L⁻¹ with $Y_{P/S} = 0.28 \text{ g g}^{-1}$, while pH control (b), the ethanol production was 8.2 g L⁻¹ and $Y_{P/S} = 0.48 \text{ g g}^{-1}$, a result very near the theoretical value. In this case, there was practically no consumption of xylose, which can be explained by the pH value used, as xylose is usually consumed at higher high pH in the 5-6 range (Gutiérrez-Rivera et al., 2011; Hickert et al., 2013b). In previous studies using only a strain of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 it was observed that the maintenance of pH controlled at 5 favors the consumption of xylose and ethanol production.

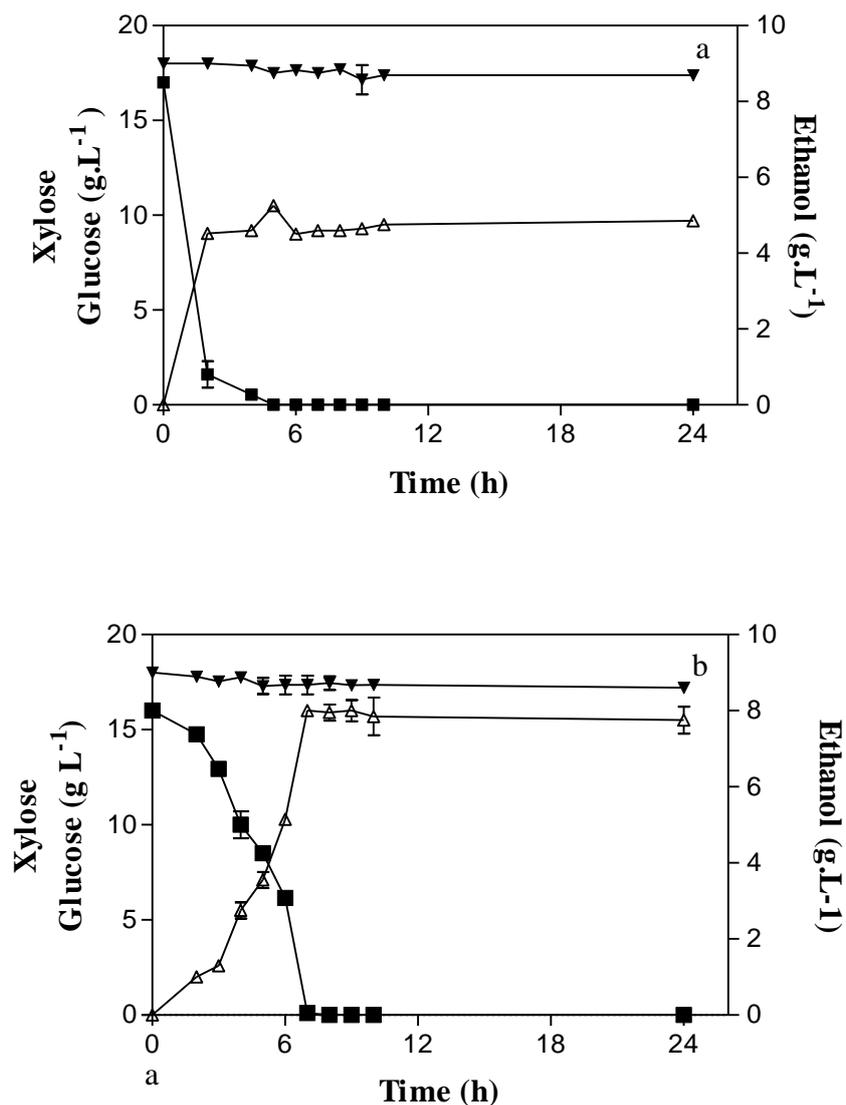


Figure 5. Ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 in bioreactors in microaerobic conditions. (a) pH uncontrolled; (b) pH controlled. Glucose (■); xylose (▼); ethanol (Δ). Results represent the mean of duplicates.

It is important to highlight that these studies were conducted in a 5 L volume using 10 L bioreactors and that the majority of studies with co-cultivation are carried out in vials or 2 L bioreactors (Hou 2012; Long et al., 2012; Hickert et al.,

2013b). The pH is an important parameter both in the control of bacterial contamination and its effect on the consumption of the substrate (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

4. Conclusion

This work showed that the combination of *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 and *S. cerevisiae* CAT-1 increased the production of ethanol in synthetic medium containing glucose and xylose. The optimization of the parameters pH and the quantity of inoculum provided a yield of 0.48 g g⁻¹ in bioreactors; these results approach the notional production of ethanol. WLN differential medium was used to evaluate the dynamic growth of the strains by allowing the differentiation of microorganisms and providing information on the predominance of one strain or another. The different strategies of cultivation allowed us to assess the behavior of organisms during the fermentation process and the means WLN was found to be an efficient methodology for the evaluation of growth dynamics in bioprocesses.

Acknowledgments: The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Universidade de Caxias do Sul (UCS). This research was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS (10/1972-5), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (310177/2011-1).

Bibliographical references

- [1] Chen Y. Development and application of co-culture for ethanol production byco-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38: 581-597.
- [2] Da Cunha Pereira F, Hickert LR, Sehnem N T, Souza-Cruz PB, Rosa C A, Ayub MAZ. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae* an their co-fermentations. *Bioresour Technol* 2011;102: 4218-4225.
- [3] De Bari I, De Canio P, Cuna D, Liuzzi F, Capece A, Romano P. Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *New Biotechnol* 2013; 30: 591-597.
- [4] Edelen CL, Miller JL, Patino H. Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality. *Tech Q-Master Brew Assoc Am* 1996; 33: 30-32.
- [5] Feng X, Zhao, H. Investigating host dependence of xylose utilization in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains using RNA-seq analysis. *Biotechnol Biofuels* 2013; 6:96.
- [6] Fromanger R, Guillouet SE, Uribelarrea JL, Molina- Jouve, C, Cameleyre X. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology is ethanol production from xylose and glucose. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37: 437-445.
- [7] Gutierrez-Rivera B, Waliszewski-Kubiak K, Zarrabal OC, Aguilar-Uscanga MG. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-712. *J Chem Technol Biotechnol* 2011; 87: 263–270.
- [8] Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Martins JS, Gorwa-Grawlund MF. Towards industrial pentose- fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 74:937-953.
- [9] Hickert L R, Cunha-Pereira F, Souza-Cruz PB, Rosa CA, Ayub MAZ. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. *Bioresour Technol* 2013; 131: 508–514.
- [10] Hou X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 94: 205-2014.
- [11] Karagöz P, Özkan M. Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. *Bioresour Technol* 2014; 158: 286-293.
- [12] Kuyper M, Toirkens MJ, Diderich JA, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Evolutionary engineering of mixed sugar utilization by a xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res* 2005; 5: 925-934.

- [13] Long TM, Su YK, Headman J, Higbee A, Willis LB, Jeffries TW. Cofermentation of glucose, xylose and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 5492-5500.
- [14] Lopes MR, Morais CG, Kominek J, Cadete RM, Soares MA, Uetanabaro APT, Fonseca C, Lachance MA, Hittinger CT, Rosa CA. Genomic analysis and d-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* 2 species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. 3 nov., and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. *FEMS Yeast Research* 2016; doi: 10.1093/femsyr/fow044.
- [15] Ndaba B, Chiyanzu I, Marx S, Obiero G. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the co-fermentation of sweet sorghum bagasse hydrolysates pretreated under varying conditions. *Biomass Bioenerg* 2014; 71: 350-356.
- [16] Pasqual MS, Carrau-Bonomi J, Serafini LA, Dillon AJP. A simple method to detect killer yeast in industrial system. *J Ferment Bioeng* 1990; 70: 180-181.
- [17] Sarkar N, Ghosh SK, Bonnerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energ* 2012; 37: 19-27.
- [18] Schuller D, Côte-Real M, Leão C. A differential medium for the enumeration of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces ballii* in wine. *J Food Prot* 2000; 73: 1570-1575.
- [19] Sen R, Swaminathan T. Response surface modelling and optimization to elucidate and analyse the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochem Eng J* 2004; 21:141-148.
- [20] Sims AP, Barnett JA. The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and d-galactose by certain anaerobically fermenting yeasts (Kluyver effect). *Microbiol* 2010; 106:277-288.
- [21] Taniguchi M, Itaya T, Tohma T, Fujii M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficiente mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng* 1997; 83: 364-370.
- [22] Su YK, Willis LB, Jeffries TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol Bioeng*. 2015; 112: 457-69.
- [23] Verbelen PI, Dekoninck TM, Saerens SMG, van Mulders SE Thevelein IM, Delvaux FR. Impact of pitching rate on beer flavor. *Appl Microbiol Biot* 2009; 82: 155-167.

3.3. Artigo III

Produção de etanol a partir dos açúcares liberados da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar por cocultivo

Este artigo se refere à sacarificação e fermentação simultâneas em volumes operacionais de 5 L com cocultura de *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, de açúcares liberados da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor. Também descreve a influência de inibidores, como hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético sobre a produção de etanol.

Produção de etanol a partir dos açúcares liberados da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar por cocultivo

Fernanda Roberta Rech^a, Roselei Claudete Fontana^a, Marli Camassola^a, Marco Antônio Záchia Ayub^b, Carlos A. Rosa^c, Aldo J. A Dillon^a

^a Enzymes and Biomass Laboratory, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

Phone / Fax: +55 54 3218 2149

^bBiotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cBiological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: fernandarec@gmail.com

Resumo

A hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por celulases e hemicelulases resulta em misturas de carboidratos, como pentoses e hexoses, que podem ser convertidos em etanol pela ação de microrganismos, como as leveduras. Neste estudo, foi utilizado o cocultivo entre as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 para a produção de etanol a partir de açúcares liberados da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Os cultivos foram conduzidos sob condição de hidrólise e fermentação separadas (SHF) e

hidrólise e fermentação simultâneas (SSF). O uso do cocultivo possibilitou a conversão de glicose e de xilose presentes no bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado por explosão a vapor a 200 °C por 8 min) a etanol, atingindo uma produção de 15 g.L⁻¹ em biorreatores com volume operacional de 5 L na condição SSF. O efeito dos inibidores hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético foram avaliados para determinação da sua influência no rendimento de etanol. Verificou-se que o ácido acético acima da concentração de 2 g.L⁻¹ é prejudicial para a produção de etanol pela linhagem *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303.

1. Introdução

Os materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz, a palha e o sabugo de milho, entre outros agro-resíduos, são matérias-primas promissoras para a produção de etanol 2G, como uma alternativa ao uso de combustíveis não renováveis, como o petróleo e o carvão mineral (Dias *et al.*, 2012). Esta tecnologia também tem a vantagem de agregar valor a resíduos agrícolas que são simplesmente usados como fertilizantes no solo ou queimados para a geração de energia (Sarkar *et al.*, 2012; Karagöz & Özkan, 2014; Ndaba *et al.*, 2014).

Para as tecnologias de produção de etanol 2G, existe influência do tipo de resíduo lignocelulósico, dos métodos de pré-tratamento, da presença de compostos inibidores, do tipo e da quantidade de enzima, dos microrganismos usados, das condições de cultivo (temperatura, pH, tipo e quantidade de nutrientes, entre outros) e, também, do tipo de biorreator (Paulová *et al.*, 2014).

O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo mais abundante gerado no Brasil, visto que o país é um grande produtor de açúcar e etanol; são produzidos 280 kg de bagaço por tonelada de cana processada (Canilha *et al.*, 2010). O bagaço é proveniente da

moagem da cana-de-açúcar, cujo caldo é usado para a produção de açúcar e etanol, podendo ser queimado para a produção de energia térmica ou elétrica, mas, pela quantidade, ainda constitui um excedente do processo (Canilha *et al.*, 2010). Por isso, o bagaço pode ser destinado à produção de etanol 2G.

O bagaço de cana-de-açúcar é constituído, basicamente, por celulose (43,38%), hemicelulose (25,63%), lignina (23,24%), extraíveis (4,82%) e cinzas (2,94 %) (Dias *et al.*, 2012). Os materiais lignocelulósicos possuem uma estrutura rígida, tornando necessária uma etapa de pré-tratamento, que promove a desestruturação das ligações entre a lignina e os polissacarídeos. Essa etapa é fundamental para aumentar o acesso das enzimas na etapa da hidrólise enzimática (Moiser *et al.*, 2005b; Galbe & Zacchia, 2007).

Uma estratégia para a fermentação de todos os açúcares presentes no hidrolisado é o uso de cofermentação, usando dois microrganismos diferentes, um para a fermentação de glicose e outro para a fermentação de xilose. Alguns trabalhos na literatura descrevem o uso de cocultura e apresentam resultados promissores para a fermentação de ambos os açúcares (Taniguchi *et al.*, 1997; De Bari *et al.*, 2013; Hickert *et al.*, 2013a and 2013b; Karagöz & Özkan, 2014; Ndaba *et al.*, 2014).

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a produção de etanol a partir dos açúcares liberados da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar por complexo enzimático comercial em SSF e SHF em biorreatores por cocultivo de *S. cerevisiae* CAT-1 – uma levedura industrial usada em várias usinas de etanol no Brasil, e a linhagem de levedura *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, que apresenta capacidade de fermentar xilose (Lopes *et al.*, 2016). Neste estudo, também foram avaliados a formação de compostos inibidores e sua influência na etapa de fermentação pelas linhagens selecionadas.

2. Material e Métodos

2.1 Material

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste estudo foi obtido junto à Casa Bucco - Destilados Artesanais, localizada no distrito de Tuiuty, Bento Gonçalves, RS (29°03'01.8"S 51°34'37.5"O, 640 m acima do nível do mar), proveniente da moagem da cana-de-açúcar, onde o caldo é utilizado para a produção de cachaças. A enzima comercial empregada neste trabalho corresponde à preparação Celluclast[®] 1,5 L FG, produzida pela *Novozymes[®] Latin América* (Araucária, PR) gentilmente doada pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, RS).

