

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A
LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM
HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO
DE ETANOL 2G**

Natália Novais Ribeiro

Tecnóloga em Biocombustíveis

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A
LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM
HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO
DE ETANOL 2G**

Natália Novais Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Coorientadora: Profa. Dra. Lidiane Aline de Freitas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2023

R484e Ribeiro, Natália Novais
Efeito de inibidores da fermentação sobre a levedura *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos para a produção de etanol 2g / Natália Novais Ribeiro. -- Jaboticabal, 2023
116 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Lidyane Aline de Freitas

1. Agrocombustíveis. 2. Etanol celulósico. 3. Furanos. 4. Ácidos orgânicos. 5. Fenóis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

AUTORA: NATÁLIA NOVAIS RIBEIRO

ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

COORIENTADORA: LIDYANE ALINE DE FREITA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Pós-doutoranda LIDYANE ALINE DE FREITA (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

LIDYANE ALINE DE FREITA
Data: 11/08/2023 18:30:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural / UFSCar - Araras/SP



Documento assinado digitalmente

SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Data: 11/08/2023 18:15:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. LEONARDO LUCAS MADALENO (Participação Virtual)
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP



Documento assinado digitalmente

LEONARDO LUCAS MADALENO
Data: 12/08/2023 09:02:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a SARITA CÂNDIDA RABELO (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente

SARITA CANDIDA RABELO
Data: 11/08/2023 18:08:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. OSANIA EMERENCIANO FERREIRA (Participação Virtual)
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) / Frutal/MG



Documento assinado digitalmente

OSANIA EMERENCIANO FERREIRA
Data: 13/08/2023 18:38:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 11 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NATÁLIA NOVAIS RIBEIRO – Nasceu aos 24 de dezembro de 1993, no município de Sertãozinho, estado de São Paulo. Em fevereiro de 2013, ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia, Fatec Nilo De Stéfani, Jaboticabal, recebendo o título de Tecnóloga em Biocombustíveis em agosto de 2016. Em março de 2017, ingressou no Mestrado Acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, como bolsista Capes, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton. Durante esta época, realizou seu projeto de pesquisa intitulado “Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração”, obtendo o título de Mestre em março de 2019. Neste mesmo período, ingressou no Doutorado Acadêmico, no programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, como bolsista Capes, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, logrando o título de doutora em Microbiologia Agropecuária em agosto de 2023.

Epígrafe

“Porque se às vezes dá preguiça de seguir
em frente, eu não me esqueço que é impossível
voltar pra trás”

- *Maria Paula Fraga*

A minha mãe pelo incentivo, fé, confiança e amor incondicional demonstrados.

A minha irmã pela amizade, carinho e companheirismo ao longo desta turbulenta etapa da minha vida.

A minha família e todos que de alguma forma tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada;

A minha mãe e irmã pelo carinho, incentivo, credibilidade e compreensão nas horas mais difíceis. Vocês fizeram esta vida valer cada vez mais a pena;

À Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, orientadora desta tese, pela confiança em meu trabalho, pela acolhida, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria, amizade e oportunidades oferecidas durante o tempo em que estive sobre seus cuidados;

Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton pelos ensinamentos, generosidade e todo auxílio nos momentos de dificuldades;

À Dra. Lidiane Aline de Freitas, pela coorientação, disponibilidade, empenho, paciência, estímulo e dedicação;

A todos do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool, pelos momentos de aprendizado, colaboração e alegrias e tristezas compartilhadas.

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso e aprimoramento profissional;

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações;

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a concretização desse estudo;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Etanol 2G	4
2.2 Biomassa lignocelulósica	5
2.3 Pré-tratamento	5
2.4 Inibidores da fermentação.....	7
2.4.1 Derivados de furanos.....	8
2.4.2 Compostos fenólicos.....	9
2.4.3 Ácidos orgânicos.....	10
2.5 Destoxificação.....	10
2.6 Fermentação	11
2.7 Leveduras	11
2.8 <i>Pichia membranifaciens</i>	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
Capítulo 2 - TOLERÂNCIA DE <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04 A INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G	21
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24

2.1	Microrganismo	24
2.2	Preparo do inóculo	25
2.3	Delineamento experimental	25
2.4	Preparo do hidrolisado hemicelulósico sintético	25
2.5	Processo fermentativo	26
2.6	Métodos analíticos e quantitativos	26
2.7	Análise cinética	27
2.8	Análise dos dados	29
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1	Efeito dos inibidores na cinética fermentativa	29
3.2	Análises microbiológicas	34
3.3	Produtos da fermentação alcoólica	36
4.	CONCLUSÕES	45
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
Capítulo 3 - PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO SEM DESTOXIFICAÇÃO POR <i>Pichia membranifaciens</i>		54
RESUMO		54
1.	INTRODUÇÃO	55
2.	MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1	Microrganismo	58
2.2	Preparo do inóculo	58
2.3	Delineamento experimental	59
2.4	Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico	60
2.5	Preparo do hidrolisado hemicelulósico sintético	60
2.6	Preparo e esterilização do mosto	60
2.7	Processo fermentativo	61

2.1	Métodos analíticos e quantitativos.....	61
2.8	Análises cinéticas	62
2.9	Análise dos dados	64
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1	Cinética fermentativa.....	64
3.2	Análises microbiológicas	66
3.3	Produtos da fermentação alcoólica	70
4.	CONCLUSÕES	73
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	APÊNDICES.....	80
	Apêndice A – EFEITO DE FURFURAL, HIDROXIMETILFURFURAL, ÁCIDO FÊNICO E ÁCIDO LEVULÍNICO NA CINÉTICA FERMENTATIVA DE <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04	81
	Apêndice B – EFEITOS DE DIFERENTES HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS NA CINÉTICA FERMENTATIVA DE <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04	94

EFEITO DE INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO SOBRE A LEVEDURA *Pichia membranifaciens* LJ04 EM HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

RESUMO - O uso de resíduos agroindustriais (folhas, caules, palhas, bagaços, sabugos e cascas) apresenta-se atualmente como uma opção promissora para o aumento do volume de etanol produzido no Brasil, sem que haja a necessidade do aumento das áreas cultiváveis do país. Para isto, é necessário que tais biomassas passem por processos químicos, físicos e/ou biológicos visando a despolimerização da rígida estrutura lignocelulósica que os constituem. Desta forma, após pré-tratamento dessas matérias-primas, ocorre a obtenção do hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses e produtos da degradação dos açúcares (furfural, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos), conhecidos por inibir o metabolismo de leveduras. Neste caso, antes da fermentação recomenda-se destoxificar o hidrolisado para remoção total ou parcial desses compostos. Contudo, é um processo caro que eleva o preço de produção desse biocombustível. À vista disso, a utilização de microrganismos que apresentem tolerância a presença de inibidores da fermentação e capacidade para fermentar pentoses e hexoses, torna-se um dos principais gargalos tecnológicos atuais. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos avaliar como a presença de diferentes doses de inibidores da fermentação (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico) afetam o crescimento celular e fermentação alcoólica de *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos sintéticos e comparar o desenvolvimento de processos fermentativos conduzidos em hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação, obtido por pré-tratamento ácido de bagaço de cana cana-energia. As avaliações dos parâmetros microbiológicos da fermentação foram realizadas em Câmara de Neubauer e as concentrações de Glicerol, Etanol e Ácido acético determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O trabalho demonstrou a capacidade de *Pichia membranifaciens* LJ04 em tolerar a presença de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico presentes em hidrolisados hemicelulósicos, e sua aptidão para a produção de etanol de segunda geração sem a necessidade de destoxificação dos hidrolisados.

Palavras-chave: Agrocombustíveis, Etanol celulósico, Furanos, Ácidos orgânicos, Fenóis.

EFFECT OF FERMENTATION INHIBITORS ON YEAST *Pichia membranifaciens* LJ04 IN HEMICELLULOSIC HYDROLYZES FOR THE PRODUCTION OF 2G ETHANOL

ABSTRACT - The use of agro-industrial residues (leaves, stems, straw, bagasse, cobs and fruit peels) is currently a promising option for increasing the volume of ethanol produced in Brazil, without the need to increase the country's arable land. For this, it is necessary that such biomasses undergo chemical, physical and/or biological processes aiming at the depolymerization of the rigid lignocellulosic structure that constitute them. Thus, after pre-treatment of these raw materials, a hemicellulose hydrolyzate rich in pentoses and sugar degradation products (furfural, hydroxymethylfurfural and organic acids) is obtained, known to inhibit yeast metabolism. In this case, before fermentation, it is recommended to detoxify the hydrolyzate for total or partial removal of these compounds. However, it is an expensive process that raises the production price of this biofuel. In view of this, the use of microorganisms that are tolerant to the presence of fermentative inhibitors and capable of fermenting pentoses and hexoses, becomes one of the main current technological challenges. In this sense, the present work aimed to evaluate how the presence of different doses of fermentative inhibitors (furfural, hydroxymethylfurfural, fenic acid and levulinic acid) affect cell growth and alcoholic fermentation of *Pichia membranifaciens* LJ04 in synthetic hemicellulosic hydrolysates and to compare the development of fermentation processes conducted in hemicellulosic hydrolyzate without detoxification, obtained by acid pre-treatment of cane-energy sugarcane bagasse. The evaluations of the microbiological parameters of the fermentation were carried out in a Neubauer Chamber and the concentrations of Glycerol, Ethanol and Acetic Acid determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The work demonstrated the ability of *Pichia membranifaciens* LJ04 to tolerate the presence of furfural, hydroxymethylfurfural, fenic acid and levulinic acid present in hemicellulosic hydrolysates, and its ability to produce second-generation ethanol without the need for detoxification of the hydrolyzed.

Keywords: Agrofuels, Cellulosic ethanol, Furans, Organic acids, Phenols.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Efeitos de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica crescimento (μ_x), biomassa produzida e velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. 30

Tabela 2 - Efeitos de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico no rendimento de biomassa e etanol de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. 33

Tabela 3 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para massa celular, viabilidade celular e viabilidade dos brotos de *P. membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido fênico e Ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h.....35

Tabela 4 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para teores de glicose, xilose, glicerol, etanol e ácido acético consumidos e/ou produzidos por *P. membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido fênico e Ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. 39

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Efeitos de diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida e velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) de *Pichia membranifaciens* LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h. 65

Tabela 2 - Efeitos de diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos no rendimento de biomassa e etanol de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	66
Tabela 3 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para massa celular, viabilidade celular e viabilidade dos brotos de <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	67
Tabela 4 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para teores de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol consumidos e/ou produzidos por <i>Pichia membranifaciens</i> LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L ⁻¹ , durante 72 h.	70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - *Pichia membranifaciens* LJ04 cultivada em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose e ágar). A) Placa inoculada pelo método de espalhamento (Spread-Plate). B) Placa inoculada pelo método de semeadura em estrias. Fonte: De autoria própria. 24
- Figura 2** - Desdobramento de interações para viabilidade celular de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo. 37
- Figura 3** - Desdobramento de interações para viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo. 38
- Figura 4** - Desdobramento de interações para etanol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo. 41
- Figura 5** - Desdobramento de interações para ácido acético produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo. 43

Figura 6 - Desdobramento de interações para glicerol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L^{-1}) e xilose (45 g.L^{-1}), à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo. 44

CAPÍTULO 3

Figura 1 - *Pichia membranifaciens* LJ04 cultivada em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose e ágar). Fonte: De autoria própria. 58