2.2 Microrganismos e manutenção das células

As leveduras usadas nesse trabalho foram *S. cerevisiae* CAT-1, proveniente da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP, gentilmente cedida pelo professor Luiz Humberto Gomes e *S. hagerdaliae* UFMG- CM-Y303, cedida pelo prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, da Universidade Federal de Minas Gerais. As culturas estoque foram mantidas em glicerol (20%) e (80%) de suspensão celular, crescidas em meio contendo (em g.L⁻¹): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona bacteriológica, 5; e glicose, 10. As células foram armazenadas em freezer a -80 °C.

2.3 Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar por explosão a vapor

O pré-tratamento por explosão a vapor foi realizado na Flosul-Indústria e Comércio de Madeiras, localizada em Capivari do Sul, RS. Para a realização do pré-

tratamento, utilizou-se um reator de aço inox com capacidade para 200 L, provido de sensores para o acompanhamento da pressão e da temperatura, além de válvulas de controle para entrada de vapor e sua subsequente descompressão. Ao reator, está acoplada uma caldeira geradora de vapor, um compressor de ar e um ciclone, empregado para descarga do material e escape de vapores. Foram introduzidos ao reator 12,2 kg de amostra de bagaço de cana-de-açúcar não tratado, com 12% de umidade (umidade natural), sendo empregada a temperatura de 200°C e tempo 8 min (Neves *et al.*, 2016).

O balanço de massa foi realizado para determinar a eficiência da condição empregada no pré-tratamento, a partir da diferença de massa da amostra, antes e depois do pré-tratamento, considerando-se a umidade da amostra.

2.4 Meios usados para o cultivo

Para o crescimento das células, foram utilizados meios com extrato de levedura, malte, peptona, glicose (YMPG) ou xilose (YMPX), composto por (em g.L⁻¹): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona bacteriológica, 5; e glicose, 18 ou xilose, 18. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min. As células de *S. cerevisiae* CAT-1 foram crescidas em meio YMPG e as células de *S. hagerdaliae* UFMG- CM Y303 foram crescidas em meio YMPX.

2.5 Avaliação da dinâmica do crescimento em placas

Para a avaliação da dinâmica de crescimento foi utilizado o meio WLN com modificações, contendo em g.L⁻¹: extrato de levedura, 4; triptona, 5; glicose, 50; ágar,

20; verde de bromocresol, 0,088. O meio também continha em sua formulação: solução de sais (50 mL.L^{-1}); carbonato de sódio (1% (m/v)) (35 mL.L^{-1}). A solução de sais foi composta em g.L^{-1} : fosfato monobásico de potássio, 11; cloreto de potássio, 8,5; cloreto de cálcio, 2,5; sulfato de magnésio, 0,05; cloreto férrico, 0,05; sulfato de manganês, 0,05. O meio foi preparado e autoclavado a 121°C por 15 min e 20 mL dispostos em placas de Petri. Um volume de 0,1 mL das amostras dos cultivos, previamente diluídos, foram espalhados na superfície das placas com alça de Drigalski, as quais foram incubadas em estufa de crescimento a 28°C por 72 h. Após esse período foi possível contar as colônias e, também, diferenciar as linhagens através da diferença de cor apresentada pelas colônias de cada linhagem.

2.6 Fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Inicialmente, realizou-se a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor, utilizando-se a concentração de 30 g.L^{-1} de bagaço. Os estudos foram realizados, inicialmente, em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com um volume total de 100 mL, incluindo bagaço de cana-de-açúcar (BCA), tampão citrato 50 mmol.L^{-1} pH 4,8, enzima comercial Celluclast® e suspensão celular. Os estudos foram conduzidos por hidrólise e fermentação simultâneas e hidrólise e fermentação separadas. As duas condições foram reproduzidas em biorreator de 10 L, com volume operacional de 5 L.

Para a determinação da quantidade de enzima, foram realizadas hidrólises em frascos de Duran de 50 mL, contendo 3% (m/v) de BCA e tampão citrato 50 mmol.L^{-1} pH 4,8, variando a carga enzimática entre 1 a 30 FPU.g^{-1} de BCA. Os testes foram conduzidos em triplicata, por um período de 72 h.

Foram realizados estudos prévios para a determinação da temperatura máxima de fermentação das linhagens usadas neste trabalho. A temperatura compatível para as duas linhagens foi de 30°C.

2.7 Sacarificação e fermentação separadas (SHF - *Separate Hydrolysis and Fermentation*)

O BCA pré-tratado por explosão a vapor foi hidrolisado por um período de 72 h usando o complexo enzimático Celluclast[®] da *Novozymes* (15 FPU.g⁻¹), em tampão citrato 50 mmol.L⁻¹ pH de 4,8 a 50 °C. Após esse período, a temperatura foi reduzida para 28°C, o pH ajustado para 4 e o hidrolisado suplementado com 0,1% (m/v) sulfato de amônio e 0,4% (m/v) de Crude yeast extract. A quantidade de células de *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. hagerdaliae* UFMG- CM-Y303 inoculadas foi de 1,5x10⁸ mL⁻¹ (totalizando 3,0x10⁸ mL⁻¹ células da cocultura) e o tempo de fermentação foi de 48 h, sendo as amostras coletadas em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 h.

2.8 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

Volumes de 5 L de misturas com 30 g.L⁻¹ de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor foram tratadas em autoclave a 100°C por 1 h. Ao bagaço tratado, foi adicionado 0,1% (m/v) de sulfato de amônio, 0,4% (m/v) Crude yeast extract, 15 FPU.g⁻¹ de enzima comercial Celluclast[®] e as leveduras. A quantidade de células de *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. hagerdaliae* UFMG- CM Y303 inoculadas foi de 1,5x10⁸ mL⁻¹ (totalizando 3x10⁸ mL⁻¹ células da cocultura) e o tempo de hidrólise e fermentação foi de 120 h, sendo as amostras coletadas em 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 e 120 h.

2.9 Métodos analíticos

2.9.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

2.9.1.1 Determinação de massa seca e cinzas de materiais celulósicos

Para a determinação da massa seca foi utilizado 1 g de amostra em cadinhos previamente pesados. Este material foi colocado em estufa a 105°C por 24 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador, pesado e a massa seca foi calculada em relação à massa seca do material original.

A determinação de cinzas foi realizada com 300 mg de bagaço acondicionados em cadinho de porcelana, previamente limpo, seco e tarado, sendo então calcinados em mufla a uma temperatura de 575°C por 2 h, segundo a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-TP-510-42621). O teor de cinzas foi determinado a partir da diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expresso em relação à quantidade de amostra inicial.

2.9.1.2 Determinação de extraíveis e composição química do substrato

O teor de compostos extraíveis do BCA foi determinado com o uso do extrator Tecnal TE-044-8/50, a partir de uma quantidade conhecida de amostra, empregando-se uma sequência de quatro solventes: diclorometano, etanol: tolueno 1:2 (v/v), etanol 95% (v/v) e água quente, seguindo as recomendações do relatório técnico NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.*, 2008b), com adaptações.

A composição do substrato utilizado foi realizada de acordo com o relatório técnico NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2011). Uma quantidade conhecida de amostra seca, livre de compostos extraíveis (300 mg), foi tratada com 1 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), a 25°C, por um período de 1h, sob agitação constante. Após este

tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave (118°C), por 1 h, para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch de porosidade 2 (30 mL), previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até massa constante e a porcentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra (Gomide & Demuner, 1986). O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para determinação da lignina solúvel em ácido, por espectrofotometria na luz ultravioleta (Dence, 1992).

A composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante. Alíquotas dos hidrolisados foram filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 20A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO20A e detectores modelos RID10A para índice de refração. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad®) a 60°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹, a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético), levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glicose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidro. Os resultados obtidos foram expressos em relação à massa seca do material original.

2.9.1.3 Determinação de proteínas totais, açúcares, etanol, xilitol, hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético

A análise de proteínas totais foi realizada pelo Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA), IB-UCS, de acordo com método Kjeldahl - AOAC INTERNATIONAL (2011).

Xilose, glicose, etanol e ácido acético foram analisados em HPLC (Shimadzu, Japão), usando detector de índice de refração equipado com coluna Aminex HPX-87 H (Bio- Rad Laboratories Ltd, USA). As condições da corrida foram: temperatura de 60°C; fluxo de 0,6 mL. min⁻¹, usando como fase móvel 5mmol.L⁻¹ de H₂SO₄. Já o HMF e furfural foram analisados usando o detector UV/visível equipado com coluna C18. As condições da corrida foram: temperatura de 30°C; fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, usando como fase móvel H₂O (0,1% ácido fórmico):Metanol (1% ácido fórmico), 90:10 (v/v).

2.10 Cálculos dos parâmetros cinéticos

Os rendimentos de produção de etanol ($Y_{P/S}$ g.g⁻¹) foram definidos como a razão entre a quantidade de etanol produzido e os açúcares totais consumidos.

2.11 Desenho experimental para o estudo do efeito de inibidores na produção de etanol por *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e cocultivo

Um desenho fatorial completo 2³, com cinco níveis codificados, totalizando 18 experimentos, foi realizado para verificar a influência dos inibidores furfural, HMF e ácido acético na produção de etanol. O planejamento foi realizado para as linhagens, individualmente e, também, para o cocultivo. Para o cálculo estatístico as variáveis foram codificadas de acordo com a Eq.(1):

$$xi = (Xi - Xo) / \Delta Xi$$

Eq. 1

Onde x_i é o valor da variável independente codificada, X_i é o valor real da variável independente, X_o é o valor real da variável independente em relação ao ponto central e ΔX_i é o valor de mudança. Os intervalos e os níveis das variáveis investigadas neste estudo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis do processo e níveis usados no desenho composto central para estudo de produção de etanol.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	0,80	0,16	0,16
2	+1	-1	-1	3,80	0,16	0,16
3	-1	+1	-1	0,80	0,64	0,16
4	+1	+1	-1	3,80	0,64	0,16
5	-1	-1	+1	0,80	0,16	0,64
6	+1	-1	+1	3,80	0,16	0,64
7	-1	+1	+1	0,80	0,64	0,64
8	+1	+1	+1	3,80	0,64	0,64
9	-1,68	0	0	0,00	0,40	0,00
10	+1,68	0	0	4,00	0,40	0,00
11	0	-1,68	0	2,00	0,00	0,00
12	0	+1,68	0	2,00	0,80	0,00
13	0	0	-1,68	2,00	0,00	0,00
14	0	0	+1,68	2,00	0,00	0,80
15	0	0	0	2,00	0,00	0,00
16	0	0	0	2,00	0,00	0,00
17	0	0	0	2,00	0,00	0,00
18	0	0	0	2,00	0,00	0,00

X₁ = ácido acético X₂ = Hidroximetilfurfural (HMF) X₃ = Furfural

O modelo quadrático para a predição do ponto ótimo foi expresso de acordo com a Eq. (2)

$$Yc = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde Yc é a variável de resposta, β_0 é a constante, β_i é o coeficiente para os efeitos lineares, β_{ii} é o coeficiente para os efeitos quadráticos, β_{ij} é o coeficiente para a interação dos efeitos $x_i x_j$ são os níveis codificados das variáveis X_i e X_j .

3. Resultados e Discussão

3.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço pré-tratado apresentou uma coloração marrom escuro, diferente do bagaço *in natura*, que possui uma cor levemente amarelada. Essa alteração de cor pode estar relacionada com a quebra química da lignina e extrativos durante o pré-tratamento (Sun *et al.*, 2005b). Do mesmo modo, essa coloração pode estar relacionada com os produtos de degradação de açúcares (caramelização), que são gerados em temperaturas elevadas do pré-tratamento.

Foram pré-tratados 12,2 kg de bagaço com umidade de 12% e, no final, obteve-se 18,5 kg de biomassa com umidade de 64%. É importante destacar que não houve formação de fração líquida, utilizando-se apenas a fração sólida, que apresentou um rendimento mássico de 90%. Neste caso, a biomassa perdida foi de 10%. Scholl *et al.* (2015) estudaram a melhor condição de pré-tratamento por explosão a vapor para o capim-elefante, sendo que a condição com maior rendimento de biomassa (85%) foi 190°C por 6 min e a condição com menor rendimento (71%) foi 190°C por 10 min. Os resultados obtidos com os parâmetros 190°C por 6 min assemelham-se aos resultados obtidos neste trabalho.

Os dados de caracterização do bagaço *in natura* e do bagaço pré-tratado por explosão a vapor estão apresentados na Tabela 2. A proporção de celulose e hemicelulose apresentou incremento no bagaço pré-tratado, o que pode ser explicado pela desestruturação da biomassa lignocelulósica, devido à ação da temperatura associada ao tempo e à liberação dos extraíveis. O teor de lignina total também aumentou, porque a quantidade de lignina solúvel detectada no bagaço pré-tratado foi maior. Em relação ao teor de proteínas, a quantidade encontrada no bagaço tratado foi inferior ao bagaço *in natura*. Em temperaturas superiores a 100°C, as proteínas podem ser desnaturadas e complexadas com outras substâncias, tais como lignina e celulose, o que inviabiliza sua remoção.

O teor de cinzas encontrados nos dois materiais foi inferior a 3% (Tabela 2). Esses resultados estão de acordo com estudos realizados com BCA por Oliveira *et al.* (2012), que determinou 2,4%, e com Silva *et al.* (2010), que obteve 2,8% em estudos com a palha da cana-de-açúcar.

Tabela 2. Composição química (em porcentagem) do bagaço *in natura* e pré-tratado por explosão a vapor.

Componente	Bagaço <i>in natura</i> (%)	Bagaço pré-tratado (%)
Rendimento	-	90,0
Celulose	35,4 ± 0,3	39,7 ± 0,4
Hemicelulose	5,3 ± 0,6	16,8 ± 4,0
Lignina total	23,2 ± 1,9	30,4 ± 3,0
Extraíveis	28,5 ± 0,1	-
Proteínas	1,15 ± 0,0	0,3 ± 0,2
Cinzas	0,9 ± 0,2	2,5 ± 0,6
Total	94,5	89,6 ±

Pelos dados apresentados, a cana-de-açúcar é um material lignocelulósico que pode ser utilizado para a produção de etanol 2G, sendo um recurso renovável e abundante. A indústria canieira gera muitos subprodutos, como: palha, melação,

bagaço, torta que fica no filtro e águas residuais (Gonçalves *et al.*, 2008). Em média, são gerados 140 kg de bagaço e 140 kg de palha a cada tonelada de cana processada. Ambos têm alto potencial para serem utilizados como matéria-prima para a produção de etanol 2G (Oliveira *et al.*, 2012).