Figura 2 – Crescimento de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose). Da esquerda para a direita: Inoculação da levedura em meio YPXD líquido; meio de crescimento centrifugado após 72h; massa de levedura recuperada e suspendida em solução salina (NaCl 0,85%). Fonte: Elaboração própria. 59

Figura 3 - Hidrolisados hemicelulósicos após ajuste de pH. Da esquerda para direita: Hidrolisado sem destoxificação, hidrolisado destoxificado e hidrolisado sintético. Fonte: De autoria própria. 61

Figura 4 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para massa celular produzida por *Pichia membranifaciens* LJ04 produzida na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, durante 72 h. 68

Figura 5 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para viabilidade celular de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, durante 72 h. 69

Figura 6 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04 produzida na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, durante 72 horas. 69

Figura 7 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para etanol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de

fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h. 72

Figura 8 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para ácido acético produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h. 72

Figura 9 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para glicerol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h. 73

Apêndice A

Figura 1A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético sem inibidores, contendo glicose (25,0 g.L⁻¹) e xilose (45,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 81

Figura 2A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 82

Figura 3A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 82

Figura 4A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 83

Figura 5A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 83

Figura 6A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e furfural (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	84
Figura 7A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e furfural (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	84
Figura 8A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (0,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	85
Figura 9A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (1,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	85
Figura 10A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (1,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	86
Figura 11A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (2,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	86
Figura 12A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	87
Figura 13A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e hidroximetilfurfural (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	87

- Figura 14A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.....88
- Figura 15A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.....88
- Figura 16A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.....89
- Figura 17A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.....89
- Figura 18A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (2,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.....90
- Figura 19A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (3,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.....90
- Figura 20A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 91
- Figura 21A** - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h. 91

Figura 22A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (1,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	92
Figura 23A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (2,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	92
Figura 24A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (2,5 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	93
Figura 25A - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L ⁻¹), xilose (45,0 g.L ⁻¹) e ácido levulínico (3,0 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L ⁻¹ , pelo período de 24 h.	93

Apêndice B

Figura 1B - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em hidrolisado hemicelulósico sintético (sem inibidores), contendo glicose (26 g.L ⁻¹) e xilose (43 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 1,8 g.L ⁻¹ , pelo período de 72 h.	94
Figura 2B - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em hidrolisado hemicelulósico de cana-energia destoxificado, contendo glicose (15 g.L ⁻¹) e xilose (39 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 1,8 g.L ⁻¹ , pelo período de 72 h.	95
Figura 3B - Determinação da fase de crescimento exponencial de <i>P. membranifaciens</i> LJ04 em hidrolisado hemicelulósico de cana-energia sem destoxificação, contendo glicose (16 g.L ⁻¹) e xilose (37 g.L ⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 1,8 g.L ⁻¹ , pelo período de 72 h.	95

Capítulo 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Visando garantir a demanda de energia, diversificação da matriz energética e proteção do meio ambiente, nas últimas décadas houve grande incentivo para procura e desenvolvimento de fontes de energia renováveis (ZHENG e REHMANN, 2014; OSMANI e ZHANG, 2017; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017). Dentre as alternativas energéticas propostas, os biocombustíveis destacam-se como melhor opção ecológica para a substituição do petróleo, pois são fontes de energia viáveis e baratas que garantem a diminuição da emissão dos gases causadores do efeito estufa (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017; RODIONOVA *et al.*, 2017; BRACMORT, 2020).

De acordo com Rastogi e Shrivastava (2017), o bioetanol é o biocombustível que lidera o mercado global de substitutos aos combustíveis fósseis. É amplamente utilizado em motores de explosão de automóveis, tornando-se essencial para o setor de transporte de diversos países (OSMANI e ZHANG, 2017; BRACMORT, 2020).

O bioetanol atualmente produzido em larga escala pertence a primeira geração de biocombustíveis, sendo recorrentemente denominado de etanol 1G (LOPES *et al.*, 2017). É um produto obtido a partir do processamento de material vegetal contendo açúcares ou amido abundantes, isto é, culturas ricas em carboidratos diretamente ou indiretamente fermentescíveis (CASTRO, 2013; RODIONOVA *et al.*, 2017).

Através da adoção de diversas estratégias de expansão da produção de álcool etílico utilizando cana-de-açúcar, o Brasil conseguiu se configurar no cenário mundial como segundo maior produtor de etanol nas últimas quatro décadas (SILVA, 2017). Apesar disto, projeta-se que as culturas atuais não serão suficientes para atender a futura demanda internacional, sendo necessário à realização de políticas de implementações de novas matérias-primas e tecnologias (LOPES *et al.*, 2017).

Neste contexto, a produção de etanol de segunda geração apresenta-se como opção viável e promissora para o aumento do volume produzido sem que haja a necessidade da expansão de terras cultiváveis (RODIONOVA *et al.*, 2017). É uma alternativa atraente para usinas e destilarias brasileiras pois é produzido através do processamento de material lignocelulósico, desta forma, sua matéria-prima encontra-

se disponível em abundância durante todo o ano graças ao bagaço obtido após a extração do caldo da cana-de-açúcar (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A viabilidade do uso de biomassa vegetal para produção de etanol promoveu nos últimos anos a reativação e surgimento de novas pesquisas de variedades de cana-de-açúcar (MATSUOKA *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2016). A cana-energia foi desenvolvida através de diferentes cruzamentos de espécies ancestrais e híbridos comerciais de cana, em razão da necessidade de um biótipo mais robusto, potencialmente produtivo, com maior teor de fibra e vida útil no corte; características ideais para a produção de biocombustíveis de segunda geração (FERNANDES JÚNIOR, 2017).

Independentemente da matéria-prima utilizada, é extremamente importante que a biomassa passe por um ou mais tratamentos para que ocorra a quebra da estrutura complexa de celulose, hemicelulose e lignina que a compõe (BALAT, 2011; XU e WANG, 2017). Através da realização de processos químicos, físico-químicos, biológicos e/ou enzimáticos ocorre o desprendimento de açúcares simples (D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, entre outros) que podem ser efetivamente transformados em bioetanol com a ajuda de microrganismos (ZHENG *et al.*, 2013; TOMÁS-PEJÓ, BONANDER e OLSSON, 2014; MYAT e RYU, 2016; AZHAR *et al.*, 2017)

Já existem diversas metodologias capazes de realizar a quebra da estrutura cristalina de materiais vegetais (FERREIRA, 2015). Técnicas de pré-tratamento eficientes que aumentam a digestibilidade da celulose e hemicelulose, podem ser alcançadas através de tratamento ácido, alcalino, hidrólise enzimática e explosão a vapor (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

De acordo com relatos da literatura, a hemicelulose presente em biomassa lignocelulósica de resíduos agrícolas é mais propensa a despolimerizar sob calor ou condições ácidas, enquanto a celulose e lignina são mais resistentes à decomposição térmica, sendo, por este motivo, muitas vezes necessário a realização de um tratamento enzimático com a celulignina que se forma após o pré-tratamento (ZHENG *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2017; XU e WANG, 2017).

A realização da destoxificação do hidrolisado obtido após o pré-tratamento é benéfica e necessária, uma vez que produtos inibidores do processo fermentativo

(ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) são produzidos durante o processo de despolimerização da hemicelulose (LI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; XU e WANG, 2017; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017). Entretanto a remoção de compostos tóxicos gerados durante o processo aumenta o custo do tratamento e, portanto, o preço de produção deste tipo de etanol se torna maior (ACHINAS e EUVERINK, 2016; RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A escolha da linhagem do microrganismo que realizará o processo fermentativo é outro fator determinante para obtenção de um processo fermentativo eficiente (MOREIRA *et al.*, 2015). Alguns gêneros de microrganismos já demonstraram capacidade para fermentar pentoses e hexoses, tanto separadamente quanto simultaneamente (RASTOGI E SHRIVASTAVA, 2017). Segundo a literatura, existe um grande número de leveduras que realizam a metabolização de D-xilose, entretanto, destas somente cerca de 1% são capazes de fermentar xilose em etanol (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007).

Pichia membranifaciens é uma levedura normalmente encontrada em materiais vegetais, frutas estragadas e bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011). Cepas desta espécie que metabolizam e fermentam açúcares de cinco e seis carbonos já foram descritas na literatura (HOLLUPI, 2015; RIBEIRO, 2019). Esta levedura já foi relatada como tolerante à ácido orgânicos, sendo encontradas linhagens que resistiram até 30 g.L⁻¹ de ácido acético em soluções de vinagre e 12 g.L⁻¹ em processo fermentativo de etanol de segunda geração (ŠTORNÍK *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2019).

A produção comercial de bioetanol de segunda geração a partir de material lignocelulósico ainda está em desenvolvimento, à vista disto, diversos desafios precisam ser resolvidos (XU *et al.*, 2015; XU e WANG, 2017). Dentre as diversas barreiras à serem transpostas, a necessidade de leveduras que realizem o processo fermentativo na presença de substâncias tóxicas se mostra importante, pois pode reduzir custos através da retirada da etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico.

Neste contexto, o estudo do comportamento de leveduras não-convencionais em diferentes doses de inibidores da fermentação e seu desempenho em hidrolisados hemicelulósicos com e sem destoxificação, mostra-se relevante para a comunidade científica. Desta forma, ao explorar todo o potencial de *P. membranifaciens*, pode-se

gerar novos conhecimentos e, conseqüentemente, melhorias nos rendimentos e diminuição de custos no processo produtivo de etanol 2G.

Sendo assim, a presente pesquisa foi dividida em três partes:

Capítulo 1: Revisão bibliográfica;

Capítulo 2: Avaliação do comportamento fisiológico e fermentativo de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico (substâncias com forte potencial inibitório em fermentações) para a produção de etanol 2G.

Capítulo 3: Avaliação o desempenho fermentativo de *Pichia membranifaciens* LJ04 em mosto preparado com hidrolisado hemicelulósico, obtido por pré-tratamento ácido de bagaço de cana-energia, com e sem destoxificação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etanol 2G

O uso de combustíveis fósseis é apontado como um dos principais responsáveis pela elevada emissão de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (CARNEIRO, 2015). Nas últimas décadas, temas ambientais como a redução de gases poluentes e causadores do efeito estufa tem sido debatidos, estimulando uma crescente demanda por energia limpa e sustentável.

O aumento populacional mundial, aliado à necessidade de preservação ambiental e à escassez de fontes de energia esgotáveis, como o petróleo, tem incentivado a busca por alternativas viáveis para a produção de combustíveis sustentáveis. Assim, os biocombustíveis, produzidos principalmente a partir de biomassa, são vistos como uma excelente opção para substituição dos combustíveis de origem fóssil (PEREIRA *et al.*, 2015).

A produção agrícola brasileira é uma das maiores do mundo, como consequência ocorre a formação de grandes quantidades de resíduos agroindustriais, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar (gerados durante a produção de etanol e açúcar), que podem ser convertidos em energia limpa (PEREIRA *et al.*, 2015).

Desta forma, projeta-se que a produção de etanol a partir de biomassa pode aumentar em 50% o volume fabricado no Brasil atualmente (ARANTES, 2018), sem a necessidade de expandir áreas de cana-de-açúcar cultivadas (MORAIS *et al.*, 2017).

2.2 Biomassa lignocelulósica

A composição química e estrutural dos materiais lignocelulósicos inclui estruturas fibrosas complexas e difíceis de quebrar, denominadas celulose e hemicelulose, permeadas por macromoléculas de lignina. Formada por álcoois aromáticos unidos por ligações covalentes e de hidrogênio, a lignina atua como uma barreira protetora das plantas, protegendo-as contra ataques de microrganismos (LEE, 1997).