3.2 Hidrólise e fermentação separadas

Os estudos de hidrólise e fermentação separadas foram conduzidos em biorreator. O BCA foi tratado termicamente a 100°C no biorreator para evitar contaminações ao longo do processo enzimático e fermentativo. Entre as cargas enzimáticas testadas, a que apresentou resultado superior foi de 15 FPU g⁻¹ (dados não apresentados).

A hidrólise foi conduzida por um período de 72 h e a fermentação por 48 h, totalizando 120 h. Na Figura 1, estão apresentados a produção de etanol e os consumos de glicose e xilose pela cocultura de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *S. cerevisiae* CAT-1 em processo SHF. No período de hidrólise, obteve-se uma quantidade total de açúcares redutores de 20 g.L⁻¹ (17 g.L⁻¹ de glicose e 3 g.L⁻¹ de xilose). A produção de etanol foi de 11 g.L⁻¹ com rendimento de 0,55 g.g⁻¹ e produtividade de 0,22 g.L⁻¹.h⁻¹. A conversão de açúcares em etanol superior a conversão teórica (0,51 g.g⁻¹) pode ser explicada pelo fato da enzima continuar atuando na etapa de fermentação, porque ao ser inoculada a levedura a enzima não foi desativada. É importante destacar que o bagaço pré-tratado não foi detoxificado, pois apresentou baixa concentração de inibidores, que foram determinados por HPLC. Os valores encontrados para HMF e furfural, para a concentração de biomassa usada neste estudo, foram de 0,5 g.L⁻¹ e 0,4 g.L⁻¹ respectivamente. Observou-se um valor relevante de ácido acético no hidrolisado - 1,8 g.L⁻¹.

Gupta *et al.* (2009) investigaram a produção de etanol por hidrólise e fermentação separadas de substrato lenhoso da algaroba, utilizando monoculturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Scherffersomyces (Pichia) stipitis*-NCIM 3498. Segundo os autores, foram realizadas as hidrólises ácida e enzimática, para avaliar qual dos métodos liberava maior quantidade de açúcares redutores, e obtiveram uma quantidade de 18,24 g.L⁻¹ com hidrólise ácida e 37,47 g.L⁻¹ com hidrólise enzimática. A máxima produção de etanol foi observada com o hidrolisado enzimático e a linhagem de *S. cerevisiae* (18,52 g.L⁻¹), com rendimento de 0,49 g.g⁻¹. Os autores usaram 10% de biomassa lignocelulósica, sendo que a composição química da algaroba apresenta maiores quantidades de celulose e hemicelulose quando comparadas ao bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho, por isso a quantidade de açúcares liberada foi maior.

Patle & Lal (2008) investigaram a produção de etanol a partir de hidrolisados de resíduos de frutas e vegetais, por coculturas de *Zymomonas mobilis* e *Candida tropicalis* e obtiveram um rendimento máximo de 0,45 g.g⁻¹ de etanol.

Segundo Taherzadeh & Karimi (2007), quando a concentração de celobiose chega a 6 g.L⁻¹, ela pode inibir as enzimas celulolíticas e diminuir sua atividade em até 60%, o que afeta negativamente a produção de etanol. Levando em conta conhecimentos como este, foi realizada também a hidrólise e fermentação simultâneas, que simula um processo de batelada alimentada, pois a celobiose vai sendo liberada aos poucos e não inibe a ação da enzima.

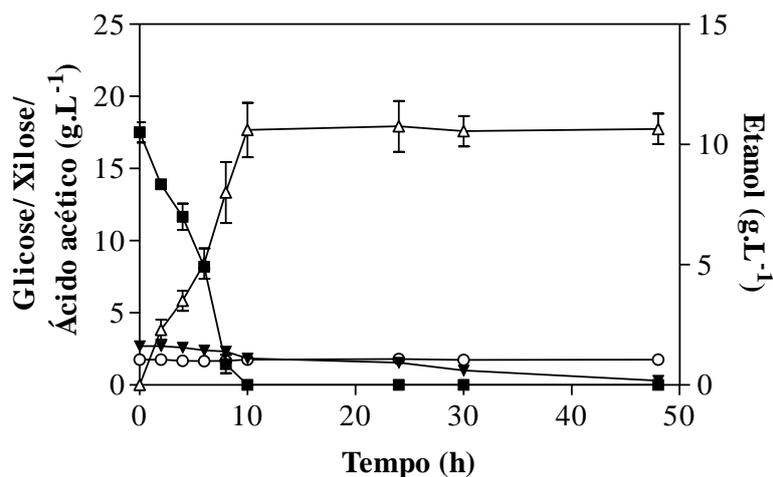


Figura 1. Produção de etanol e consumo de glicose e xilose por cocultura de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em processo de hidrólise e fermentação separadas. (Δ) Etanol, (■) glicose, (▼) xilose, (○) ácido acético.

3.3 Hidrólise e fermentação simultâneas

A produção de etanol e consumo de glicose e xilose por cocultura de *S. hagerdaliae* UFMG- CM Y303 e *S. cerevisiae* CAT-1 em processo SSF estão apresentados na Figura 2. Pode ser observado que a produção de etanol foi superior ao processo conduzido por SHF, atingindo uma produção de 15 g.L⁻¹. Quando se compara ao processo de SHF, verifica-se um aumento na produção de etanol de 27%.

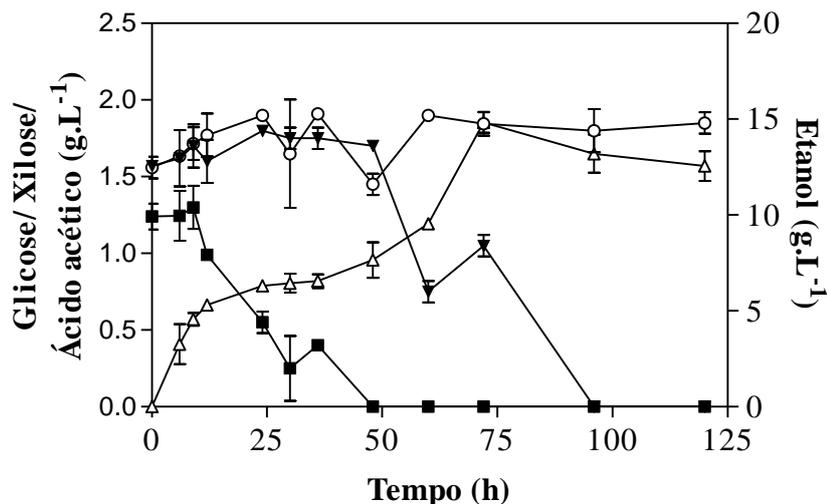


Figura 2. Conversão de glicose e xilose em etanol por cocultura de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em processo de hidrólise e fermentação simultâneas e avaliação da presença de ácido acético sob a fermentação. (Δ) Etanol, (\blacksquare) glicose, (\blacktriangledown) xilose, (\circ) ácido acético.

Os rendimentos de etanol superiores em SSF em relação à SHF podem ser explicados pelo fato de a glicose ser liberada e fermentada simultaneamente, não exercendo nenhuma atividade inibitória sobre a enzima (Olofsson *et al.*, 2008). Esse processo é um dos mais estudados devido a esta vantagem e, também, por ser um processo mais rápido. É importante destacar que, neste estudo, os dois métodos foram conduzidos em 120 h, apenas para comparar os processos.

Nos dois métodos de fermentação, a xilose foi totalmente consumida. No processo de SHF, o cultivo iniciou com $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose, chegando ao final com nenhum resquício de xilose. Importante destacar que a xilose só foi consumida depois que a glicose foi exaurida. Já no processo de SSF, a xilose foi sendo liberada e consumida concomitantemente com a glicose simulando um processo batelada alimentada.

Hickert *et al.* (2013a) investigaram a produção de etanol e xilitol por sacarificação e fermentação simultâneas de hidrolisado de casca de arroz não detoxificada por monocultura de *S. cerevisiae* ICV D254, por cocultura com *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 e, também, da cocultura entre as duas leveduras. Os autores obtiveram uma produção de 14,5 g.L⁻¹ de etanol e 3 g.L⁻¹ de xilitol quando o cocultivo foi utilizado. Esses resultados se assemelham aos obtidos neste trabalho, no entanto, Hickert *et al.*, (2013b) realizaram cultivos em menor escala (1,5 L), enquanto neste trabalho realizou-se um escalonamento para volumes de trabalho de 5 L.

3.4 Dinâmica de crescimento microbiano no cocultivo

A quantidade de células usadas como inóculo 3×10^8 células.mL⁻¹, neste estudo, foi determinada em estudos anteriores (dados não apresentados), através da otimização da quantidade de inóculo 3×10^8 células.mL⁻¹. Com essa concentração de células, admite-se baixo nível de crescimento e a existência de fermentação. Foram realizadas coletas durante o cultivo para monitorar a quantidade de colônias de cada linhagem (Figura 3).

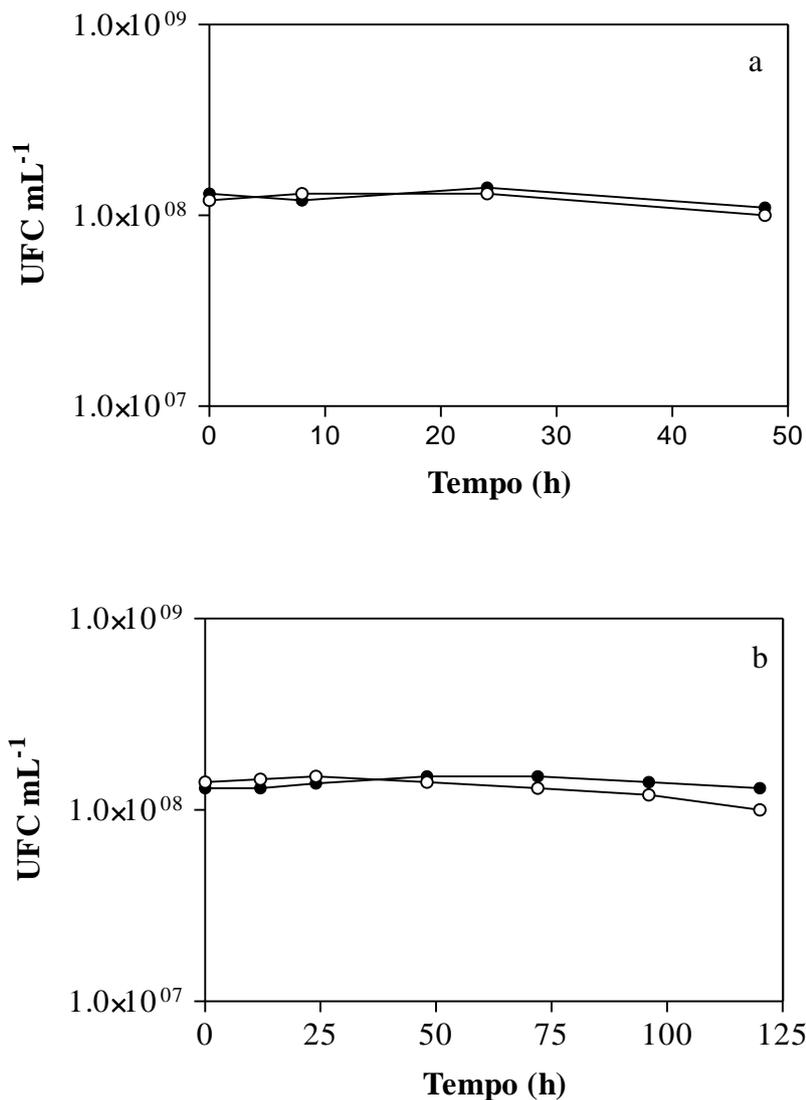


Figura 3. Perfil populacional na cocultura de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. (a) Hidrólise e fermentação separados. (b) Hidrólise e fermentação simultâneas. (●) *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (○) *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303.

Como pode ser observado na Figura 3, o emprego da metodologia proposta por Pasqual *et al.* (1990) para estudar a dinâmica de crescimento de leveduras na presença de leveduras *killer* pode ser aplicada com êxito no presente trabalho. Verifica-se que a concentração de células viáveis de ambas as linhagens manteve-se praticamente constante durante o processo fermentativo, indicando a não interferência entre as

linhagens e, ao mesmo tempo, sugerindo a conveniência do cocultivo de *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303.

Na literatura, não há trabalhos que descreva a dinâmica de crescimento de leveduras na produção de etanol 2G, o que limita a discussão deste tópico. No entanto, destaca-se a importância do desenvolvimento desta metodologia, que permite acompanhar a dinâmica populacional das leveduras em cocultura, que também pode detectar interferências da composição dos meios, uma vez que meios sintéticos possuem uma formulação diferente dos meios constituídos de hidrolisados, o que afeta o crescimento dos microrganismos.

3.5 Avaliação da influência dos inibidores na produção de etanol 2G

Como já mencionado neste trabalho, os compostos inibidores presentes no hidrolisado não afetaram a produção de etanol pelo fato da concentração determinada ter sido baixa. Com a finalidade de identificar as concentrações que afetam a produção de etanol, um planejamento experimental foi desenvolvido para cada monocultura e para o cocultivo, onde as concentrações de HMF e furfural variaram de 0,16 a 0,8 g.L⁻¹. Já a concentração de ácido acético variou de 0,8 a 4 g.L⁻¹ (Tabela 2).

Por meio do planejamento, foi possível observar que a linhagem de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 é bastante sensível à presença de inibidores, o que não acontece com a linhagem de *S. cerevisiae* CAT-1 e com o cocultivo. Observou-se que o componente que exerceu maior influência foi o ácido acético (Tabela 2).

Segundo Modig *et al.* (2002), compostos inibitórios como HMF e o furfural podem diminuir a atividade das enzimas aldeído desidrogenase, piruvato desidrogenase e álcool desidrogenase. Alguns autores relatam o uso de hidróxido de cálcio e carvão

ativado para a remoção de inibidores (Martinez *et al.*, 2000; Chandel *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2009).