A celulose, um homopolissacarídeo linear e não ramificado, constitui cerca de 40% a 60% do material lignocelulósico e, quando hidrolisada, origina moléculas de glicose e celobiose. A hemicelulose, que representa de 15% a 45%, apresenta cadeias ramificadas que incluem hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose). As moléculas de celulose permanecem alinhadas paralelamente, formando fibras às quais se aderem as moléculas de hemicelulose, desta forma forma-se uma espécie de rede. A lignina une a celulose à hemicelulose, proporcionando suporte estrutural (FERREIRA, 2015).

Apesar de importante para as estruturas vegetais, a lignina corresponde à menor fração da lignocelulose (10% a 25%) e não é usada na produção de etanol, pois não está relacionada a moléculas simples de açúcar (FERREIRA, 2015). Além disso, é um polímero complexo com ligações covalentes cruzadas com a celulose, dificultando a quebra enzimática pela celulase, (enzima responsável pela digestão da celulose). Devido à rigidez estrutural da parede vegetal e à limitação que a lignina impõe ao processo de sacarificação, é necessária a etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico (SILVA, 2012).

2.3 Pré-tratamento

Como a biomassa lignocelulósica não contém açúcares fermentáveis livres, ela deve passar por certos processos para se tornar adequada ao uso. No geral, a produção de etanol de segunda geração inclui duas etapas adicionais ao processo

convencional: o pré-tratamento e a hidrólise, seguidos pela fermentação e destilação (FERREIRA, 2015). O pré-tratamento tem o objetivo de quebrar a estrutura rígida da biomassa, tornando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis, aumentando a porosidade do material. Esse processo também amplia a área de superfície da biomassa e reduz a cristalinidade da celulose (VAN DYK e PLETSCHEKE, 2012). Dessa forma, o pré-tratamento é crucial para a produção de etanol 2G, pois facilita a despolimerização dos açúcares (GALBE e ZACCHI, 2007).

Diversos tipos de pré-tratamentos foram desenvolvidos, incluindo métodos químicos, físicos, biológicos e físico-químicos, além de combinações de dois ou mais métodos (CHANDEL *et al.*, 2019). Exemplos de métodos químicos incluem a hidrólise ácida e alcalina, que degradam a hemicelulose ou removem a lignina, desestabilizando a estrutura lignocelulósica. Métodos físicos, como a explosão a vapor, aumentam a área de superfície do material. Métodos biológicos podem empregar enzimas ou fungos para solubilizar a lignina, geralmente em combinação com outros métodos (HAMELINCK *et al.*, 2005; NOGUEIRA, 2008; CANILHA *et al.*, 2012).

A hidrólise é a etapa que segue o pré-tratamento da biomassa e tem o objetivo de transformar a hemicelulose e a celulose em monômeros, como a glicose, que serão utilizados na fermentação. A hidrólise pode ser enzimática, ácida ou alcalina (CHANDEL *et al.*, 2019). Na hidrólise enzimática, são aplicadas enzimas, como as celulasas, para degradar a celulose. Fatores como pH, temperatura, concentração do substrato e atividade das celulasas podem afetar significativamente a eficiência da hidrólise. A degradação da celulose gera glicose e celobiose, sendo que esta última pode atuar como inibidor e precisa ser transformada em glicose pela adição de enzimas glicosidases (SUN e CHENG, 2002).

A hidrólise ácida utiliza ácidos, tais como ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido clorídrico (HCl), para liberar os açúcares fermentáveis. Pode ser realizada de forma concentrada, com concentrações de ácidos entre 30% e 70%, ou de forma diluída, com 1% de concentração de ácidos e temperaturas muito elevadas. A hidrólise ácida concentrada tem maior eficiência de rendimento, obtendo-se a despolimerização de aproximadamente 90%. Há também a hidrólise alcalina, que emprega hidróxido de

sódio (NaOH), mas esta é menos usada devido ao rendimento inferior (CAMBI *et al.*, 2017).

Apesar do custo relativamente alto, a hidrólise enzimática tem vantagens em relação aos outros métodos: apresenta especificidade de reação, não exige altas pressões e temperaturas, não gera ambientes corrosivos para os equipamentos e evita a formação de compostos secundários que possam prejudicar a fermentação (BASTOS, 2007; CHANDEL *et al.*, 2019).

2.4 Inibidores da fermentação

Durante a fermentação, a presença de certas substâncias no mosto pode prejudicar a atividade dos microrganismos, comprometendo a produção de etanol. Assim, o rendimento e a produtividade do etanol são reduzidos devido à interferência na metabolização dos açúcares pelas leveduras causada por compostos inibidores, que limitam a eficiência do uso dos açúcares hidrolisados (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Estudos mostraram que, durante o pré-tratamento e a hidrólise, formam-se substâncias que podem inibir a fermentação alcoólica, e, conseqüentemente, reduzir a eficiência da produção de etanol. Ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico), derivados de furano e compostos fenólicos, são os principais compostos inibidores (PEREIRA *et al.*, 2015).

Sabe-se que os ácidos fracos são gerados principalmente pela hidrólise da hemicelulose e inibem o crescimento de microrganismos fermentadores. Derivados de furano, como furfural e hidroximetilfurfural, são formados a partir da hemicelulose e celulose e podem afetar negativamente a taxa de crescimento dos microrganismos. Compostos fenólicos, oriundos da degradação da lignina, comprometem a integridade da membrana plasmática das células microbianas, afetando sua função como barreira seletiva (PALMQVIST e HÄHN-HÄGERDAL, 2000a).

A hidrólise ácida, frequentemente preferida por razões econômicas, pode gerar muitos desses subprodutos (JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013). Identificando e compreendendo os compostos inibidores e seus mecanismos de ação, é possível otimizar o pré-tratamento e aplicar métodos eficazes de destoxificação para removê-los, garantindo o sucesso do processo fermentativo (JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013).

2.4.1 Derivados de furanos

Entre os principais compostos derivados de furanos gerados durante a produção de etanol 2G estão o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF). Em altas concentrações, eles podem inibir o crescimento dos microrganismos fermentadores, reduzindo a eficiência do processo e, conseqüentemente, a produtividade e rendimento do etanol. Quando associados, o furfural e o HMF podem causar degradação de moléculas de DNA e interromper a síntese de RNA e proteínas (ALMEIDA *et al.*, 2007; JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013).

O furfural se origina da hemicelulose, formado pela desidratação de pentoses como a xilose, enquanto o HMF é produzido a partir da desidratação de hexoses como glicose, galactose e manose. A glicose é derivada da quebra tanto da celulose quanto da hemicelulose, enquanto a galactose e a manose provêm apenas da hemicelulose. Geralmente, o HMF está presente em maior concentração que o furfural (ALMEIDA *et al.*, 2007; JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013).

Além de atuarem como inibidores, a degradação do furfural e do HMF leva à formação de ácidos que podem inibir a fermentação, como ácido fórmico e ácido levulínico. Em *S. cerevisiae*, o furfural pode causar acúmulo de espécies reativas de oxigênio, danificando membranas mitocondriais, cromatina e actinas (JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013). O furfural também inibe enzimas glicolíticas (WANG *et al.*, 2016). Esses compostos são produzidos durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica, e sua concentração no material hidrolisado depende do tipo de matéria-prima e do método de pré-tratamento utilizado (LUO *et al.*, 2018). O pré-tratamento da biomassa por hidrólise ácida gera vários compostos tóxicos, sendo o furfural e o HMF os inibidores mais potentes (MALAV *et al.*, 2017).

Devido aos efeitos prejudiciais aos microrganismos, pesquisadores têm estudado como esses derivados de furano inibem a fermentação alcoólica. O HMF e o furfural aumentam o gasto energético da levedura, desviando sua energia para reparar danos causados pelos inibidores, devido à redução intracelular de ATP e NAD/NADP, afetando as atividades enzimáticas e biológicas dos microrganismos (JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013).

É possível que a resistência de alguns microrganismos ao furfural e HMF esteja relacionada à capacidade de sintetizar mais NADH. Aumentar a disponibilidade desse cofator pode ser uma alternativa para reduzir a presença de compostos tóxicos (DÍAZ-NAVA *et al.*, 2017). Apesar de seu potencial inibitório na produção de etanol, o furfural é visto como uma alternativa sustentável ao petróleo, podendo ser usado na produção de plásticos, pesticidas, produtos farmacêuticos e biocombustíveis. Anualmente, são produzidas 450.000 toneladas de furfural a partir da biomassa lignocelulósica (LYU e BOTTE, 2021).

2.4.2 Compostos fenólicos

Durante o pré-tratamento, a desidratação dos açúcares liberados pela quebra da celulose e da hemicelulose pode liberar furfural e HMF, além de compostos fenólicos e outros aromáticos derivados da lignina. Também é possível que fenóis se formem a partir dos açúcares (JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013).

Fenóis podem existir como ácidos, cetonas e aldeídos, sendo que cetonas e aldeídos são inibidores mais potentes do que os ácidos (CHANDEL, SILVA e SINGH, 2013). Os efeitos desses compostos nas células microbianas variam conforme o grupo funcional. De modo geral, foi proposto que os compostos fenólicos afetam especialmente a integridade da membrana celular, influenciando sua função biológica e alterando a proporção entre lipídios e proteínas (LARSSON *et al.*, 2000; JÖNSSON, ALRIKSSON e NILVEBRANT, 2013). Assim, os compostos fenólicos prejudicam a integridade das membranas biológicas, afetando seu papel como barreiras seletivas e matrizes enzimáticas. Eles também podem alterar o gradiente eletroquímico, transportando prótons H^+ de volta pelas membranas mitocondriais (PALMQVIST e HÄHN-HÄGERDAL, 2000a; ALMEIDA *et al.*, 2007; CHANDEL, SILVA e SINGH, 2013).

Estudos realizados com a levedura *S. cerevisiae*, mostraram que compostos fenólicos de baixo peso molecular são mais tóxicos do que os de alto peso molecular. Além disso, fenóis também são responsáveis pela redução do volume de etanol produzido graças à sua hidrofobicidade (KLINKE *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007).

2.4.3 Ácidos orgânicos

A grande quantidade e variedade de produtos de degradação formados está diretamente relacionada ao tipo de biomassa, ao método e às condições de pré-tratamento utilizados. O aumento da severidade do tratamento promove a degradação dos açúcares solubilizados (principalmente hemicelulósicos) em derivados de furano ou em produtos secundários de degradação, especialmente ácidos orgânicos (como ácido levulínico e ácido fórmico). O ácido acético e os ácidos urônicos não são produtos de degradação do açúcar, mas são liberados como resultado da hidrólise da hemicelulose.

Embora a formação desses compostos possa ser minimizada através da otimização do pré-tratamento, seus efeitos inibidores em enzimas e/ou microrganismos tornam-se mais evidentes com carga elevada ou quando se acumulam devido à recirculação da água de processamento. Embora os mecanismos sejam diferentes e dependam da estrutura química dos inibidores, os produtos secundários de degradação afetam a fisiologia celular do microrganismo fermentador, frequentemente resultando em menor viabilidade celular, produção de etanol e produtividade (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a, 2000b; Zaldivar, Nielsen e Olsson, 2001).

2.5 Destoxificação

Para garantir a eficiência da produção e reduzir os efeitos dos compostos inibidores, é necessário realizar um tratamento de destoxificação. Diversas técnicas foram desenvolvidas, incluindo métodos físicos, como evaporação; métodos químicos, como o uso de hidróxido de cálcio (CaOH), neutralização, resinas de troca iônica ou adsorção por carvão ativado; e métodos biológicos, com uso de microrganismos ou enzimas (CHANDEL, SILVA e SINGH, 2013).