Gupta *et al.* (2009) fizeram uso de hidróxido de cálcio seguido por adsorção com carvão ativado para a detoxificação do hidrolisado de madeira e observaram que a maioria dos compostos inibitórios foi removido, com exceção do ácido acético, que foi removido parcialmente. Taherzadeh *et al.* (2000) relatam que o ácido acético inibe a produção de etanol em concentrações superiores a 20 g.L⁻¹. No entanto, neste estudo, os resultados mostram que concentrações de ácido acético acima de 2 g.L⁻¹ inibem a produção de etanol por *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para as monoculturas e para o cocultivo. Concentrações de ácido acético superiores a 3,8 g.L⁻¹, combinadas a concentrações mais elevadas de HMF e furfural, inibem a produção de etanol, também, para *S. cerevisiae* CAT-1 e para a cocultura.

No caso do cocultivo, a alta significância dos efeitos lineares do ácido acético e do furfural e, também, dos efeitos da interação entre o ácido acético e o hidroximetilfurfural, indicam que estas variáveis interferem negativamente na produção de etanol. O modelo reduzido da equação polinomial de segunda ordem pode ser expresso conforme a Eq 3.

$$Y_1 = -1,496x_1 - 0,786x_3 + 0,368x_1 x_2 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde Y_1 representa o valor de concentração do etanol em função do ácido acético (x_1), furfural (x_3) e interação entre ácido acético (x_1) e hidroximetilfurfural (x_2).

ANOVA mostrou que o modelo foi altamente significativo ($p < 0,000007$), com $R^2 = 0,97$, o que significa que 97% da variação total é explicada pelo modelo. Isto

sugere uma representação satisfatória do modelo de processo e uma boa correlação entre os valores experimentais e os preditos.

O diagrama de Pareto foi usado para mostrar os efeitos dos inibidores estudados, suas interações e sua influência na produção de etanol. Este diagrama compreende um gráfico de barras horizontais que está associado aos efeitos de cada variável, individualmente, e suas interações, na qual o efeito é tão mais significativo quanto mais à direita da linha pontilhada estiver, no nível de significância de 95% de confiança, confirmando os resultados obtidos pela Figura 4.

O cálculo dos efeitos lineares e quadráticos indica o quanto deve ser grande o efeito para ter significado estatisticamente. Na Figura 4, é possível observar que as variáveis 1 e 3 linear tiveram efeitos significativos e, também, a interação entre as variáveis 1 e 2. Os efeitos quadráticos das variáveis não foram estatisticamente significativos. Verifica-se que o ácido acético é o inibidor que exerce maior influência.

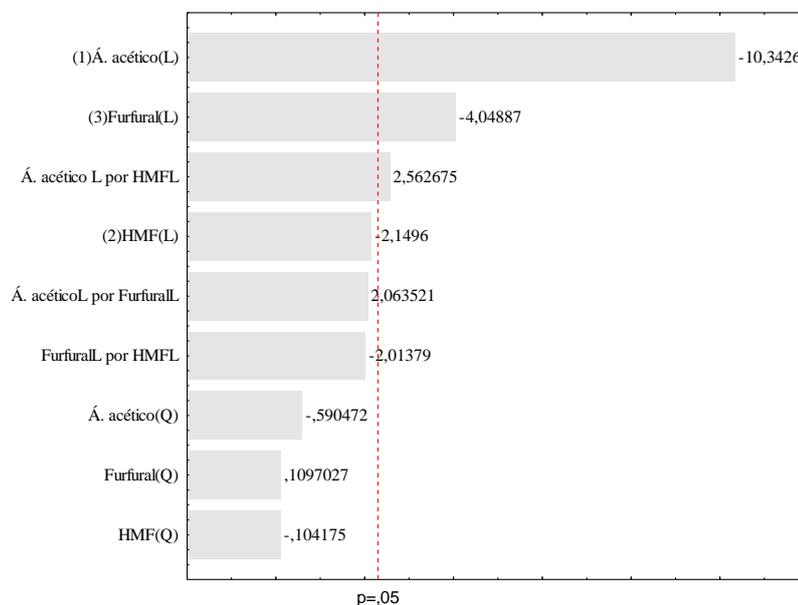


Figura 4. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis independentes: Ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural sobre a variável dependente: produção de etanol.

Tabela 3. Resultados de produção de etanol por *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 em diferentes concentrações de ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural.

Variáveis decodificadas			Etanol		
X ₁	X ₂	X ₃	<i>S. hagerdaliae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Cocultivo
0,80	0,16	0,16	1,20	5,25	3,80
3,80	0,16	0,16	0,00	0,00	0,00
0,80	0,64	0,16	0,00	3,76	3,32
3,80	0,64	0,16	0,00	0,00	0,10
0,80	0,16	0,64	0,00	3,70	3,75
3,80	0,16	0,64	0,00	0,00	0,00
0,80	0,64	0,64	0,00	2,94	1,20
3,80	0,64	0,64	0,00	0,00	0,00
0,00	0,40	0,00	0,90	3,64	4,75
4,00	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	0,00	0,00	0,00	3,28	3,21
2,00	0,80	0,00	0,00	1,52	3,29
2,00	0,00	0,00	0,00	3,46	3,46
2,00	0,00	0,80	0,00	1,61	1,87
2,00	0,00	0,00	0,00	3,16	3,26
2,00	0,00	0,00	0,00	3,28	3,21
2,00	0,00	0,00	0,00	3,23	3,32
2,00	0,00	0,00	0,00	3,22	3,28

X₁= Ácido acético X₂= Hidroximetilfurfural (HMF) X₃= Furfural

4. Conclusão

Os açúcares liberados da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar foram consumidos e há a produção de etanol em cocultura de *S. cerevisiae* CAT-1 e *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, tanto em hidrólise e fermentação separadas como em hidrólise e fermentação simultâneas. A produção de etanol obtida com o processo de cofermentação e hidrólise simultâneos são superiores aos resultados obtidos no processo de hidrólise e cofermentação separados. O cocultivo é promissor, pois há a conversão tanto da glicose quanto da xilose. A concentração de inibidores presentes no hidrolisado não afeta a produção de etanol, no entanto, estudos em meio sintético com concentrações superiores destes compostos mostram que eles são prejudiciais e interferem negativamente na produção de etanol.

5. Referências Bibliográficas

- Canilha, L.; Carvalho, W. ; Felipe, M.G.A.; Almeida e Silva, J.B.; Giuliatti, M. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Appl. Biotechnol.** 161: 84-92.
- Chandel, A.K.; Kapoor, R.K.; Singh, A.; Kuhad, R.C. (2007). Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresour. Technol.** 98: 1947-1950.
- De Bari, I.; De Canio, P.; Cuna, D.; Liuzzi, F.; Capece, A.; Romano, P. (2013). Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and cocultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **New Biotechnol.** 30: 591-597.
- Dence, C.W.; Lin, S.Y. (1992). Methods in lignin chemistry. New York. **Springer Verlag.**
- Dias, M.O.S.; Junqueira, T.L.; Cavalett, O.; Cunha, M.P.; Jesus, C.D.F.; Rossel, C.E. V.; Filho, R.M.; Bonomi, A. (2012). Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresour. Technol.** 103: 152-161.
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 108: 41-65.
- Gomide, J.L.; Demuner, B.J. (1986). Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. **O Papel.** 47: 36-38.
- Gonçalves, A.R.; Moriya, R.Y.; Oliveira, L.R.; Saad, M.B. (2008). Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. **Enzyme Microb. Technol.** 43: 157-163.

- Gupta, R.; Sharma, K.K.; Kuhad, R.C. (2009). Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites* - NCIM 3498. **Bioresour. Technol.** 100: 1214-1220.
- Hickert, L.R, Cunha-Pereira, F.; Souza-Cruz, P.B.; Rosa, C.A.; Ayub, M.A.Z. (2013) Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresour. Technol.** 131: 508-514.
- Karagöz, P.; Özkan, M. (2014) Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. **Bioresour. Technol.** 158: 286-293.
- Lopes, M.R.; Morais, C.G.; Kominek, J.; Cadete, R.M, Soares, M.A.; Uetanabaro, A.P.T.; Fonseca, C., Lachance, M.A.; Hittinger, C.T.; Rosa, C.A. (2016) Genomic analysis and d-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* 2 species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. 3 nov., and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **FEMS Yeast Res.** doi: 10.1093/femsyr/fow044.
- Martinez, A.; Rodriguez, M.E.; York, S.W.; Preston, J. F.; Ingram, L.O. (2000). Effects of Ca (OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicelluloses hydrolysates. **Biotechnol. Bioeng.** 69: 526-536.
- Modig, T.; Lidén, G.; Taherzadeh, M.J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem. J.** 363: 769-776.

- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Ndaba, B.; Chiyanzu, I.; Marx, S.; Obiero, G. (2014) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the co-fermentation of sweet sorghum bagasse hydrolysates pretreated under varying conditions. **Biomass. Bioenerg.** 71: 350-356.
- Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL (2011). EUA , 18^a edição, 4^a revisão. Método 2001.11.
- Oliveira, F.M.V.; Pinheiro, I.O. ; Souto-Maior, A.M.; Martin, C.; Gonçalves, A.R.; Rocha, G.J.M. (2012). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value added products. **Bioresour. Technol.** 130:168-173.
- Olofsson, K.; Bertilsson, M.; Lidén, G. (2008). A short review on SSF- an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol. Biofuels.** 1: 1-7.
- Pasqual, M.S.; Carrau-Bonomi, J.; Serafini, L.A.; Dillon, A.J.P. (1990). A simple method to detect killer yeast in industrial system. **J. Ferment. Bioeng.** 70: 180-181.
- Patle, S.; Lal, B. (2008). Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass. Bioenerg.** 32: 596-602.
- Paulová, L.; Patáková, P.; Branská, B.; Rychtera, M., Melzoch, K. (2014). Lignocellulosic ethanol: technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnol. Adv.** 33:1091-1107.

- Sarkar, N.; Ghosh, S.K.; Bonnerjee, S.; Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renew. Energ.** 37: 19-27.
- Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontanaa, R.C.; Filho, A.Z.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.; Camassola, M. (2015). Elephant grass (*Pennisetum purpureum schum.*) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Ind. Crop. Prod.** 70: 280-291.
- Silva, A. S.; Inoue, H.; Endo, T.; Yano, S.; Bon, E.P.S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresour. Technol.** 101: 7402-7409.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008a). Determination of ash in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42622. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008b). Determination of extractives in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. NREL/TP-510-42619. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sluiter, A.; Hames, b.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. (2011). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **National Renewable Energy Laboratory** - NREL/TP-510-42618. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Golden, CO.
- Sun, X.F.; Sun, R.C.; Geng, Z.C.; Fowler, P.; Baird, M. (2005). Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam- exploded wheat straw. **Carbohydr. Polym.** 60:15-26.
- Taherzadeh, M.J.; Karini, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic material: a review. **Bio. Resour.** 2: 472-499.

- Taherzadeh, M.J.; Gustafsson, L.; Niklasson, C.; Lidén, G. (2000). Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/ or acetic acid. **J. Biosci. Bioeng.** 90: 374-380.
- Taniguchi ,M.; Itaya, T.; Tohma, T.; Fujii, M. (1997). Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficiente mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.** 83: 364-370.

3.4. Artigo IV

Incremento no consumo de xilose e produção de etanol por um variante genético de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 obtido por mutagênese e seleção em 2-deoxiglicose

Este artigo descreve a seleção de variantes genéticos de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 obtidos por mutagênese através do uso de radiação ultravioleta (UV) e meio contendo xilose e 2-deoxiglicose. O variante genético selecionado em meio sintético também foi avaliado em fermentações contendo bagaço de cana-de açúcar (BCA) hidrolisado por complexo enzimático comercial de celulases.

Incremento no consumo de xilose e produção de etanol por um variante genético de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 obtido por mutagênese e seleção em 2-deoxiglicose

Fernanda Roberta Rech^a, Letícia Clara Formolo Fonseca^a, Roselei Claudete Fontana^a, Marli Camassola^a, Marco Antônio Záchia Ayub^b, Carlos A. Rosa^c, Aldo J. A Dillon^a

^a Enzymes and Biomass Laboratory, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil.

Phone / Fax: +55 54 3218 2149

^bBiotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cBiological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: fernandarec@gmail.com

Resumo

Lignocelulósicos, quando submetidos à hidrólise enzimática, liberam misturas de xilose e glicose. Para aumentar os rendimentos e viabilizar a produção de etanol 2G, é necessário um microrganismo capaz de fermentar concomitantemente estes açúcares. Neste estudo, foram selecionados variantes de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-

Y303 – uma levedura que fermenta glicose e xilose – para crescer em meio sintético contendo xilose e 2-deoxiglicose, após terem sido submetidos à mutagênese por radiação ultravioleta. Um variante denominado M13 foi selecionado por ter apresentado maior produção de etanol e foi submetido à pressão de seleção em meio contendo xilose e 2-deoxiglicose, gerando o clone que foi denominado M13B. A linhagem parental, o variante M13 e o clone M13B foram estudados quanto à fermentação de misturas de glicose e xilose em meio sintético, sendo que a linhagem parental e variante M13 foram submetidos à fermentação de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) hidrolisado enzimaticamente, sendo avaliado o consumo de xilose, glicose e a produção de etanol. O estudo em meio sintético formulado com misturas de glicose e xilose mostrou que M13 produziu cerca de 36% mais etanol do que o parental, enquanto o clone M13B, apresentou grande redução da produção de etanol e baixo consumo de glicose, mesmo em relação ao parental. O estudo no meio formulado com bagaço de cana-de-açúcar (BCA) pré-tratado por explosão a vapor e hidrolisado enzimaticamente corroborou a superioridade da linhagem M13, produzindo 68% mais etanol em relação à linhagem parental.

1. Introdução

A crescente preocupação com a mudança climática mundial, o esgotamento dos combustíveis fósseis e a alta demanda de energia tem estimulado o desenvolvimento de combustíveis alternativos, como o etanol proveniente de fontes amiláceas e sacarinas e, mais recentemente, o etanol 2G (Gupta. *et al.*, 2009). O etanol 2G é proveniente de resíduos agrícolas, como sabugo e palha do milho, casca de arroz, bagaço e palha de cana-de-açúcar, casca de soja, restos de madeira, entre outros, que são atualmente

descartados ou empregados em pequenas quantidades como fertilizantes (Dias *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2012).

No processo de produção do etanol 2G, que envolve o pré-tratamento da matéria-prima e a hidrólise enzimática, os dois açúcares majoritários presentes nos lignocelulósicos hidrolisados são a glicose e a xilose (Canilha *et al.*, 2010). No entanto, o microrganismo mais comumente usado para fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, metaboliza apenas glicose e não dispõe de sistemas enzimáticos para utilizar a xilose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Hande *et al.*, 2013). Portanto, um dos grandes problemas da produção de etanol 2G é a indisponibilidade de um microrganismo que fermente concomitantemente glicose e xilose (Chen, 2012).

Para a etapa fermentativa do processo de etanol 2G, uma alternativa que vem sendo estudada é o emprego de cocultivos, onde um microrganismo tradicional é usado para fermentar a glicose associado a outro para fermentar a xilose (Ashoor *et al.*, 2015). Também, esforços têm se concentrado no desenvolvimento de novos microrganismos utilizando engenharia metabólica (Ingrand & Dora, 1995; De Sales *et al.*, 2015).

Mesmo as leveduras com capacidade de fermentar xilose e glicose não utilizam os dois açúcares concomitantemente. Verifica-se que a utilização da xilose ocorre somente após o consumo da glicose (Cheng *et al.*, 2008). Um dos principais problemas é a limitação do transporte de xilose para dentro da célula, pois a absorção de xilose é mediada pelo mesmo sistema de transporte da glicose (Hamacher *et al.*, 2002). A limitação pode ocorrer devido ao sistema de transporte possuir menor afinidade pela xilose quando comparado à glicose e, também, devido à repressão catabólica que ocorre na presença de glicose (Kötter *et al.*, 1993; Eliasson *et al.*, 2000).

Uma alternativa para que o sistema de transporte aumente a absorção de xilose seria a redução da atividade da hexoquinase ou da glucoquinase, pois acumularia glicose

na célula. Sabe-se que a 2-deoxiglicose (2DOG), um análogo da glicose, que embora seja fosforilada a 2-DOG-6-fosfato (2-DOG-6-P) na célula, não é metabolizada, mas também não existe a metabolização de outros substratos que estejam presentes, levando a célula à morte. Entretanto, alguns variantes genéticos, espontâneos ou induzidos por agentes mutagênicos, conseguem metabolizar outros açúcares e crescer, mesmo na presença de 2-DOG (Martin *et al.*, 1977; Gancedo *et al.*, 1986; Sanz *et al.*, 1994). Kahar *et al.* (2011) isolaram mutantes em uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* com o uso de mutagênese e 2-DOG que apresentaram maior consumo de xilose, mesmo na presença de glicose. Deste modo, uma levedura que fermenta xilose poderia aumentar a quantidade de etanol proveniente de xilose, quando na presença de glicose, com um mutante que tivesse a absorção de xilose favorecida (Eliasson *et al.*, 2000).

Assim, o principal objetivo deste estudo foi selecionar células de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 com capacidade de crescer em meio sintético contendo xilose e 2-DOG, após terem sido submetidos à radiação ultravioleta. Posteriormente, o variante genético selecionado foi submetido à pressão de seleção e crescido em meio sintético e, também, em meio com hidrolisado de BCA, para avaliar o consumo de ambos os açúcares e a produção de etanol.

2. Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos e manutenção das células

A linhagem de levedura usada neste trabalho, *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, da Universidade Federal de Minas Gerais. A linhagem foi isolada de amostras de madeira em decomposição no Patrimônio Natural Reserva de Serra Bonita. As culturas estoque foram mantidas em 20% de glicerol após crescimento e 80% de suspensão celular crescida em meio

contendo (em g.L⁻¹): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona bacteriológica, 5; e xilose, 10. As células foram armazenadas em glicerol em freezer a -80 °C.

2.2 Meio usado para o cultivo

Para o crescimento das células, foi utilizado meio-YMPX, composto por (em g.L⁻¹): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona bacteriológica, 5; e xilose, 20. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Para o teste de linhagens obtidas a partir da mutagênese, foi usado o meio YPMX, com adição de 20 g.L⁻¹ glicose (YPMXG).

2.3 Mutagênese com luz ultravioleta (UV)

As células de levedura foram crescidas em 5 mL de meio YMPX, em frascos Erlenmeyers de 25 mL, em *shaker* por um período de 24 h, agitação de 180 rpm e 28°C. Após o cultivo, 1 mL de suspensão celular foi misturada a 19 mL de água esterilizada numa placa de Petri com diâmetro de 13 cm. A suspensão foi exposta a luz UV, mantendo uma distância de 50 cm, por um período de 15 min. Em seguida, foram coletados 100 µL de suspensão celular e espalhados em meio sólido YMPX com adição de 0,5% (m/v) de 2-deoxiglicose. O crescimento microbiano ocorreu na ausência de luz.

2.4 Seleção de mutantes em 2-DOG e cultivo em meio com glicose e xilose

Vinte e uma colônias cresceram no meio contendo 2-deoxiglicose e xilose e foram repicadas separadamente em novas placas contendo o meio YMPX. As colônias foram crescidas por um período de 96 h, em estufa a 28°C. Em seguida, foram repicadas para novas placas. O processo se repetiu por sete gerações. Cada linhagem obtida foi testada em meio líquido YMPGX. Os cultivos foram realizados por um período de 72 h, em frascos Duran de 50 mL, contendo 10 mL de meio, em *shaker* em temperatura de 28

°C. Após 72 h foram avaliados os consumos de glicose e xilose e a produção de etanol dos 21 variantes e do parental. O variante que apresentou os resultados mais promissores em relação ao consumo de xilose e à produção de etanol foi selecionado para o processo de pressão de seleção.

2.5 Pressão de seleção

A linhagem M13 foi cultivada em meio YMPX com adição de 0,5% (m/v) de 2-deoxiglicose. A colônia que apresentou maior crescimento após 96 h foi repicada em um novo meio contendo YMPX com adição de 0,75% de 2-deoxiglicose; novamente, a colônia que mais cresceu, após 96 h, foi repicada em um meio contendo YMPX com adição de 1% (m/v) de 2-deoxiglicose. Após esse procedimento, a colônia que apresentou maior crescimento foi repicada por sete gerações em meio YPMX para estabilização da célula.

Ao final do processo, cultivos foram realizados em meio líquido YMPGX, comparando os clones selecionados e o parental. Os cultivos foram realizados por um período de 72 h, em frascos Duran de 50 mL, contendo 10 mL de meio, em *shaker* a 28°C.

2.6 Cultivo em meio formulado com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado

O BCA pré-tratado por explosão a vapor foi hidrolisado por um período de 72 h, em frascos Erlenmeyers de 250 mL com um volume total de 100 mL, incluindo o BCA (30 g.L⁻¹), o tampão citrato 50 mmol. L⁻¹ pH 4,8, a enzima e Celluclast[®] da *Novozymes* (15 FPU.g⁻¹) e o inóculo. Estes foram mantidos a 50°C. Após esse período, a temperatura foi reduzida para 28°C, o pH ajustado para 4 e o BCA hidrolisado foi suplementado com 0,1% (m/v) sulfato de amônio e 0,4% (m/v) de Crude yeast extract.

Inoculou-se 1×10^8 mL⁻¹ células de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e o tempo de fermentação foi de 72 h.

2.7 Determinação de açúcares e etanol

A xilose, a glicose e o etanol foram analisados em HPLC (Shimadzu, Japão), usando detector de índice de refração equipado com coluna Aminex HPX-87 H (Bio-Rad Laboratories Ltd, USA). As condições da corrida foram: temperatura de 60°C, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ usando como fase móvel 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄.

2.8 Cálculos dos parâmetros cinéticos

Os rendimentos de produção de etanol ($Y_{P/S}$ g.g⁻¹) foram definidos como a razão entre a quantidade de etanol produzido e os açúcares totais consumidos.

3. Resultados e Discussão

A partir da mutagênese e seleção em meio contendo 0,5% (m/v) de 2-deoxiglicose foram selecionados 21 colônias variantes. Essas colônias foram repicadas por sete gerações para estabilização. Os variantes foram identificados como: M1 a M21. Ao final da estabilização, as “novas” linhagens foram cultivadas em meio líquido e comparadas com a linhagem parental. Os resultados são plotados na Figura 1, onde se observa que a linhagem que se destacou em relação ao parental foi M13. Enquanto o parental produziu 2,4 g.L⁻¹ de etanol, a linhagem M13 produziu 3,4 g.L⁻¹, o que representa um aumento de 41%.

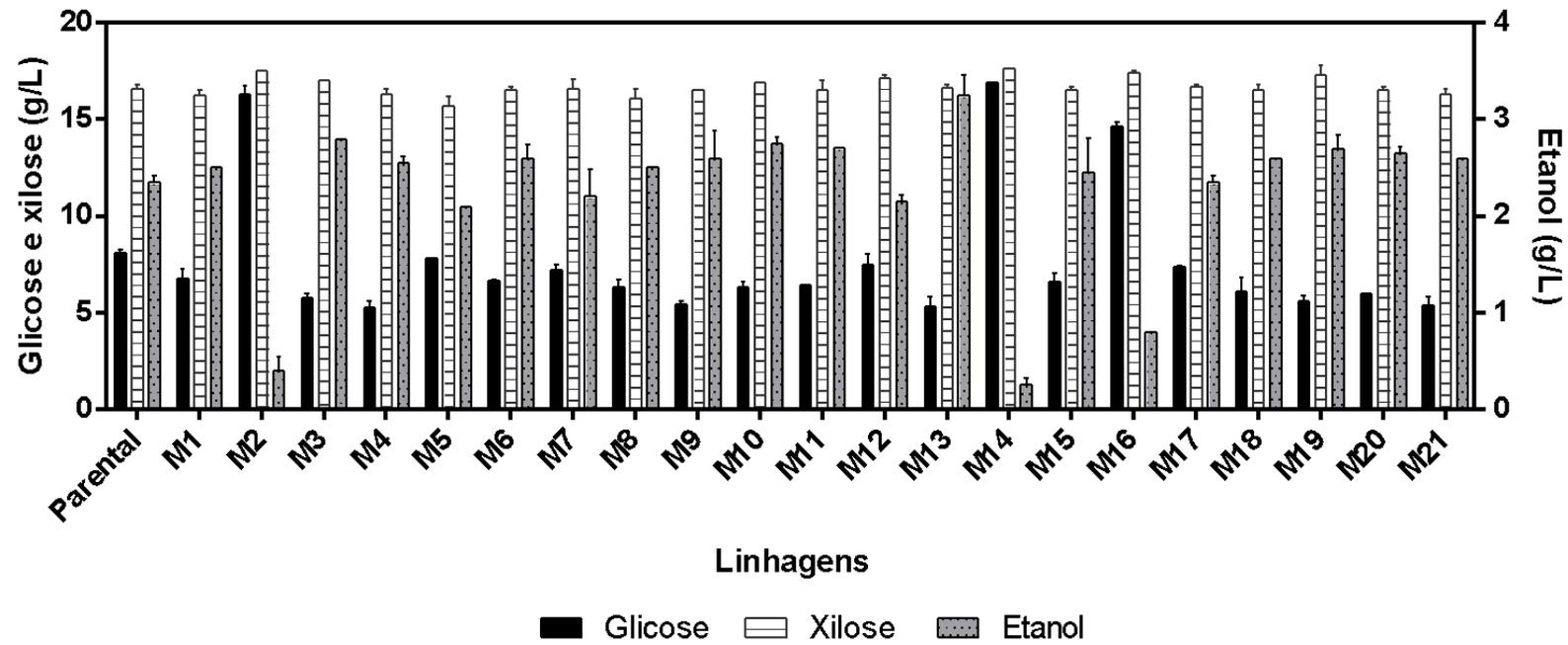


Figura 1. Concentrações de açúcares (glicose e xilose) e de etanol em cultivos de *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e linhagens variantes obtidas por indução de mutação por luz ultravioleta após 72 h de cultivo.

O emprego de mutagênese e seleção em 2-DOG gerou variação entre clones para consumo de glicose e xilose, como observado por Kahar *et al.* (2011), que trataram células de *S. cerevisiae* com metanosulfonato de etila e seleção em 2-DOG e obtiveram nove mutantes para aumento da capacidade de absorção de xilose. Um clone, denominado M2, foi o que apresentou melhores resultados quando comparado à linhagem parental, pois apresentou uma absorção de xilose quatro vezes maior do que a linhagem selvagem. A metabolômica mostrou maior atividade na via das pentoses fosfato dos mutantes e, segundo os autores, foi o primeiro trabalho a verificar que o uso de técnicas de mutação podem aumentar a absorção de xilose.

A linhagem M13 foi escolhida para as etapas posteriores do estudo e foi submetida a novo processo de pressão de seleção com 2-DOG. Após os sucessivos cultivos em placas e estabilização das células, foram realizados cultivos comparando a linhagem parental, a linhagem M13 e a nova linhagem M13B. Os resultados estão apresentados na Figura 2. Enquanto o parental produziu 3,8 g.L⁻¹ de etanol, a linhagem M13 produziu 5,2 g.L⁻¹. Já a linhagem M13B, a qual foi submetida à pressão de seleção, produziu 0,8 g.L⁻¹ de etanol.