Cada microrganismo suporta a presença de compostos tóxicos de maneiras diferentes, por isso a escolha do método de destoxificação deve basear-se no nível de tolerância da levedura utilizada (CHANDEL *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2019).

Apesar dos benefícios, esse procedimento tende a aumentar os custos de produção. Portanto, utilizar microrganismos tolerantes aos inibidores é essencial para o sucesso do processo fermentativo, evitando a necessidade de destoxificação

(YUAN, GUO e HWANG, 2017; LIU *et al.*, 2019; CHANDEL *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2020).

2.6 Fermentação

Após a hidrólise, onde os açúcares fermentáveis são liberados, ocorre a fermentação. Se os valores de pH e temperatura estiverem adequados ao microrganismo utilizado e a presença de inibidores estiver controlada, a fermentação pode ocorrer normalmente. Durante a fermentação, microrganismos como leveduras metabolizam os açúcares, resultando na produção de etanol e dióxido de carbono. Além de etanol e CO₂, outros compostos também são produzidos, como glicerol e ácido acético, entre outros (LIMA *et al.*, 2001; BAPTISTA *et al.*, 2021; MARTINEZ-JIMENEZ *et al.*, 2021).

Para obter o máximo rendimento na fermentação, é necessário que o inóculo seja preparado adequadamente, sem contaminantes que possam prejudicar a eficiência do processo. O mosto também deve ser preparado com cuidado, garantindo as condições ideais de pH, temperatura, concentração de oxigênio (O₂) e substrato. A presença de contaminação bacteriana deve ser evitada, pois esses microrganismos podem competir com as leveduras, reduzindo o rendimento da produção (BAPTISTA *et al.*, 2021).

Para garantir uma boa eficiência na fermentação, é essencial estabelecer as condições ótimas para o crescimento dos microrganismos, além de considerar as características da cepa utilizada, como alta viabilidade, baixa produção de glicerol, baixa formação de espuma e tolerância a pH ácido, temperaturas elevadas e altos teores de açúcares e álcool (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2017).

2.7 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares dos filos Ascomycota e Basidiomycota, que crescem de forma assexual principalmente por brotamento ou fissão binária, sem formar estados sexuais em um corpo de frutificação (KURTZMAN *et al.*, 2011). As leveduras têm uma história importante no desenvolvimento de biotecnologias, sendo fundamentais em processos fermentativos na indústria alimentícia, farmacêutica e química (JOHNSON e ECHAVARRI-ERASUN, 2011; ABREU *et al.*, 2015). Elas são

os principais produtores de produtos biotecnológicos, superando outros microrganismos industriais em produção, capacidade e receita econômica (KURTZMAN *et al.*, 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na fermentação alcoólica, mas, apesar de utilizar todos os açúcares C6 das biomassas lignocelulósicas, não consegue fermentar açúcares C5 (TOMÁS-PEJÓ, BONANDER e OLSSON, 2014). Nesse contexto, fungos e bactérias com metabolismo xilulolítico são excelentes opções para a produção de bioetanol 2G. A busca por processos tecnológicos melhores e maior rendimento industrial tem incentivado a procura por leveduras que fermentam D-xilose, resultando na descrição de novas espécies com essa habilidade (VARIZE *et al.*, 2018). Embora muitas leveduras metabolizem xilose, apenas cerca de 1% podem fermentar xilose em etanol (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

A escolha da linhagem de levedura é crucial para uma produção eficiente de etanol (MOREIRA *et al.*, 2015). Os gêneros de leveduras que fermentam xilose diretamente incluem *Pichia*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Clavispora* e *Pachysolen* (MCMILLAN, 1993). Leveduras do gênero *Pichia* são encontradas em habitats naturais e como contaminantes em diversos alimentos, bebidas e produtos com alto teor de açúcar. Algumas espécies podem utilizar os ácidos orgânicos presentes em conservas, causando problemas de deterioração desses alimentos (GAVA *et al.*, 2008).

2.8 *Pichia membranifaciens*

P. membranifaciens é a espécie-tipo do gênero *Pichia* usada para definir o clado. É uma levedura amplamente distribuída na natureza, considerada um microrganismo de degradação de alimentos e bebidas, encontrada em materiais vegetais, frutas estragadas e bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011). *P. membranifaciens* já foi isolada de mostos de maçãs e uvas destinados à produção de vinhos (LORENZINI *et al.*, 2023; FAN *et al.*, 2023), mostos de agave para produção de tequila (GALLEGOS-CASILLAS *et al.*, 2023), identificada como agente de controle biológico de doenças de pós-colheita de diversas frutas (GRAMISCIÀ *et al.*, 2018), parte da microbiota de Kefir (MOURE *et al.*, 2023), entre outros.

Cepas desta espécie que metabolizam e fermentam açúcares de cinco e seis carbonos já foram descritas na literatura (HOLLUPI, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019). Esta levedura já foi relatada como tolerante à ácido orgânicos, sendo encontradas linhagens que resistiram até 30 g.L⁻¹ de ácido acético em soluções de vinagre e 12 g.L⁻¹ em processo fermentativo de etanol de segunda geração (ŠTORNIK *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2019).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. D. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.
- ACHINAS, S.; EUVERINK, G. J. W. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 44-53, 2016.
- ALMEIDA, J. R. M. *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.
- ARANTES, J. T. **Descoberta na Amazônia enzima-chave para obtenção do etanol de segunda geração**. Agência FAPESP, 11 de maio 2018. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/descoberta-na-amazonia-enzima-chave-para-obtencao-do-etanol-de-segunda-geracao/27778/>. Acesso em: 13 jan. 2023
- AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 10, p. 52-61, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, 52:858–875, 2011.
- BAPTISTA, S. L.; COSTA, C. E.; CUNHA, J. T.; SOARES, P. O.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of top value chemicals from biorefinery carbohydrates. **Biotechnology Advances**, v. 47, p. 107697, 2021.

BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. n.25. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial, 34p., 2007.

BRACMORT, K. The renewable fuel standard (RFS): an overview. 2020.

CAMBI, R. C. *et al.* Produção de etanol de 2^a geração a partir de materiais lignocelulósicos. **Revista de Casos e Consultoria**, v. 8, n. 1, 2017.

CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

CARNEIRO, A. C. G. **Uma análise econômica de mudanças no uso da terra e produção de matéria-prima do etanol no Brasil: o papel da disponibilidade de água para o setor de irrigação**. 2015. 135 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, 2015.

CASTRO, H. F. **Processos Químicos Industriais II: Indústria Alcooleira**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena – EEL, 2013.

CECCATO-ANTONINI, S.R. *et al.* Yeast for pentose fermentation: isolation, screening, performance, manipulation, and prospects. CHAPTER 08 In: Buckeridge, M.S.; De Souza, A.P. (Eds.) **Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane**. Springer, p.133-157, 2017. CHANDEL, A. K. *et al.* Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology, Amsterdam**, v. 98, n.10, p. 1947-1950, 2007. CHANDEL, A. K.; ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; CHUNDAWAT, S. P.; PURI, M.; MEIRELES, M. A. A. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, 2019.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *Bioenerg. Res.*, v.6, p. 388-401, 2013. FAN, T.; QU, J.; WANG, L.; ZHANG, J.; YANG, X.; ZHANG, H.; QIN, Y.; TAO, Y.; JIN, G. Genome sequencing, assembly, and characterization of *Pichia fermentans* Z9Y-3 as a non-*Saccharomyces* yeast with

aroma enhancing potential. **Food Bioscience**, v. 53, 2023, p. 102701. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102701>.

FERNANDES JÚNIOR, A. R. **Seleção de famílias e clones de cana energia**. 2017. 76 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, 2017.

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. **Rev. Conexão Eletrônica**, v. 12, n. 1-2015, 2015.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 108, p. 41-65, 2007.

GALLEGOS-CASILLAS, P.; GARCÍA-ORTEGA, L. F.; ESPINOSA-CANTÚ, A.; TORRES-LAGUNES, C. G.; AVELAR-RIVAS, J. A.; CANO-RICARDEZ, A.; GARCÍA-ACERO, A. M.; RUIZ-CASTRO, S.; FLORES-BARRAZA, M.; CASTILLO, A.; *et al.* Yeast diversity in open agave fermentations across Mexico. **bioRxiv**, preprint 2023.07.02.547337, 2023. doi: <https://doi.org/10.1101/2023.07.02.547337>

GHOSH, S.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Sustainability of cereal straws for the fermentative production of second generation biofuels: A review of the efficiency and economics of biochemical pretreatment processes. **Applied Energy**, v. 198, p. 284–298, 2017.

Gramiscia, B. R.; Lutz, M. C.; Lopes, C. A.; Sangorrina, M. P. (2018) Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. **Biological Control**, v. 121, p. 151-158, 2018.

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

HAMELINCK, C.N., *et al.* Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384–410, 2005.

HOLLUPI, N. T. **Isolamento, caracterização e identificação de leveduras do ecossistema de produção do sorgo sacarino**. 2015. 58 f. Monografia (Graduação)

- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2015.

HUANG, C.; ZHENG, Y.; LIN, W.; SHI, Y.; HUANG, G.; YONG, Q. Removal of fermentation inhibitors from pre-hydrolysis liquor using polystyrene divinylbenzene resin. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-14, 2020.

JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C.. Yeast biotechnology. In: **The yeasts**. Elsevier, 2011. p. 21-44.

JÖNSSON, L. J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-10, 2013.

KIM, Y.; KREKE, T.; KO, J. K.; LADISCH, M. R. Hydrolysis-determining substrate characteristics in liquid hot water pretreated hardwood. **Biotechnology and bioengineering**, v. 112, n. 4, p. 677-687, 2015.

KLINKE, H. B. *et al.* Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 81, p. 738-747, 2003.

KURTZMAN, C. P. *Pichia* E.C. Hansen (1904). In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT; T. (Eds.). **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier Science, 2011.

LARSSON, S. *et al.* Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 84, p. 617-632, 2002.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LI, H.; PU, Y.; KUMAR, R.; RAGAUSKAS, A. J.; WYMAN, C. E. Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 485-492, 2014.

LIU, C. G.; XIAO, Y.; XIA, X. X.; ZHAO, X. Q.; PENG, L.; SRINOPHAKUN, P.; BAI, F. W. Cellulosic ethanol production: progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 3, p. 491-504, 2019.

LOPES, J. G.; SANTOS, K. C.; COSTA, A. A. Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 3, p. 590-590, 2017.

LORENZINI, M.; CAPPELLO, M. S.; ANDREOLLI, M.; ZAPPAROLI, G. Characterization of selected species of *Pichia* and *Candida* for their growth capacity in apple and grape must and their biofilm parameters. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac028>

LUO, Y. *et al.* The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. **Catalysis Today**, v. 319, p. 14-24, 2019.

LYU, X.; BOTTE, G. G. Investigation of factors that inhibit furfural production using metal chloride catalysts. **Chemical Engineering Journal**, v. 430, 2021.

MALAV, M. K. *et al.* Furfural and 5-HMF: Potent fermentation inhibitors and their removal techniques. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 6 n. 3, p. 2060-2066, 2017.

MARTINEZ-JIMENEZ, F. D.; NEITZEL, T.; BIAZI, L. E.; PEREIRA, I. O.; SANTOS, L. V., COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Exploiting the non-conventional yeast *Spathaspora passalidarum* as a platform for hemicellulosic hydrolysate conversion into bioproducts: a mini review. **BioEnergy Research**, v. 14, p. 689-708, 2021.