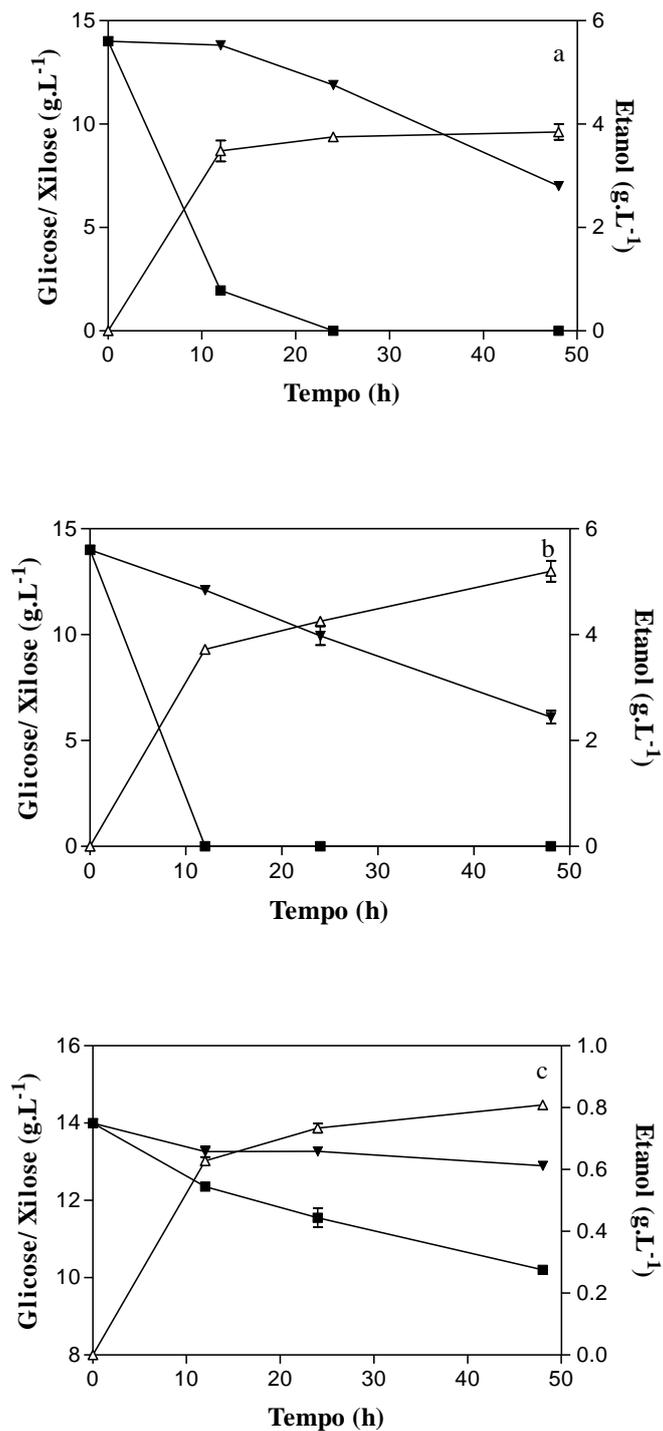


Figura 2. Produção de etanol e consumo de xilose e glicose por (a) *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 (b) M13 (c) M13B. Glicose (■); xilose (▼); etanol (Δ). Os resultados são apresentados como médias das duplicatas.

Os dados apresentados na Figura 2, assim como os apresentados na Figura 1, demonstram claramente que a mutagênese e seleção em meio com 2-DOG produziu variação na linhagem *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 tanto na fisiologia de consumo de glicose e xilose como na produção de etanol. A linhagem M13 mostrou consumo mais rápido de glicose em relação à linhagem parental e também maior consumo de xilose nas primeiras vinte horas, com conseqüente maior produção de etanol em relação ao parental, chegando a um aumento de 41%.

O maior consumo de xilose da linhagem M13 pode ser explicado tanto pelo consumo mais rápido de glicose, fazendo com que o consumo de xilose ocorresse mais precocemente ou, alternativamente, pode indicar que o consumo de xilose iniciou-se ainda na presença de glicose no meio, o que está de acordo com o objetivo do trabalho no isolamento de mutantes que crescem em xilose na presença de 2-DOG. Segundo Sanz *et al.* (1994), células resistentes a 2-DOG não apresentam repressão catabólica e podem consumir concomitantemente glicose e xilose. As alterações sofridas na linhagem M13 precisam ser esclarecidas e estudos de genômica precisam ser realizados para justificar os resultados, mas os dados obtidos neste estudo posicionam a linhagem M13 como uma linhagem melhorada para a produção de etanol em meios constituídos de glicose e de xilose. Estudos da rota metabólica podem esclarecer as modificações causadas durante a mutagênese comparando a linhagem parental com a M13, tal como observaram Flipphi *et al.* (2003), em *Aspergillus nidulans*, em que resistentes parciais para 2-DOG tratavam-se de mutantes para a enzima hexoquinase, enquanto que a mutação obtida para a enzima glucoquinase, referente à repressão catabólica, diminuiu o metabolismo de algumas substâncias, acarretando deficiências nutricionais.

Embora o variante M13B tenha diminuído consideravelmente a quantidade de etanol liberado em relação à linhagem parental, trata-se de uma linhagem interessante

para ser trabalhada, em vista de ter apresentado diminuição relevante no consumo de glicose, no entanto, apresentou consumo de xilose já nas primeiras 20 h.

Foram, também, realizados cultivos com a linhagem parental e a linhagem M13 em meio com BCA hidrolisado pré-tratado por explosão a vapor (Figura 3). Observa-se que os dados de produção de etanol apresentam pequenos valores de desvios e permitem afirmar que os níveis de 3,2 g.L⁻¹ apresentados pelo variante M13 são superiores em 68% em relação aos valores (1,9 g.L⁻¹) da linhagem parental de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303.

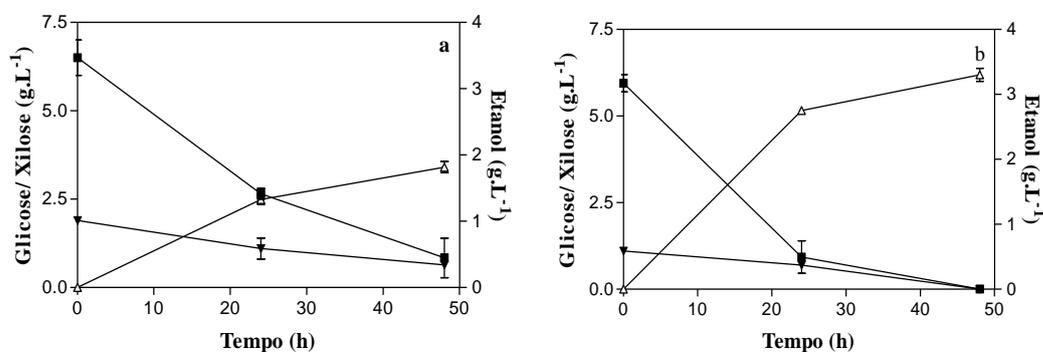


Figura 3. Produção de etanol e consumos de xilose e glicose em meio com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado por processo de sacarificação e fermentação separados conduzidos em microaerofilia. (a) *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303. (b) M13. Glicose (■); xilose (▼); etanol (Δ). Os resultados são apresentados como médias das duplicatas.

Os dados de cultivo em meio contendo BCA hidrolisado (Figura 3) indicam que a linhagem variante M13, proveniente de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, trata-se de uma linhagem que pode ter importância tecnológica para aplicação em processos de fermentação de hidrolisados enzimáticos de BCA ou de outros lignocelulósicos

hidrolisados, visto que, nas condições do estudo realizado, houve o consumo total da glicose e da xilose antes de 50 h de cultivo.

4. Conclusão

A fermentação de todos os açúcares liberados na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar é um requisito para o aumento dos rendimentos de biomassa em etanol e, também, para tornar a produção de etanol 2G economicamente viável. No presente trabalho, mostrou-se que acréscimos no rendimento de etanol podem ser obtidos via alteração genética de linhagens envolvendo estratégias de mutagênese e seleção em 2-DOG para crescimento. Um variante genético (M13) de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 mostrou aumentos de rendimentos de etanol com o consumo de todos os açúcares liberados de BCA hidrolisados enzimaticamente, sendo, portanto, relevante entender a causa das variações observadas na linhagem M13, utilizando estudos de secretômica e metabolômica.

5. Referências Bibliográficas

- Alexandrino, N. (2012). Melhoramento de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Ashoor, S.; Comitini, F.; Ciani, M. (2015). Cell-recycle batch process of *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* co-culture for second generation bioethanol production. **Biotechnol. Lett.** 37: 2213-2218.

- Canilha, L.; Milagres, A.M.F.; Silva, S.S.; Silva, J. B. A.; Felipe, M.G.A.; Rocha, G.J.M.; Ferraz, A.; Carvalho, W. (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Rev. Analytica**. 44: 48-54.
- Chen, W.H.; Xu, Y.Y.; Hwang, W.S.; Wang, J.B. (2012). Pretreatment of rice straw using an extrusion building/extraction process taa bench-scale for producing cellulosic ethanol. **Bioresour. Technol.** 102: 10451-10458.
- Cheng, K.K.; Cai, B.Y.; Zhang, J.A.; Ling, H.Z.; Zhou, Y.J.; Ge J.P.; Xu, J.M. (2008). Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochem. Eng. J.** 38: 105-109.
- de Sales, B.B.; Scheid, B.; Gonçalves, D.L.; Knychala, M.M.; Matsushika, A.; Elba P. S. Bom, E.P.S.; Stambuck, B.U. (2015). Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.** 37: 1973-1982.
- Dias, M.; Junqueira, T.; Cavalett, O.; Cunha, M.; Jesus, C.; Rossell, C. (2012). Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugar cane bagasse and trash. **Bioresour. Technol.** 103: 52–61.
- Eliasson, A.; Christensson, C.; Wahlbom, C.F.; Hahn-Hägerdal, B. (2000). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3381-3386.
- Flipphi, M.; van de Vondervoort, P.J.I.; Ruijter, G.J.G.; Visser, J.; Arst, Jr.H.N.; Felenbok, B. (2003). Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. **J. Biol. Chem.** 278: 11849-11857.

- Gancedo, J.M; Gancedo, C. (1986). Catabolite repression mutants of yeast, *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 179–187.
- Gupta, R.; Sharma, K.K.; Kuhad, R.C. (2009). Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresour. Technol.* 100: 1214-1220.
- Hahn-Hägerdal, B.; Berner, S.; Skoog, K. (1986). Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* using respiratory inhibitor azide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 287-293.
- Hamacher, T.; Becker, J.; Gárdonyi, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Boles, E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiol.* 148:2783–2788.
- Hande, A.; Mahajan, S.; Prabhune, A., (2013). Evaluation of ethanol production by the new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Ann. Microbiol.* 63: 63-70.
- Kahar, P.; Taku, K.; Tanaka, S. (2011). Enhancement of xylose uptake in 2-deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 111: 257-263.
- Kötter, P.; Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 776-783.
- Martin, M.; Heredia, C.F. (1977). Characterization of a phosphatase specific for 2-deoxyglucose-6-phosphate in a yeast mutant. *FEBS Lett.* 83: 245-248.
- Prakash, L.; Sherman, F. (1973). Mutagenic specificity: Reversion of iso-1-cytochrome C mutants of yeast. *J. Mol. Biol.* 79: 65-82.

- Sanz, P.; Randez-Gil, F.; Prieto, J. A. (1994). Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast, **Yeast**. 10: 1195-1202.
- Sarkar, N.; Ghosh, S.K.; Bonnerjee, S.; Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renew .Energ**. 37: 19-27.
- Winston, F. (2008). EMS and UV Mutagenesis in yeast. **Curr. Protoc. Mol. Biol**. DOI: 10.1002/0471142727.mb1303bs82.

4. DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, microrganismos não convencionais foram utilizados com a finalidade de verificar seu potencial para fermentação de xilose, conforme relatos existentes na literatura, resultando em dados que constituíram quatro artigos. Um resumo dos principais resultados obtidos na realização do presente trabalho está apresentado na Tabela 3.

O *screening* realizado em condições aeróbias e anaeróbias resultou na seleção da levedura *Spathaspora hagerdaliae*, devido ao seu potencial para fermentação de pentoses. Cultivos realizados em frascos, sob condições aeróbias e microaerofílicas em meios constituídos por diferentes substratos, indicaram que *S. hagerdaliae* tem um desempenho superior para produção de etanol em condições microaerofílicas e pH controlado em 5,0, no decorrer do cultivo.

Nos cocultivos realizados com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303, esta última foi hábil em fermentar xilose em pH 4,0, inferior ao ótimo da monocultura (pH 5,0). Foi possível avaliar a dinâmica de crescimento das duas linhagens através do uso de meio diferencial WLN, o que possibilitou analisar o comportamento dos microrganismos durante o processo fermentativo. Diferentes estratégias de inóculo mostraram que *S. cerevisiae* CAT-1 tem uma predominância no crescimento na fermentação quando a quantidade inicial de células das duas linhagens é igual.

O cocultivo entre as duas leveduras apresentou resultados relevantes para a fermentação de BCA hidrolisados conduzidos sob diferentes processos (SHF e SSF). Em SSF, foram observados valores de produção de etanol próximos à conversão teórica. Já nos cultivos conduzidos em SHF foram observados valores de produção de etanol inferiores ao processo SSF. O bagaço pré-tratado não foi previamente detoxificado,

devido à baixa quantidade de inibidores presentes. Deste modo, um planejamento experimental foi realizado com a finalidade de determinar as quantidades limites de substâncias inibitórias (ácido acético, HMF e furfural), capazes de interferir na produção de etanol no cocultivo. Observou-se que a combinação das três substâncias - ácido acético, HMF e furfural - em quantidades superiores a 3,8 (g.L⁻¹), 0,64 (g.L⁻¹) e 0,64 (g.L⁻¹), respectivamente, prejudicam a produção de etanol em meio sintético.

Além da presença de inibidores nos meios constituídos de BCA hidrolisado, existe o problema da repressão catabólica, exercida pela presença de glicose. O variante genético M13 foi obtido da linhagem *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 a partir da seleção em meio com 2-deoxiglicose e mutação com luz ultravioleta (UV). Após a estabilização das células, o variante foi utilizado para a fermentação de BCA hidrolisado apresentou resultados de produção de etanol superiores à linhagem parental, de 3,2 e 1,9 g.L⁻¹, respectivamente.

Tabela 3. Resumo dos principais resultados obtidos na realização deste trabalho.

Artigo	Linhagem	Condição	Substrato	Conc. Etanol (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
1	<i>Spathaspora hagerdaliae</i> UFMG-CM-Y303	Aeróbia em frasco	Xilose	3,8	0,18	0,31	
			Glicose	2,7	0,15	0,14	
			Xilose/glicose	4,3	0,25	0,23	
		Microaerofílica em frasco	Xilose	3,4	0,33	0,14	
			Glicose	5,6	0,28	0,24	
			Xilose/glicose	5,8	0,39	0,25	
			Microaerofílica em biorreator - pH livre	Xilose/glicose	6,7	0,26	0,28
			Microaerofílica em biorreator - pH 5,0	Xilose/glicose	9,5	0,31	0,39
Microaerofílica em biorreator - pH 5,0	BCA hidrolisado*	5,7	0,47	0,24			
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	Aeróbia em frasco	Glicose	4,3	0,26	0,28	
			Xilose/glicose	2,2	0,24	0,14	
		Microaerofílica em frasco	Glicose	4,4	0,27	0,30	
			Xilose/glicose	2,5	0,35	0,17	
			Cocultivo	Microaerofílica em biorreator - pH livre	Xilose/glicose	4,9	0,28
Microaerofílica em biorreator - pH 4,0	Xilose/glicose	8,2		0,48	0,34		
3	Cocultivo	Microaerofílica em biorreator - pH livre (SHF*)	BCA hidrolisado*	11	0,55	0,22	
		Microaerofílica em biorreator - pH livre (SSF*)	BCA hidrolisado*	15		0,13	
4	<i>Spathaspora hagerdaliae</i> M13	Microaerofílica em frasco	Xilose/glicose	3,8	0,18	0,08	
		Microaerofílica em frasco	Xilose/glicose	5,2	0,24	0,11	
		Microaerofílica em frasco	BCA hidrolisado*	1,9	0,32	0,04	
		Microaerofílica em frasco	BCA hidrolisado*	3,2	0,48	0,07	

*BCA: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor *SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas *SHF: Hidrólise e fermentação separada

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho, nas condições testadas, possibilitam concluir que:

- *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 converte xilose a etanol;
- condições microaerófilas favorecem a produção de etanol, enquanto condições aeróbias favorecem a produção de biomassa para as linhagens *Meyrozyma guilliermondii*-2 ITF, *Meyrozyma guilliermondii*-1 ATM, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-43-2, *Kluyveromyces marxianus* UFMG-HB63-b;
- a otimização dos parâmetros de pH e quantidade de inóculo favorecem a produção de etanol;
- os cultivos em biorreatores com pH do meio controlado aumentam o rendimento de etanol quando comparados aos cultivos com pH livre;
- o meio WLN possibilita a diferenciação das linhagens e é uma ferramenta importante para estudar a dinâmica de crescimento das leveduras em cocultivos;
- a combinação entre *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 e *S. cerevisiae* CAT-1 aumenta a produção de etanol em meio sintético contendo glicose e xilose;
- o processo de fermentação conduzido por SSF é mais eficiente do que o processo conduzido por SHF;
- a quantidade de substâncias inibitórias em meio sintético, simulando meios de hidrolisados, afeta a produção de etanol;
- acréscimos no rendimento de etanol são obtidos via alteração genética de linhagens envolvendo estratégias de mutagênese e seleção em 2-DOG para crescimento;
- o variante genético (M13) de *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 mostra aumentos de rendimentos de etanol com o consumo de praticamente todos os açúcares em meio sintético e no meio com BCA hidrolisado;

- a linhagem M13B apresentou diminuição da produção de etanol após ser submetida à pressão de seleção.

Em conclusão, os estudos realizados neste trabalho, demonstraram que *S. hagerdaliae* UFMG-CM-Y303 é uma levedura promissora para a fermentação concomitante de hexoses e glicose, o que contribui para a produção de etanol de 2G. Também pode-se observar que o processo fermentativo conduzido por SSF usando cocultura resultou em concentrações de etanol superiores ao processo conduzido por SHF. Diferentes estratégias de inóculo possibilitaram avaliar a dinâmica de crescimento da cocultura durante a fermentação. Enfim, os resultados obtidos são importantes porque contribuem com o aprimoramento e desenvolvimento da tecnologia de produção do etanol 2G.

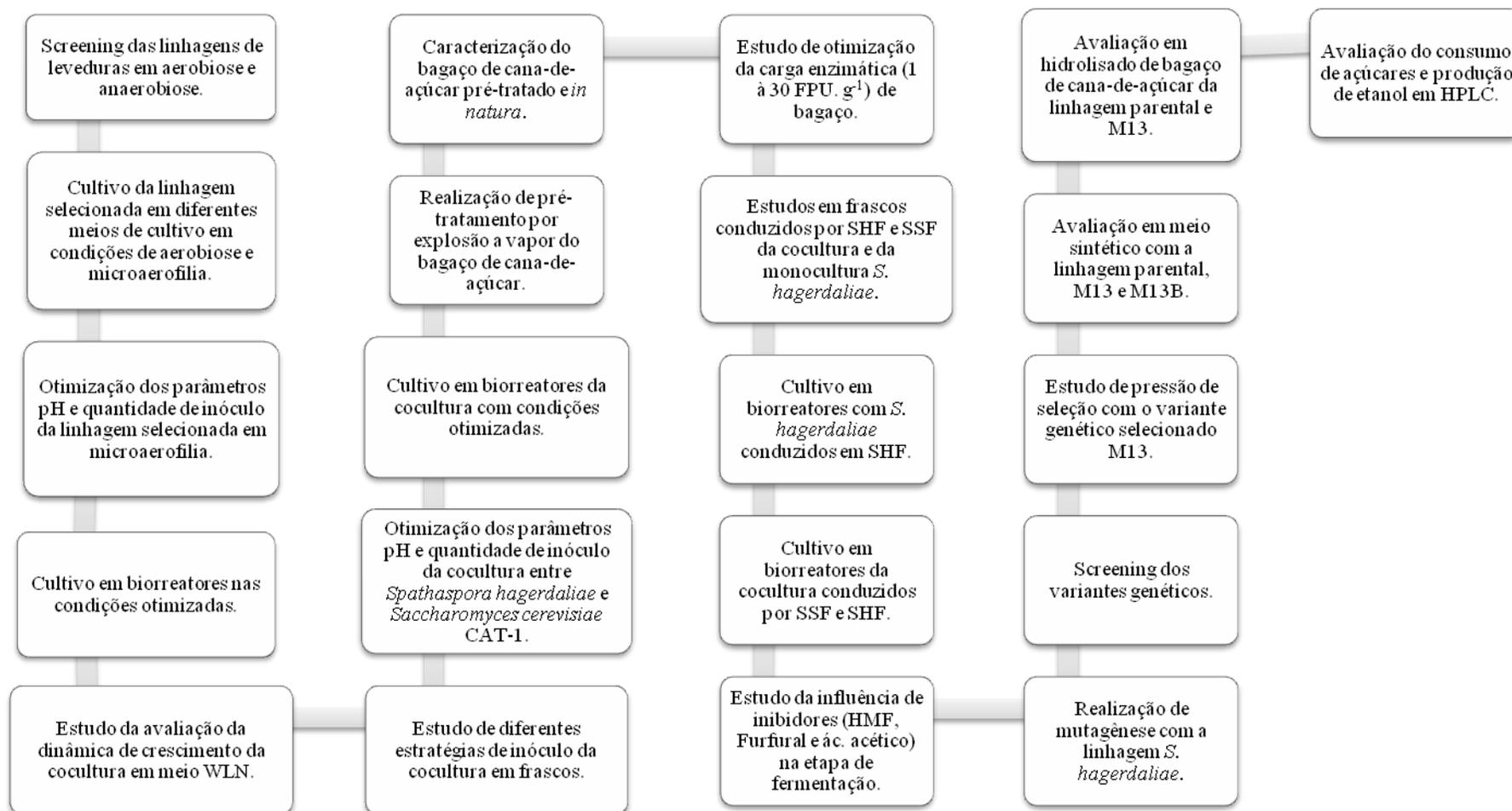
6. PERSPECTIVAS

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, verificaram-se algumas oportunidades para o aprimoramento e continuidade do projeto desenvolvido. Assim, algumas sugestões de trabalhos futuros incluem:

- avaliar a dinâmica de crescimento do cocultivo em biorreatores utilizando diferentes proporções de inóculo;
- realizar cocultivos com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisados enzimaticamente, com aumento de escala;
- avaliar a tolerância ao etanol da linhagem *Spathaspora hagerdaliae* e do variante genético M13;
- aplicar o cocultivo em capim-elefante e outros lignocelulósicos hidrolisados enzimaticamente, avaliando a dinâmica de crescimento das linhagens;
- realizar estudos de genômica com as linhagens M13 e M13B, com a finalidade de observar as mudanças ocorridas na sequência do genoma dos variantes;
- realizar cultivos em batelada alimentada com a finalidade de avaliar a inibição pelo substrato sob a linhagem *Spathaspora hagerdaliae*;
- aplicar o variante genético em estudos de cocultura em meios formulados com bagaço de cana-de-açúcar e capim-elefante hidrolisados enzimaticamente, além de avaliar a dinâmica de crescimento dessa nova linhagem.

7. ANEXO I

Resumo de materiais e métodos



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D.B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnol. Adv.** 29: 675-685.
- Aguiar Jr. W.B.; Faria, L.F.F.; Couto, M.A.P.G.; Araujo, O.Q.F.; Pereira Jr. N. (2002). Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from d-xylose by *C. guilliermondii*. **Biochem. Eng. J.** 12: 49-59.
- Allen, S.G.; Schulman, D.; Laser, M.; Lichwa, J.; Antal, Jr.; Lynd, L.R. (2001). A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Ind. Eng. Chem. Res.** 40: 2934-2941.
- Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour. Technol.** 101: 4851-4861.
- Alexandrino, N. (2012). Melhoria de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Alvez, D.M.G. (1994). Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Brasil.
- Arantes, V., Saddler, J.N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnol. Biofuels.** 4: 1-11.
- Arruda, P.V.; Felipe, M.G.A. (2009). Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Curr. Microbiol.** 58: 274-278.
- Balat, M.; Balat, H.; Oz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. **Prog. Energy. Combust. Sci.** 34: 551-573.
- Bals, B.; Rogers, C.; Jin, M.; Balan, V.; Dale, B. (2010). Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. **Biotechnol. Biofuels.** 3:1.
- Ballesteros, M.; Oliva, J.M.; Negro, M.J.; Manzanares, P.; Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation

- process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process. Biochem.** 39: 1843-1848.
- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES); Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) (2008). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro, Brasil. 316 p.
- Banerjee, G.; Car, S.; Scott-Craig, J. S.; Borrusch, M. S.; Walton, J. D. (2010). Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnol. Biofuels.** 3:22.
- Baeyns, J.; Kang, Q.; Appels, L.; Dewil, R.; Lv, Y.; Tan, T. (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Prog. Energ. Combust.** 47: 60-88.
- Bicho, P.A.; Runnals, P.L.; Cunninghamm, J.D.; Lee, H. (1988). Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipites* on mixed sugars. **Appl. Env. Microbiol.** 54: 50-54.
- Boeira, I.H.N. (2013). Produção de etanol e xilitol por *Spathaspora arborariae* e *Candida guilliermondii*. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Brodeur, G.; Yau, E.; Badal, K.; Collier, J.; Ramachandran, K.B.; Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physiochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. A review. **Enzyme Res.** doi:10.4061/2011/787532.
- Brown, S.W.; Oliver, S.G. (1982). Isolation of ethanol tolerant mutants of yeast by continuous selection. **European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 16: 119-122.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2010). Cellulases e xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1889-1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2009). Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Ind. Crops Prod.** 29: 642-647.
- Canetti, E.V. (2004). Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto. **Tese de doutorado.** Faculdade de Engenharia, UNESP, Guaratinguetá, Brasil.

- Canilha, L.; Milagres, A.M.F.; Silva, S.S.; Silva, J. B. A.; Felipe, M.G.A.; Rocha, G.J.M.; Ferraz, A.; Carvalho, W. (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Rev. Analytica**. 44: 48-54.
- Castro, A.M. (2010). Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**. 33: 181-188.
- Cheng, K.K.; Cai, B.Y.; Zhang, J.A.; Ling, H.Z.; Zhou, Y.J.; Ge J.P.; Xu, J.M. (2008). Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochem. Eng. J.** 38: 105-109.
- Conde-Mejía, C.; Jiménez- Gutiérrez, A.; El- Halwagi, M. (2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process. Saf. Environ.** 90: 189-202.
- da Cunha-Pereira, F.; Hickert, L.; Senhem, N.; Rosa, C.A.; Souza-Cruz, P.; Ayub, M.A.Z. (2011). Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresour. Technol.** 102: 4218-4225.
- dos Santos, J. R. A.; Souto-Maior, A.M.; Gouveia, E.R.; Martín, C. (2010). Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Quím. Nova**. 33: 904-908.
- de Bari, I.; De Canio, P.; Cuna, D.; Liuzzi, F.; Capece, A.; Romano, P. (2013). Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and cocultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **New Biotechnol.** 30: 591-597.
- Deesuth, O.; Laopaiboon, P.; Laopaiboon, L. (2016). High ethanol production under optimal aeration conditions and yeast composition in a very high gravity fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Ind. Crop. Prod.** 92: 263-270.
- Delabona, P.S. (2012). Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass. Bioenerg.** 37: 243-250.
- de Sales, B.B.; Scheid, B.; Gonçalves, D.L.; Knychala, M.M.; Matsushika, A.; Elba P. S. Bom, E.P.S.; Stambuck, B.U. (2015). Cloning novel sugar transporters from

- Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.** 37: 1973-1982.
- Dias, M.O.S.; Junqueira, T.L.; Cavalett, O.; Cunha, M.P.; Jesus, C.D.F.; Rossel, C.E.V.; Filho, R.M.; Bonomi, A. (2012). Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresour. Technol.** 103: 152-161.
- Dillon, A.J.P.; Paesi-Toresan, S.; Barp, L.B. (1992). Isolation of cellulase-producing mutants from *Penicillium* sp. strains denominated 3MUV3424. **Rev. Bras. Gen.** 15: 491-498.
- Dillon, A.J.P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J.A.P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- Dillon, A.J.P.; Camassola, M.; Henriques, J.A.P.; Fungaro, M.H.P.; Azevedo, A.C.S.; Velho, T.A.F.; Laguna, S.E. (2008). Generation of recombinant strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microb. Technol.** 43: 403-409.
- Dillon, A.J.P.; Bettio, M.; Pozzan, F.G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111(1): 48-53.
- Fengel, D.; Wegener G. (1989). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Berlin: Walter de Gruyter**, 613 p.
- Florencio, C. (2011). Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma* spp. **Dissertação de mestrado**. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade de São Carlos. São Carlos, Brasil.
- Fromanger, R.; Guillouet, S. E.; Uribe Larrea, J.L.; Molina- Jouve, C.; Cameleyre, X. (2010). Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology is ethanol production from xylose and glucose. **J. Ind. Microbiol. Biot.** 37: 437-445.
- Fu, N; Peiris, P.; Markham, J.; Bavor, J. (2009). A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme Microb. Technol.** 45: 210-217.