MATSUOKA, S.; KENNEDY, A. J.; SANTOS, E. G. D. D.; TOMAZELA, A. L.; RUBIO, L. C. S. Energy cane: its concept, development, characteristics, and prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, n. 1, p. 597275, 2014.

MCMILLAN, J. D. **Xylose fermentation to etanol - A review**. National Renewable Energy Lab: 1993.

MORAIS, P. P.; PASCOAL, P. V. V. P.; ROCHA, E. D. S. D. S.; MARTINS, E. C. A. **Etanol de 2ª geração: atual produção e perspectivas**. Bioenergia em revista: diálogos, v. 7, n. 1, p. 45-57, 2017.

MOREIRA, C. S.; SANTOS, M. D. S. M.; BARROS, N. S.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. Evaluation of morphological and physiological parameters of industrial yeast strains with potential biotechnological for the production of ethanol. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 55, 2015.

MOURE, M. C.; TORRADO, R. P.; GARMENDIA, G.; VERO, S.; QUEROL, A.; ALCONADA, T.; PELÁEZ, A. L. Characterization of kefir yeasts with antifungal capacity against *Aspergillus* species. **International Microbiology**, v. 26, p. 361-370, 2023.

MYAT, LIN; RYU, G. Pretreatments and factors affecting saccharification and fermentation for lignocellulosic ethanol production. **Cellulose Chem. Technol**, v. 50, n. 2, p. 177-188, 2016.

NOGUEIRA, L. A. H. **Bioálcool de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Banco Nacional de Desenvolvimento e Economia Social - BNDES e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, Rio de Janeiro, 2008.

OSMANI, A.; ZHANG, J. Multi-period stochastic optimization of a sustainable multi-feedstock second generation bioethanol supply chain– A logistic case study in Midwestern United States. **Land use policy**, v. 61, p. 420-450, 2017.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000b.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000a.

PEREIRA, S. C. *et al.* 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 1-16, 2015.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330-340, 2017.

RIBEIRO, N. N. **Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2019.

RIBEIRO, N. N.; FREITA, L. A.; TRALLI, L. F.; SILVA, A. F.; FREITA, C. M.; MENDES, F. Q.; TEIXEIRA, V.; SILVA JUNIOR, C. N.; MUTTON, M. J. R. Otimização das

condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 720–728, 2019.

RODIONOVA, M. V.; POUDYAL, R. S.; TIWARI, I.; VOLOSHIN, R. A.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; NAM, H. G.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Biofuel production: challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8450-8461, 2017.

SILVA, A. A. **Otimização do pré-tratamento ácido de torta de caroço de algodão e bagaço de malte com farinha de pupunha para produção de bioetanol de segunda geração**. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2012.

SILVA, MARIANA REZENDE. **Mandatos de biocombustíveis e crescimento da demanda mundial de etanol: Efeitos sobre a economia brasileira**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Economia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.

SILVEIRA, N. M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F. C.; PELEGRINO, M. T.; MIRANDA, M. T.; SEABRA, A. B.; RIBEIRO, R. V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v. 244, p. 181-190, 2016.

ŠTORNIK, A.; SKOK, B.; TRČEK, J. Comparison of cultivable acetic acid bacterial microbiota in organic and conventional apple cider vinegar. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 113–119, 2016.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TOMÁS-PEJÓ, E.; BONANDER, N.; OLSSON, L. Industrial yeasts strains for biorefinery solutions: constructing and selecting efficient barcoded xylose fermenting strains for ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 5, p. 626-634, 2014.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnol.** v. 30, p. 1458–1480, 2012. VARIZE, C. S.; CADETE, R. M.; LOPES, L. D.; CHRISTOFOLETI-FURLAN, R. M.; LACHANCE,

M. A.; ROSA, C. A.; BASSO, L. C. *Spathaspora piracicabensis* fa, sp. nov., ad-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 525-531, 2018. WANG SHIZENG, W. S.; CHENG GANG, C. G.; JOSHUA, C.; HE ZIJUN, H. Z.; SUN XINXIAO, S. X.; LI RUIMIN, L. R.; YUAN QIPENG, Y. Q. **Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis***. 2016.

WANG, S. *et al.* Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p. 250, 2016.

XU, F.; SUN, J.; KONDA, N. M.; SHI, J.; DUTTA, T.; SCOWN, C. D.; SINGH, S. Transforming biomass conversion with ionic liquids: process intensification and the development of a high-gravity, one-pot process for the production of cellulosic ethanol. **Energy & Environmental Science**, v. 9, n. 3, p. 1042-1049, 2016.

XU, Y.; WANG, D. Integrating starchy substrate into cellulosic ethanol production to boost ethanol titers and yields. **Applied Energy**, v. 195, p. 196-203, 2017.

YUAN, S. F.; GUO, G. L.; HWANG, W. S. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1581-1590, 2017.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZHENG, J.; REHMANN, L. Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 10, p. 18967-18984, 2014.

ZHENG, Y.; LEE, C.; YU, C., CHENG; Y. S., ZHANG; R., JENKINS; B. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. **Applied Energy**, v. 105, p. 1-7, 2013.

ZHU, Y.; WU, L.; ZHU, J.; XU, Y.; YU, S. Transcriptome and metabolome analysis of *Pichia stipitis* to three representative lignocellulosic inhibitors. **Archives of microbiology**, v. 201, p. 581-589, 2019.

Capítulo 2 - TOLERÂNCIA DE *Pichia membranifaciens* LJ04 A INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

RESUMO

Denominado etanol de segunda geração, o biocombustível proveniente da utilização de biomassa pode ser produzido por diversas tecnologias promissoras. A celulose e a hemicelulose são os constituintes da matéria-prima vegetal de maior interesse, pois quando hidrolisados liberam açúcares monoméricos que podem ser fermentados por alguns microrganismos. Para quebra da hemicelulose é necessário a realização de pré-tratamento, sendo a hidrólise ácida a mais recomendada para resíduos agroindustriais. No entanto, a despolimerização desta estrutura não disponibiliza somente carboidratos simples; ao longo do processo é comum que compostos tóxicos ao metabolismo fermentativo das leveduras sejam liberados. Desta forma, a realização da destoxificação (purificação) do hidrolisado apresenta-se como etapa essencial ao processo. Entretanto, apesar de benéfica, esta operação acarreta no aumento do custo e tempo na produção deste biocombustível. Neste contexto, o estudo de leveduras que se mantêm viáveis sob níveis elevados destes componentes tóxicos sem perda de eficiência fermentativa é extremamente importante. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento fisiológico e fermentativo de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de inibidores da fermentação para a produção de etanol 2G. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema de parcelas Sub-subdivididas (Split-Split-Plot), com 3 repetições. Os tratamentos principais foram caracterizados pelos inibidores da fermentação (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico), os secundários as doses (0 g.L^{-1} , $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, $2,0 \text{ g.L}^{-1}$, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$) e os terciários aos tempos (0, 6, 12 e 24h). As avaliações dos parâmetros microbiológicos (viabilidade celular, índice brotamento e viabilidade dos brotos) da fermentação foram realizadas em Câmara de Neubauer e as concentrações de Glicose, Xilose, Glicerol, Etanol e Ácido acético determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC). *P. membranifaciens* LJ04 não apresentou inibição total em seu metabolismo de crescimento celular e fermentativo na presença de teores de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico na ordem de

0,5 à 3,0 g.L⁻¹. A levedura se manteve viável em todas as doses testadas de furfural, HMF e ácido levulínico durante as 24 h de fermentação. Furfural foi a única substância que não apresentou diferença estatística no teor alcoólico com o aumento de suas doses ao meio fermentativo.

Palavras-chaves: Ácido fênico, Ácido levulínico, Furfural, Hidroximetilfurfural, Hidrolisado hemicelulósico, Leveduras não-convencionais.

1. INTRODUÇÃO

A produção de etanol de segunda geração apresenta-se como opção viável e promissora para o aumento do volume de biocombustíveis produzidos sem que haja a necessidade da expansão de terras cultiváveis (LIU *et al.*, 2019). É uma alternativa atraente para usinas e destilarias pois é produzido por meio do processamento de material lignocelulósico. Desta forma, a matéria-prima encontra-se disponível em abundância durante todo o ano em virtude do grande volume de resíduos agroindustriais produzidos pelas indústrias, como por exemplo: bagaço, palha, cascas, caules, pedúnculos e folhas (KORDALA *et al.*, 2022).

Independentemente da matéria-prima vegetal utilizada, é extremamente importante que a biomassa passe por tratamentos para que ocorra a quebra da estrutura complexa de celulose, hemicelulose e lignina que a compõe (BORGES *et al.*, 2021; SATO *et al.*, 2019). Existem diversas metodologias capazes de realizar a despolimerização da estrutura cristalina de materiais vegetais. As técnicas de pré-tratamento eficientes que aumentam a digestibilidade da celulose e hemicelulose, podem ser alcançadas por meio de tratamento físico, químico, biológico ou suas combinações (ESPIRITO-SANTO, 2020).

A maioria das pesquisas atuais priorizam a obtenção do hidrolisado celulósico, sem estudar efetivamente um uso para o hidrolisado hemicelulósico obtido durante o pré-tratamento (BRONZATO *et al.*, 2017; BRONZATO *et al.*, 2018; BRONZATO *et al.*, 2019; DONINI *et al.* 2020; SILVA *et al.*, 2020; BRONZATO, 2021). Consequentemente apenas a fração celulósica da biomassa é fermentada, ficando a fração hemicelulósica subaproveitada ou desprezada (PEREZ *et al.*, 2022).

Presente nas biomassas em geral, a hemicelulose é constituída por diferentes substâncias, dentre elas açúcares de cinco carbonos como a D-xilose e L-arabinose.

A D-xilose é o segundo açúcar mais abundante nos materiais lignocelulósicos e corresponde a cerca de 81% de todos os açúcares produzidos durante o pré-tratamento (LI, CHEN e NIELSEN, 2019; KORDALA *et al.*, 2022). A vista disso, a busca por melhores processos tecnológicos e maiores rendimentos industriais têm incentivado a procura por leveduras capazes de fermentar D-xilose, assim como, a pesquisa por pré-tratamentos eficientes que disponibilizem altas concentrações de pentoses (SEWSYNKER-SUKAI, NAOM-DAVID e GUEGUIM-KANA, 2020).

De acordo com relatos da literatura, a hemicelulose presente nas biomassas lignocelulósicas de resíduos agrícolas é mais propensa a despolimerizar em condições ácidas com aquecimento (GHOSH *et al.*, 2017; XU e WANG, 2017; ZHENG *et al.*, 2013). Entretanto, durante a condução desse processo parte dos açúcares obtidos podem ser degradados e dar origem a moléculas indesejáveis que podem afetar o microrganismo fermentador, entre eles: furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural [HMF]), ácidos orgânicos (ácido levulínico, ácido fórmico e ácido acético) e compostos fenólicos (ácido p-cumárico, vanilina, ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, álcool coniferílico e aldeído coniferílico) (VANMARCKE *et al.*, 2021). Tais substâncias são conhecidas por afetar a permeabilidade da membrana das leveduras, diminuir o crescimento celular e a produção de etanol (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a, 2000b). Desta forma, a realização da purificação ou detoxificação mostra-se benéfico e, por vezes, necessário. Entretanto, a remoção de compostos tóxicos gerados durante este processo aumenta o custo do tratamento e, conseqüentemente, o custo de produção (FREITA, 2020; JOFRE, 2019).

A escolha do microrganismo que realizará a fermentação é, portanto, o fator determinante para obtenção de um processo fermentativo eficiente. Atualmente se faz necessário que a levedura possua, além da capacidade de metabolizar pentoses e hexoses, tolerância as substâncias inibidoras produzidas durante o pré-tratamento. *Pichia membranifaciens* é uma levedura normalmente encontrada em materiais vegetais, frutas em decomposição e bebidas fermentadas (KURTZMAN, 2011). Cepas desta espécie que metabolizam e fermentam açúcares de cinco e seis carbonos já foram descritas na literatura (HOLLUPI, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019). Esta levedura já foi relatada como tolerante à ácido orgânicos, sendo encontradas linhagens que

resistiram até 30 g.L⁻¹ de ácido acético em soluções de vinagre (ŠTORNIK *et al.*, 2016) e 12 g.L⁻¹ durante a produção de etanol de segunda geração (RIBEIRO, 2019).

A produção comercial de bioetanol de segunda geração a partir de material lignocelulósico ainda está em desenvolvimento. À vista disto, diversos desafios precisam ser resolvidos. Neste contexto, o estudo do processo fermentativo empregando leveduras não-convencionais (que não pertencem ao gênero *Saccharomyces*) em hidrolisados hemicelulósicos contendo inibidores da fermentação mostra-se importante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Pichia membranifaciens LJ04 (Figura 1) foi obtida por cultura estoque mantida à 4°C no banco de leveduras do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Cepa isolada a partir de amostras de solo coletadas em uma ambiente produtivo de sorgo sacarino (HOLLUPI, 2015) e identificada de acordo com os procedimentos descritos em Silva (2019).

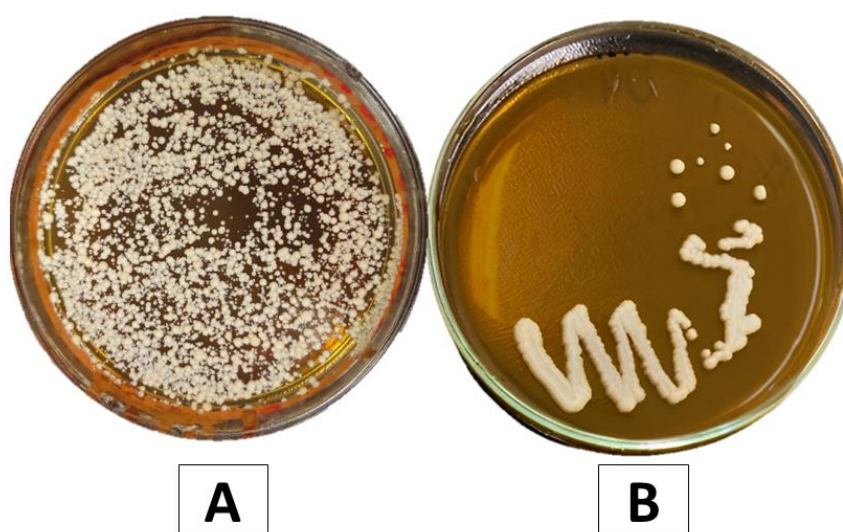


Figura 1 - *Pichia membranifaciens* LJ04 cultivada em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose e ágar). A) Placa inoculada pelo método de espalhamento (Spread-Plate). B) Placa inoculada pelo método de semeadura em estrias. Fonte: De autoria própria.

2.2 Preparo do inóculo

Para reativação e preparo do inóculo foi preparado meio YPXD: 20 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de xilose (GOVINDASWAMY e VANE, 2007). Uma alça da cultura estoque (levedura pura) foi transferida para frascos erlenmeyers (500 mL) contendo 250 mL de meio.

Em seguida, os frascos foram incubados durante intervalo de 72 horas à temperatura de 32°C e agitação orbital de 125 rpm. Ao final desse período, o meio de cultura foi centrifugado e a fração líquida descartada. Por fim, a massa celular obtida foi suspensa em solução salina (NaCl 0,85%) e armazenada à 4°C. Todos os procedimentos foram repetidos até se obter massa celular necessária para a realização dos ensaios fermentativos.

2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema de parcelas Sub-subdivididas (Split-Split-Plot), com 3 repetições. Os tratamentos principais foram caracterizados pelos inibidores da fermentação (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico), os secundários as doses (0 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹, 1,5 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 2,5 g.L⁻¹ e 3,0 g.L⁻¹) e os terciários aos tempos (0, 6, 12 e 24h).

2.4 Preparo do hidrolisado hemicelulósico sintético

Para realização do processo fermentativo, preparou-se mosto sintético contendo 45 g.L⁻¹ de xilose e 25 g.L⁻¹ de glicose. Tal procedimento objetivou a reprodução de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado, obtido a partir de pré-tratamento ácido com H₂SO₄ à 0,5% m.v⁻¹. Como fontes de nutrientes foram adicionados 1,43 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,35 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄.H₂O, 0,68 g.L⁻¹ de K₂SO₄, 0,47 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,03 g.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O, 0,04 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O (PAVANI *et al.*, 2013; RIBEIRO, 2019) e 1,20 g.L⁻¹ de extrato de levedura (SILVA, 2019); todos com pureza de 99%. Para ajuste de pH, foi adicionada solução diluída de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 0,05%) até 4,5±0,05.

O meio sintético foi esterilizado por calor úmido utilizando-se autoclave (120°C, 1 atm, 20 min) e as substâncias inibidoras (furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e

ácido levulínico) por filtração em membrana filtrante PVDF hidrofílica, com diâmetro de 25 mm e porosidade de 0,22 micras (Millipore, EUA).

Posteriormente, os inibidores da fermentação foram adicionados aos frascos de fermentação nas concentrações de 0 g.L⁻¹, 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹, 1,5 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 2,5 g.L⁻¹ e 3,0 g.L⁻¹ (GONÇALVES, SANTOS e MACEDO, 2015; FIELD *et al.*, 2015), de acordo seu respectivo tratamento.

2.5 Processo fermentativo

Após centrifugação do inóculo suspenso em solução salina, *P. membranifaciens* LJ04 foi adicionada à frascos (erlenmeyers) de 100 mL com massa correspondente a 3 g.L⁻¹ de levedura seca (concentração celular de 10⁸ células.mL⁻¹).

Foram realizadas duas alimentações de 25 mL de mosto a cada 40 minutos para permitir a adaptação da levedura ao substrato, obtendo-se um volume final de 50 mL de hidrolisado hemicelulósico sintético.

Os frascos foram incubados por 24 horas em mesa agitadora à 32°C e controle de rotação de 125 rpm, condições ideais estabelecidas em trabalho anterior (RIBEIRO *et al.*, 2019).

2.6 Métodos analíticos e quantitativos

Para acompanhamento do comportamento da levedura na presença de inibidores, cerca de 2 mL de meio sintético foram retirados em intervalos de tempo pré-determinados. Alíquotas do mosto inoculado foram coletadas ao início do processo fermentativo (0h), enquanto amostras de vinho após 6, 12 e 24h (fim da fermentação).

2.7 Análises microbiológicas

A determinação da viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos foi realizada em câmara de Neubauer pelo método de Lee, Robinson e Wang (1981).

A biomassa (g.L⁻¹) produzida durante a fermentação foi determinada com base na relação entre absorbância e peso seco da levedura (massa celular seca até peso

constante). Para isto, o crescimento celular foi monitorado por espectrofotometria quantificando-se a absorbância à 600 nm (SOARES *et al.*, 2020).

2.8 Análise cromatográfica

Após a coleta, as alíquotas de mosto e vinho destinadas à cromatografia foram centrifugadas à 500 rpm por 5 min. Os sobrenadantes obtidos foram diluídos (1:10) e armazenados à -4°C.

Para garantir que não houvesse qualquer matéria estranha que pudesse interferir ou danificar o equipamento durante as análises, as amostras foram passadas em filtro com recheio de sílica (Sep-Pak tC18 Plus Short, com porosidade de 125 Å e retenção de partículas com 37-55 µm), recomendado para preparo de amostras cromatográficas.

As concentrações de xilose, glicose, glicerol, ácido acético e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japão), usando um detector de índice de refração e um Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) Coluna Aminex HPX-87H à 45°C, com H₂SO₄ 0,01 N como eluente, com vazão de 0,6 mL.min⁻¹ (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

2.9 Análise cinética

O modelo matemático de Monod é formado por três equações diferenciais ordinárias de 1ª ordem e 1º grau evolutivas, não-lineares. Dentre elas, a Equação 1 permite determinar a função $\mu_x = \mu_x(t)$ para cálculo da velocidade específica de crescimento (μ_x).

$$(1) \quad \frac{dX}{dt} = \mu_x X$$

Simplificando este modelo, obtemos a Equação 2:

$$(2) \quad \mu_x = \frac{\frac{dX}{dt}}{X} \cong \frac{\frac{\Delta X}{\Delta t}}{X} = \frac{\frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}}{X}$$

Considerando-se diferentes limites iniciais e finais de tempo, gráficos de dispersão com linha de tendência linear foram traçados para valores de

‘**ln(biomassa) X tempo**’ para cada dose e inibidor testado, assim como, na sua ausência.

Os gráficos que exibiram melhores coeficientes de correlação (r^2), foram escolhidos para representar a fase exponencial de crescimento da levedura (Apêndice A). Por fim, o coeficiente angular de cada reta foi determinado para estabelecimento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) de *P. membranifaciens* LJ04.

As velocidades de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) foram determinadas de acordo com as Equações 3 e 4:

$$(3) \quad Q_g = \frac{[g]_0 - [g]_f}{t}$$

$$(4) \quad Q_x = \frac{[x]_0 - [x]_f}{t}$$

Onde:

Q_g : velocidade de consumo de glicose ($g.L^{-1}.h^{-1}$); **$[g]_0$** : concentração inicial de glicose ($g.L^{-1}$); **$[g]_f$** : concentração final de glicose ($g.L^{-1}$); **t** : tempo de fermentação (h); **Q_x** : velocidade de consumo de xilose ($g.L^{-1}.h^{-1}$); **$[x]_0$** : concentração inicial de xilose ($g.L^{-1}$); **$[x]_f$** : concentração final de xilose ($g.L^{-1}$).

Os rendimentos de etanol ($Y_{P/S}$) e biomassa ($Y_{X/S}$) foram determinados com base no consumo de glicose e xilose de acordo com as Equações 5 e 6.

$$(5) \quad Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

$$(6) \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Onde:

$Y_{X/S}$: rendimento de crescimento celular baseado no consumo de substrato (g biomassa/g substrato); **$Y_{P/S}$** : rendimento do produto (etanol) com base no consumo de substrato (g etanol/g substrato); **X** : concentração celular final ($g.L^{-1}$); **X_0** : concentração celular inicial ($g.L^{-1}$); **P** : concentração máxima de etanol ($g.L^{-1}$); **P_0** : concentração inicial de etanol ($g.L^{-1}$); **S** : concentração final do substrato ($g.L^{-1}$); **S_0** : concentração inicial do substrato ($g.L^{-1}$).

2.10 Análise dos dados

O software Microsoft Excel 2019 MSO (versão 2302 Build 16.0.16130.20332) foi utilizado para traçar gráficos de curva de crescimento (Apêndice A) e calcular o desvio padrão dos dados de cinética fermentativa. Os demais resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e de comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o Software AgroEstat (BARBOSA e MALDONADO JUNIOR, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito dos inibidores na cinética fermentativa

Os impactos ocasionados por diferentes doses de substâncias inibidoras do processo fermentativo (furfural, hidroximetilfurfural [HMF], ácido fênico e ácido levulínico) na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica crescimento (μ_x), produção de biomassa, velocidade de consumo de glicose, velocidade de consumo de xilose, rendimento em biomassa e rendimento em etanol de *P. membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos, foram analisados e quantificados durante período de 24 h. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

A Tabela 1 demonstra que entre as moléculas testadas, furfural foi a substância que mais afetou o crescimento de *P. membranifaciens*. Este comportamento foi evidenciado pela diminuição significativa da velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) da levedura na presença da menor dose testada ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), e confirmado pela redução da biomassa produzida conforme aumento da concentração desse composto orgânico no meio (23,27% para $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e 81,05% para $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural).