- Galbe, M.; Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 108: 41-65.
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 618-628.
- Gao, D.; Uppugundla, N.; Chundawat, S. P.S.; Yu, X.; Hermanson, S.; Gowda, K.; Brumm, P.; Mead, D.; Balan, V.; Dale, B.E. (2011). Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol. Biofuels.** 4: 5.
- Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Carneiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 101: 4775-4800.
- Gong, C.S.; Claypool, T.A.; McCracken, K.D.; Mann, C.M.; Ueng, P.P.; Tsao, G.T. (1983). Conversion of pentoses by yeast. **Biotechnol. Bioeng.** 25: 85-104.
- Grootjen, D.R.J.; Jansen, M.L.; Van der Lans, R.G.J.M.; Luyben, K. (1991). Reactors in series for the complete conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Tech.** 13: 828-833.
- Gutierrez, L.E.; Amorim, G.V.; Basso, L.C. (1991). Inibidores da fermentação alcoólica. **STAB, Açúcar, álcool e subprodutos.** Piracicaba. 9: 24-30.
- Hamelinck, C.N.; van Hooijdonk, G.; Faaji, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno- economic performance in short- middle and long- term. **Biomass.** 28: 384-410.
- Hansen, M.A.T.; Ahl, L.I.; Pedersen, H.L.; Westereng, B.; Willats, W.G.T.; Jorgensen, H.; Felby, C. (2014). Extractability and digestibility of plant cell wall polysaccharides during hydrothermal and enzymatic degradation of wheat straw (*Triticum aestivum L.*). **Ind. Crops. Prod.** 55: 63-9.
- Hickert, L. R. (2014). Bioconversão de hidrolisados de casca de arroz e soja a etanol e xilitol por leveduras. **Tese de doutorado.** Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
- Hickert, L. R.; Souza-Cruz, P.B.; Rosa, C.A.; Ayub, M.A.Z. (2013a). Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresour. Technol.** 143: 112-116.

- Hickert, L. R.; Cunha-Pereira, F.; Souza-Cruz, P.B.; Rosa, C.A.; Ayub, M.A.Z. (2013b). Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresour. Technol.** 131: 508-514.
- Ho, N.W.Y.; Chen, Z.; Brainard, A.P. (1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1852-1859.
- Huang, H.J.; Ramaswamy, S.; Al-Dajani, W.; Tschimer, U.; Cairncross, R.A. (2009). Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: a comparative process and economic analysis. **Biomass Bioenerg.** 33: 234-246.
- Ingram, L.O.; Doram, J.B. (1995). Conversion of cellulosic materials to ethanol. **FEMS Microbiol. Rev.** 16: 235-241.
- Jeffries, T.W.; Grigoriev, I.V.; Grimwood, J.; Laplaza, J.M.; Aerts, A.; Salamov, A. (2007) Genome sequence of the lignocelluloses-bioconverting and xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nat. Biotechnol.** 25: 319-326.
- Jeffries, T.W. (1983) Utilization of xilose by bacteria, yeast, and fungi. **Adv. Biochem. Eng.** 27: 1-32.
- Jorgesen, H.; Kristensen, J.B.; Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels. Bioprod. Biorefin.** 1: 119-134.
- Kádár, Z.; Szengyel, Z.; Réczey, K. (2004). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Ind. Crops Products.** 20: 103-110.
- Karagöz, P.; Özkan, M. (2014). Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. **Bioresour. Technol.** 158: 286-293.
- Karimi, K.; Taherzadeh, M.J. (2016). A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. **Bioresour. Technol.** 200: 1008-1018.
- Keller, F.A.; Hamilton, J.E.; Nguyen, Q. A. (2003). Microbial pretreatment of biomass. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 105: 27-41.

- Kilian, S.G.; van Uden, N. (1988). Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 27: 545-548.
- Kim, S.R.; Park, Y.; Jin, Y.; Seo, J. (2013). Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnol. Adv.** 31: 851-861.
- Knauf, M.; Moniruzzaman, K. (2004). Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **Int. Sugar J.** 106: 147-150.
- Kohlhepp, G. (2010) Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estud. av. [online]**. 24: 223-253.
- Kuhad, R.C.; Singh, A. (2007). **Lignocellulose biotechnology: future prospects**. I.K. International Publishing, 387 p.
- Kuyper, M.; Hartog, M.M.P.; Toirkens, M.J.; Almering, M. J.; Winkler, A.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. (2005a). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Res.** 5: 399-409.
- Kuyper, M., Toirkens, M.J.; Diderich, J.A.; Winkler, A.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. (2005b). Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Res.** 5: 925-934.
- Kuyper, M.; Winkler, A.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Res.** 4: 655-664.
- Lehtonen, M. (2011). Social sustainability of the Brazilian bioethanol: power relations in a centre-periphery perspective. **Biomass. Bioenergy.** 35: 2425-2434.
- Li, X.; Park, A.; Estrela, R.; Kim, S.; Jin, Y.; Cate, J. H. D. (2016). Comparison of xylose fermentation by two high performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Reports.** 9: 53-56.
- Lima, A.L.G.; Nascimento, R P.; Bon, E.P.S.; Coelho, R.R.R. (2005). Cellulase activity by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agro-industrial by products and tests for biotechnological application. **Enzyme. Microb. Technol.** 37: 272.
- Limayem, A.; Ricke, S.C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Prog. Energ. Combust.** 38: 449-467.

- Lu, Y.P.; Yang, B.; Gregg, D.; Saddler, J.N.; Mansfield, S.D. (2002). Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 98: 641-654.
- Maleszka, R.; Schneider, H. (1982). Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* bearing on D-xylose. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 909-912.
- Margaritis, A.; Bajpai, P. (1982) Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces fragilis* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 1039-1041.
- Ndaba, B.; Chiyanzu, I.; Marx, S.; Obiero, G. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the co-fermentation of sweet sorghum bagasse hydrolysates pretreated under varying conditions. **Biomass. Bioenerg.** 71: 350-356.
- Menegol, D.; Scholl, A.L.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2014) Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy. Convers. Manage.** 88: 1252-1256.
- Menon, V.; Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Prog. Energ. Combust.** 38: 522-550.
- Merali, Z.; Marjamaa, K.; Käsper, A.; Kruus, K.; Gunning, A.P.; Morris, V.J.; Waldron, K. W. (2015) Chemical characterization of hydrothermally pretreated and enzyme-digested wheat straw: An evaluation of recalcitrance. **Food. Chem.** 198: 132-140.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapfle, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Oliveira, F.M.V.; Pinheiro, I. O. ; Souto-Maior, A.M.; Martin, C.; Gonçalves, A.R.; Rocha, G.J.M. (2012). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value added products. **Bioresour. Technol.** 130: 168-173.
- Olofsson, K.; Runquist, D.; Hahn-Hägerdal, B.; Lidén, G. (2011). A mutated xylose reductase increases bioethanol production more than a glucose/xylose facilitator in simultaneous fermentation and co-fermentation of wheat straw. **AMB Express Springer Open J.** (Impresso). 1:4.

- Olsson, L.; Soerensen, H.R.; Dam, B.P.; Christensen, H.; Krogh, K.M.; Meyer, A.S. (2006). Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 129: 117-129.
- Olsson, L.; Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 312-331.
- Park, G. W.; Kim, I.; Jung, K.; Seo, C.; Han, J.; Chang, H. N.; Kim, Y. (2015). Enhancement of volatile fatty acids production from rice straw via anaerobic digestion with chemical pretreatment. **Bioprocess. Biosyst. Eng.** 38: 1623-1627.
- Paulová, L.; Patáková, P.; Branská, B.; Rychtera, M., Melzoch, K. (2014). Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnol. Adv.** 33: 1091-1107.
- Pereira, S.R.; Portugal-Nunes, D.J.; Evtuguin, D.V.; Serafim, L.S.; Xavier, A.M.R.B. (2013). Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. **Process. Biochem.** 48: 272-82.
- Perez, J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.** 5: 53–63.
- Pitarelo, A.P. (2013). Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. **Tese de Doutorado.** Universidade do Paraná. Curitiba, Brasil.
- Ramos, L.P.; Breuil, C.; Saddler, J.N. (1992). Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 34-35: 37-48.
- Ramos, L.P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nova.** 26: 863-877.
- Reis, L.; Fontana, R.C.; Delabona, P. S.; Lima, D. J. S.; Camassola, M.; Pradella, J.G.C.; Dillon, A.J.P. (2013). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresour. Technol.** 147: 597-603.
- Reis, L.; Schneider, W.D.H.; Fontana, R.C.; Camassola, M.; Pradella, J.G.C.; Dillon, A.J.P. (2014). Cellulase and Xylanase Expression in Response to Different pH Levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **Bioenerg. Res.** 7: 60-67.

- Rocha, G.J.M.; Martín, C.; Silva, V.F.N.; Gómez, E.O.; Gonçalves, A.R. (2012). Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresour. Technol.** 111: 447-452.
- Ruiz, E.; Romero, I.; Moya, M.; Cara, C.; Vidal, J.D. Castro, E. (2013). Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. **Bioresour. Technol.** 140: 292-298.
- Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biot.** 30: 279- 291.
- Santos, A.F.; Queiróz, J.H.; Colodette, J.L.; Fernandes, S.A.; Guimarães, V.M.; Rezende, S.T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova.** 35: 1004-1010.
- Sarkar, N.; Ghosh, S.K; Bonnerjee, S.; Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renew. Energ.** 37: 19-27.
- Scheufele, F.B. (2012). Bioconversão de resíduos agroindustriais por microorganismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas. **Dissertação de mestrado.** Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, Brasil.
- Scholl, A.L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontana, R.C.; Filho, A.Z.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.; Camassola, M. (2015). Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Ind. Crop. Prod.** 70: 280-291.
- Silva, R. J. (2012). Efeito de pré-tratamento hidrotérmico na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. **Monografia** apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.
- Silva, A.S.; Inoue, H., Endo, T.; Yano, S.; Bon, E.P.S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresour. Technol.** 101: 7402-7409.
- Silva, R.; Gomez, E. (2004). **Ligninases.** In: Said, S.; Pietro, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa.pp 349-379.
- Silvério, H.A.; Neto, W.P.F.; Dantas, N.O.; Pasquini, D. (2013). Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. **Ind. Crop. Prod.** 44: 427-436.

- Sivakumar, G.; Vail, D.; Xu, J.; Burner, D.; Lay Jr, J.O.; Ge, X.; Weathers, P. (2010). Bioethanol and biodiesel: alternative liquid fuels for future generations. **Eng. Life. Sci.** 1: 8-18.
- Slininger, P.J.; Bolen, P.L.; Kurtzman, C.P. (1987). *Pachysolen tannophilus*: properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. **Enzyme Microb. Technol.** 9: 5-15.
- Socol, C.; Vanderberghel, L.; Medeiros, A.; Karp, S.; Buckeridge, M.; Ramos, L.P.; Pitarelo, A.P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.; Ferrara, M.A.; Bon, E.; Moraes, L.; Araújo, J.; Torres, F. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresour Technol.** 101: 4820-4825.
- Sonderegger, M.; Sauer, U. (2003). Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1990-1998.
- Stambuk, B.U.; Eleutherio, E.C.A.; Florez-Pardo, L.M.; Souto-Maior, A.; Bom, E.P.S. (2008). Brazilian potencial for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.** 67: 918-926.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** 8: 1-11.
- Szczodrak, J.; Fiedurek, J. (1996). Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass Bioenerg.** 10: 367-375.
- Taherzadeh, M.J.; Karini, K. (2007). Acid-basesed hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic material: a review. **Bio. Resour.** 2: 472-499.
- Toscan, A. (2013). Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Única - União da Indústria de cana-de-açúcar. **Protocolo Agroambiental do Setor Sucroalcooleiro.** Disponível em <http://www.Unica.com.br>. Acesso em 16 de janeiro de 2016.8.
- van Maris, A. J. A.; Abbott, D.A.; Bellissimi, E.; Van Den Brink, J.;Kuyper, M.; Luttik, A. H.; Wisselink, H. W.; Scheffers, W. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek.** 90: 391-418.

- Van Vleet, J.H.; Jeffries, T.W. (2009). Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Curr. Opin. Biotechnol.** 20: 300-306.
- Verho, R.; Lon Desborough, J.; Penttila, M.; Richard, P. (2003). Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5892-5897.
- Vidal, P. F.; Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin- improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass.** 16: 1-17.
- Walker, P.; Wilson, D.B. (1991) Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. **Bioresour. Technol.** 36: 3-14.
- Walker, G.M. (1998). **Yeast physiology and biotechnology**. England: John Wiley, 362p.
- Wang, L.; Quiceno, R.; Price, C.; Malpas, R.; Woods, J. (2014). Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 40: 571-582.
- Webb, S.R.; Lee, H. (1990). Regulation of D-xylose utilization by hexose in pentose fermenting yeast. **Biotechnol. Adv.** 8: 685-697.
- Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S. (1998) Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **J. Ferment. Bioeng.** 86: 1-14.
- Wisselink, H.W.; Toirkens, M.J.; Wu, Q.; Pronk, J.T.; van Maris, A.J.A. (2009). Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Appl. Env. Microbiol.** 75: 907-914.
- Wisselink, H.W.; Toirkens, M.J.; Berriél, M.R.F. (2007). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. **Appl. Env. Microbiol.** 73: 4881-4891.
- Wooley, R.; Ruth, M.; Glassner, D.; Sheehan, J. (1999). Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. **Biotechnol. Prog.** 15: 794-803.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Boyce, A.N.; Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 66: 751-774.

- Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 17-34.
- Zayed, G.; Meyer, O. (1996). The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 551-555.
- Zhang, Y.H.P.; Lynd, L.R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng.** 88: 797-824.
- Zhang, M.; Eddy, C.; Deanda, K.; Finkstein, M.; Picataggio, S. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanolgenic *Zymomonas mobilis*. **Sci.** 267: 240-243.