Furfural é um produto obtido da degradação de açúcares de cinco carbonos que foram despolimerizados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico (VANMARCKE *et al.*, 2021; BHAVANA *et al.*, 2022). Durante este processo é normal que parte dos carboidratos deem origem a substâncias indesejáveis, não sendo possível garantir a quebra de sua estrutura com ausência de coprodutos de decomposição (HEER, HEINE e SAUER, 2009). Dentre as substâncias tóxicas produzidas durante o pré-tratamento, furfural é um dos compostos que mais afetam o

crescimento celular de leveduras, podendo inibir completamente a produção de biomassa dependendo da concentração presente no substrato (BANUVALLI *et al.*, 2022).

Tabela 1 - Efeitos de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica crescimento (μ_x), biomassa produzida e velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h.

Inibidores	Doses (g.L ⁻¹)	Velocidade específica máxima de crescimento (μ_m , h ⁻¹)	t_{μ_m} ^A (h)	Velocidade específica de crescimento (μ_x , h ⁻¹)	Biomassa produzida ^B (g.L ⁻¹)	Q_g (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Q_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Furfural	0,0	0,021 ±0,001	0-12	0,014±0,002	1,182±0,104	1,030±0,001	0,402± 0,012
	0,5	0,013 ±0,006	0-24	0,012 ±0,007	0,907±0,109	1,030±0,002	0,346± 0,003
	1,0	0,011 ±0,003	0-24	0,010 ±0,005	0,493±0,162	1,026±0,001	0,346± 0,001
	1,5	0,015 ±0,006	0-12	0,012 ±0,014	0,777±0,109	1,026±0,001	0,360± 0,003
	2,0	0,006 ±0,004	0-24	0,006 ±0,004	0,477±0,149	1,029±0,002	0,378± 0,002
	2,5	0,006 ±0,004	0-12	0,006 ±0,005	0,430±0,196	1,025±0,002	0,411± 0,000
	3,0	0,004 ±0,000	0-24	0,006 ±0,006	0,224±0,029	1,024±0,001	0,329 ± 0,001
HMF	0,0	0,021 ±0,001	0-12	0,014±0,002	1,182±0,104	1,030±0,001	0,402± 0,012
	0,5	0,017 ±0,000	0-12	0,013 ±0,000	1,042±0,126	1,032±0,001	0,393± 0,002
	1,0	0,034 ±0,005	0-12	0,020 ±0,004	1,377±0,182	1,037±0,003	0,379± 0,002
	1,5	0,037 ±0,012	0-12	0,020 ±0,006	1,425±0,169	1,034±0,001	0,417± 0,001
	2,0	0,022 ±0,006	0-12	0,013 ±0,008	1,089±0,013	1,036±0,002	0,462± 0,002
	2,5	0,015 ±0,002	0-12	0,013 ±0,001	0,988±0,142	1,036±0,001	0,382± 0,000
	3,0	0,013 ±0,006	0-24	0,013 ±0,008	0,934±0,181	1,034±0,001	0,437± 0,002
Ácido fênico	0,0	0,021 ±0,001	0-12	0,014±0,002	1,182±0,104	1,030±0,001	0,402± 0,012
	0,5	0,016 ±0,002	0-12	0,017 ±0,001	0,824±0,095	1,027±0,002	0,386± 0,002
	1,0	0,011 ±0,006	0-24	0,019 ±0,010	0,767±0,186	1,025±0,002	0,416± 0,002
	1,5	0,020 ±0,006	0-24	0,020 ±0,004	1,393±0,110	1,031±0,000	0,440± 0,001
	2,0	0,028 ±0,012	0-12	0,020 ±0,002	1,510±0,086	1,023±0,001	0,365± 0,002
	2,5	0,018 ±0,001	0-12	0,012 ±0,002	1,038±0,108	1,035±0,002	0,322± 0,002
	3,0	0,018 ±0,006	0-12	0,012 ±0,003	0,943±0,080	1,044±0,001	0,321± 0,005
Ácido levulínico	0,0	0,021 ±0,001	0-12	0,014±0,002	1,182±0,104	1,030±0,001	0,402± 0,012
	0,5	0,030 ±0,006	0-12	0,014 ±0,002	1,337±0,181	1,032±0,001	0,338± 0,000
	1,0	0,034 ±0,012	0-12	0,017 ±0,015	1,393±0,164	1,029±0,004	0,354± 0,005
	1,5	0,020 ±0,006	0-12	0,023 ±0,008	1,122±0,060	1,025±0,000	0,379± 0,001
	2,0	0,014 ±0,006	0-12	0,011 ±0,007	0,801±0,109	1,031±0,002	0,366± 0,002
	2,5	0,009 ±0,003	0-12	0,009 ±0,005	0,608±0,010	1,037±0,001	0,364± 0,000
	3,0	0,006 ±0,000	0-24	0,008 ±0,001	0,459±0,180	1,034±0,001	0,290± 0,004

HMF= Hidroximetilfurfural. Desvio padrão (±) entre os dados resultantes das repetições experimentais.

^A Intervalo de tempo usado para determinação de μ_m .

^B Diferença entre os valores de biomassa em 24h e 0h de incubação.

Perna, Bastos e Ceccato-Antonini (2018), relataram que *Meyerozyma guilliermondii* CCT7783, levedura com potencial para a produção de etanol 2G, apresentou queda significativa na velocidade específica de crescimento (μ_x) na presença de apenas 0,04 g.L⁻¹ de furfural. O trabalho de Banuvalli *et al.* (2022) demonstrou que a existência de 0,25 e 0,50 g.L⁻¹ de furfural no meio fermentativo diminuiu a velocidade de crescimento de *Pichia stipitis* NCIM 3497 em 45,76% e 79,30%, respectivamente, em comparação com o controle (BANUVALLI *et al.*, 2022). A cepa de *P. membranifaciens* analisada no presente estudo, obteve diminuição a partir de 2,0 g.L⁻¹. Na prática, estes resultados expõem a maior tolerância da linhagem LJ04 a este resíduo, conseguindo se regular fisiologicamente em meios com índice de furfural 700% e 4.900% superior à *P. stipitis* NCIM 3497 e *M. guilliermondii* CCT7783, respectivamente.

Em relação ao controle, as doses entre as faixas de 1,0-1,5 g.L⁻¹ de HMF, 0,5-2,0 g.L⁻¹ de ácido fênico e 1,0-1,5 g.L⁻¹ de ácido levulínico provocaram aumento na velocidade específica de crescimento da levedura, sendo observados os maiores teores de massa celular nestes intervalos. O mesmo comportamento foi relatado para *P. stipitis* DSM 365 na presença de 0,1 g.L⁻¹ de HMF (BELLIDO *et al.*, 2011).

Em relação a massa celular, o decréscimo máximo encontrado para *P. membranifaciens* LJ04 foi de 18,95% em 3,0 g.L⁻¹ de furfural. Valor bem abaixo do encontrado para *P. stipitis* NCIM 3497 que obteve diminuição de 79,30% em meio contendo 0,5 g.L⁻¹ do mesmo inibidor (BHAVANA *et al.*, 2022). Díaz-Nava *et al.* (2022) observaram que concentrações de 1,5 g.L⁻¹ de furfural e HMF provocaram a inibição do crescimento celular de cepas de *P. kudriavzevii* em 90% e 70%, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Wannawilai *et al.* (2017), que registraram o impacto negativo de 0,3 g.L⁻¹ de furfural na velocidade específica de crescimento e concentração final de biomassa de *Candida magnoliae* TISTR 5663.

A inibição por furfural e HMF depende da concentração destes compostos no meio e da cepa utilizada. Várias proteínas que fazem parte do metabolismo fermentativo são sensíveis à furanos, podendo afetar fortemente o comportamento das enzimas centrais da glicólise e induzir a repressão das enzimas no ciclo do ácido tricarboxílico pelo consumo de NADH. Tais compostos também podem afetar o vacúolo e as membranas mitocondriais das leveduras. Desta forma, o conjunto desses

fatores levam várias células à morte celular (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b; TAHERZADEH e KARIMI, 2011; DEVI *et al.*, 2021; DÍAZ-NAVA *et al.*, 2022).

Em virtude desses dados, a ordem crescente do efeito inibitório para crescimento da levedura pode ser representada pela seguinte inequação: ácido fênico < HMF < ácido levulínico < furfural.

O consumo de glicose e xilose por *P. membranifaciens* LJ04, durante o processo fermentativo, foi quantificado por meio da concentração dos açúcares ao longo de 24 horas. Observa-se que a presença dos inibidores estudados levou a comportamentos distintos quanto a assimilação de glicose e xilose. Não houve diferença nas velocidades de metabolização de glicose entre controle e as doses das substâncias estudadas. Entretanto, a presença de moléculas de degradação diminuiu o consumo de xilose independentemente da dose testada, com velocidades bem similares (com exceção de 3,0 g.L⁻¹ de ácido levulínico).

Desempenho similar foi observado para *P. stipitis* DSM 365, que apresentou inibição do consumo de xilose quando o substrato atingiu a dose de 2 g.L⁻¹ de furfural e 0,5 g.L⁻¹ de HMF (BELLIDO *et al.*, 2011). Enquanto, *M. guilliermondii* CCT7783 demonstrou diminuição do consumo de glicose para produção de etanol a partir de 0,04 g.L⁻¹ em furfural (PERNA, BASTOS e CECCATO-ANTONINI 2018).

A Tabela 2 apresenta os impactos causados pela presença de inibidores no substrato no rendimento em biomassa e etanol por *P. membranifaciens* LJ04 entre doses de 0,5 à 3,0 g.L⁻¹. A diminuição do rendimento em biomassa ficou bastante evidente para 3,0 g.L⁻¹ de ácido levulínico e 2,5 e 3,0 g.L⁻¹ de furfural. Nestas condições, ambas as substâncias obtiveram índices de conversão de apenas 0,014 g.g⁻¹, redução de 58,82% em comparação ao controle.

Em estudos recentes, *P. stipitis* NCIM 3497 apresentou redução no rendimento de biomassa de 79,30% na presença de 0,5 g.L⁻¹ de furfural, enquanto 0,5 g.L⁻¹ de HMF reduziu o rendimento de biomassa em 15,07% (BHAVANA *et al.*, 2022). Avaliando as mesmas concentrações para *P. membranifaciens* LJ04, observou-se que não houve redução no rendimento para furfural e uma taxa de aumento de 23,53% para HMF. Desta forma, os resultados demonstram que a levedura do presente estudo apresenta uma tolerância à inibidores muito superior à outros microrganismos do mesmo gênero.

Tabela 2 - Efeitos de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico no rendimento de biomassa e etanol de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h.

Doses (g.L ⁻¹)	Tempo	FURFURAL		HIDROXIMETILFURFURAL	
		Yx/s ^a (g.g ⁻¹)	Yp/s ^b (g.g ⁻¹)	Yx/s ^a (g.g ⁻¹)	Yp/s ^b (g.g ⁻¹)
0,0	6h	0,012 ± 0,001	0,285 ± 0,023	0,012 ± 0,001	0,285 ± 0,023
	12h	0,026 ± 0,001	0,186 ± 0,021	0,026 ± 0,001	0,186 ± 0,021
	24h	0,034 ± 0,005	0,139 ± 0,007	0,034 ± 0,005	0,139 ± 0,007
0,5	6h	0,009 ± 0,002	0,262 ± 0,001	0,021 ± 0,003	0,244 ± 0,000
	12h	0,020 ± 0,003	0,196 ± 0,000	0,041 ± 0,005	0,131 ± 0,002
	24h	0,037 ± 0,007	0,154 ± 0,002	0,042 ± 0,005	0,117 ± 0,000
1,0	6h	0,007 ± 0,004	0,247 ± 0,003	0,018 ± 0,004	0,218 ± 0,002
	12h	0,016 ± 0,007	0,175 ± 0,002	0,033 ± 0,006	0,158 ± 0,002
	24h	0,028 ± 0,018	0,158 ± 0,001	0,041 ± 0,011	0,139 ± 0,002
1,5	6h	0,007 ± 0,010	0,233 ± 0,003	0,013 ± 0,009	0,196 ± 0,003
	12h	0,016 ± 0,006	0,193 ± 0,002	0,025 ± 0,015	0,162 ± 0,000
	24h	0,025 ± 0,008	0,157 ± 0,001	0,031 ± 0,009	0,146 ± 0,001
2,0	6h	0,005 ± 0,001	0,201 ± 0,000	0,009 ± 0,002	0,152 ± 0,004
	12h	0,013 ± 0,002	0,200 ± 0,003	0,017 ± 0,004	0,149 ± 0,001
	24h	0,023 ± 0,013	0,162 ± 0,003	0,029 ± 0,006	0,151 ± 0,001
2,5	6h	0,002 ± 0,000	0,218 ± 0,002	0,009 ± 0,007	0,150 ± 0,002
	12h	0,006 ± 0,003	0,187 ± 0,001	0,017 ± 0,012	0,168 ± 0,002
	24h	0,014 ± 0,010	0,156 ± 0,001	0,029 ± 0,013	0,153 ± 0,001
3,0	6h	0,003 ± 0,000	0,253 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,150 ± 0,001
	12h	0,008 ± 0,007	0,182 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,178 ± 0,002
	24h	0,014 ± 0,009	0,146 ± 0,000	0,026 ± 0,005	0,150 ± 0,000
Doses (g.L ⁻¹)	Tempo	ÁCIDO FÊNICO		ÁCIDO LEVULÍNICO	
		Yx/s ^a (g.g ⁻¹)	Yp/s ^b (g.g ⁻¹)	Yx/s ^a (g.g ⁻¹)	Yp/s ^b (g.g ⁻¹)
0,0	6h	0,012 ± 0,001	0,285 ± 0,023	0,012 ± 0,001	0,285 ± 0,023
	12h	0,026 ± 0,001	0,186 ± 0,021	0,026 ± 0,001	0,186 ± 0,021
	24h	0,034 ± 0,005	0,139 ± 0,007	0,034 ± 0,005	0,139 ± 0,007
0,5	6h	0,016 ± 0,009	0,294 ± 0,004	0,013 ± 0,017	0,275 ± 0,001
	12h	0,030 ± 0,017	0,179 ± 0,001	0,027 ± 0,003	0,193 ± 0,000
	24h	0,045 ± 0,002	0,166 ± 0,001	0,043 ± 0,031	0,158 ± 0,001
1,0	6h	0,007 ± 0,001	0,275 ± 0,003	0,016 ± 0,008	0,271 ± 0,002
	12h	0,016 ± 0,008	0,208 ± 0,001	0,031 ± 0,005	0,185 ± 0,001
	24h	0,042 ± 0,017	0,166 ± 0,002	0,034 ± 0,019	0,154 ± 0,002
1,5	6h	0,009 ± 0,002	0,235 ± 0,001	0,011 ± 0,005	0,231 ± 0,001
	12h	0,019 ± 0,003	0,184 ± 0,000	0,023 ± 0,006	0,181 ± 0,000
	24h	0,039 ± 0,000	0,123 ± 0,002	0,024 ± 0,005	0,133 ± 0,001
2,0	6h	0,012 ± 0,001	0,237 ± 0,000	0,005 ± 0,007	0,207 ± 0,002
	12h	0,023 ± 0,001	0,186 ± 0,003	0,012 ± 0,003	0,161 ± 0,000
	24h	0,028 ± 0,005	0,168 ± 0,000	0,024 ± 0,000	0,117 ± 0,001
2,5	6h	0,012 ± 0,004	0,287 ± 0,000	0,008 ± 0,010	0,194 ± 0,001
	12h	0,020 ± 0,006	0,199 ± 0,002	0,019 ± 0,008	0,158 ± 0,002
	24h	0,025 ± 0,005	0,170 ± 0,001	0,024 ± 0,015	0,087 ± 0,001
3,0	6h	0,010 ± 0,013	0,262 ± 0,002	0,001 ± 0,002	0,196 ± 0,001
	12h	0,018 ± 0,021	0,178 ± 0,002	0,006 ± 0,003	0,154 ± 0,001
	24h	0,023 ± 0,004	0,155 ± 0,002	0,014 ± 0,009	0,089 ± 0,001

Desvio padrão (±) entre os dados resultantes das repetições experimentais.

^a Rendimento de biomassa.

^b Rendimento de etanol.

Em experimentos realizados com *P. stipitis* CECT 1922 foi verificado que a presença de inibidores no substrato reduziu a produtividade de etanol em comparação aos meios contendo apenas glicose e xilose (DÍAZ *et al.*, 2009). O comportamento de *P. membranifaciens* (Tabela 2) evidencia que as altas concentrações de furfural e ácido fênico testadas não afetaram a produção de etanol. O rendimento alcoólico só passou a ser afetado por valores superiores à 1,0 g.L⁻¹ de HMF e 2,0 g.L⁻¹ ácido levulínico. Apesar disto, os decréscimos causados por estes compostos não foram proporcionais ao aumento das doses, possuindo rendimentos entre a faixa de 0,150 à 0,196 g.g⁻¹ (queda de 31,22 à 47,37%).

A tolerância a inibidores da fermentação é característica muito importante para leveduras utilizadas na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação. Os resultados demonstraram que a cepa estudada cresceu e fermentou açúcares em substratos contendo inibidores da fermentação em concentrações muito superiores, não toleradas por leveduras não-convencionais sugeridas na literatura para a produção de etanol 2G.

3.2 Análises microbiológicas

Os valores de viabilidade celular, índice de brotamento, viabilidade dos brotos e produção de massa celular foram analisados durante todo processo fermentativo. Os dados coletados encontram-se na Tabela 3.

Da análise dos resultados (Tabela 3), percebe-se que entre inibidores testados (tratamento principal) houve diferenças significativas apenas para viabilidade celular e viabilidade dos brotos na presença de ácido fênico. Quanto as doses analisadas (tratamento secundário), verifica-se que quanto maior a concentração de substâncias inibidoras maior o decréscimo da viabilidade celular e viabilidade dos brotos. Os tempos analisados (tratamento terciário) também foram significativos, com a passagem das horas notou-se a diminuição de todos os parâmetros.

As interações entre os tratamentos foram desdobradas e representadas graficamente nas Figuras 2 e 3.

Tabela 3 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para massa celular, viabilidade celular e viabilidade dos brotos de *P. membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido fênico e Ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h.

Tratamentos	Massa celular (g.L ⁻¹)	Viabilidade celular (%)	Viabilidade dos brotos (%)
<i>Tratamento primário</i>			
Inibidores			
Furfural	3,33 a	96,14 a	94,20 ab
HMF	3,38 a	96,85 a	96,03 a
Ácido fênico	3,36 a	84,71 b	85,44 b
Ácido levulínico	3,63 a	94,32 a	94,38 a
Teste F	3,41ns	22,18**	9,55*
DMS	0,44	6,8882	8,91
CV	16,69	9,6271	12,52
<i>Tratamento secundário</i>			
Doses (g.L⁻¹)			
0,0	3,50 a	96,17 ab	97,67 a
0,5	3,25 a	95,53 ab	97,39 a
1,0	3,41 a	96,46 a	94,33 ab
1,5	3,49 a	94,68 ab	94,38 ab
2,0	3,38 a	92,09 bc	93,05 ab
2,5	3,56 a	88,46 cd	83,60 c
3,0	3,41 a	87,62 d	87,19 bc
Teste F	0,57ns	15,59**	7,15**
DMS	0,62	4,24	8,92
CV	22,43	5,68	12,00
<i>Tratamento terciário</i>			
Tempos (h)			
0	2,93 d	95,82 a	97,38 a
6	3,22 c	96,72 a	97,45 a
12	3,60 b	90,57 b	90,93 b
24	3,95 a	88,91 b	84,29 c
Teste F	195,71**	49,05**	17,95**
DMS	0,12	2,04	5,29
CV	6,94	4,42	11,99
Interações			
TP x TS	0,82ns	10,56**	3,23**
TP x TT	1,53ns	22,14**	2,91**
TS x TT	0,71ns	6,73**	1,95*
TP x TS x TT	0,74ns	5,11**	1,78**

HMF = hidroximetilfurfural. **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. DMS: desvio mínimo significativo. CV: coeficiente de variação. TP x TS: Interação entre inibidores e doses. TP x TT: Interação entre inibidores e tempos. TS x TT: Interação entre doses e tempos. TP x TS x TT: interação entre inibidores, doses e tempos.

A viabilidade celular é parâmetro microbiológico importante para todo e qualquer processo fermentativo. De acordo com Amorim (2005), para que uma fermentação alcoólica seja eficiente é necessário que o número de células de leveduras vivas seja igual ou superior à 85%. Na Figura 2, observa-se que todos os processos iniciaram com índices acima de 95%, demonstrando que *P. membranifaciens* LJ04 estava apta a ser utilizada.

Avaliando-se a Figura 2, verifica-se que a levedura conseguiu se manter viável em todas as doses testadas de furfural, HMF e ácido levulínico durante as 24 h de fermentação. A ação inibitória de ácido fênico foi evidenciada a partir de 1,5 g.L⁻¹, com diminuição expressiva do número de células vivas a partir das 12h. Tal comportamento pode ser explicado pela alta toxicidade que compostos fenólicos de baixo peso molecular apresentam. De acordo com Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b) estas substâncias conseguem interagir facilmente com membranas biológicas, levando a perda da integridade, capacidade como barreira seletiva e matriz enzimática, e, conseqüentemente, levam a morte celular.

De acordo com a Figura 3, a presença de 1,5 e 2,0 g.L⁻¹ de ácido fênico provocaram um pequeno declínio na viabilidade dos brotos, obtendo-se decréscimo estatisticamente significativo a partir de 2,5 g.L⁻¹. Furfural apresenta diminuição na viabilidade dos brotos após 24 h e ácido fênico a partir de 12 h de fermentação.

3.3 Produtos da fermentação alcoólica

As concentrações de glicerol, etanol e ácido acético produzidos durante o processo fermentativo foram quantificadas e encontram-se na Tabela 4.

Da análise dos resultados (Tabela 4), percebe-se que entre inibidores testados (tratamento principal), doses (tratamento secundário) e tempos (tratamento terciário) houveram diferenças significativas para todos os parâmetros. Não sendo possível uma análise completa sem a realização dos desdobramentos das interações entre os tratamentos. Os resultados desta análise encontram-se representados graficamente nas Figuras 4 à 6.

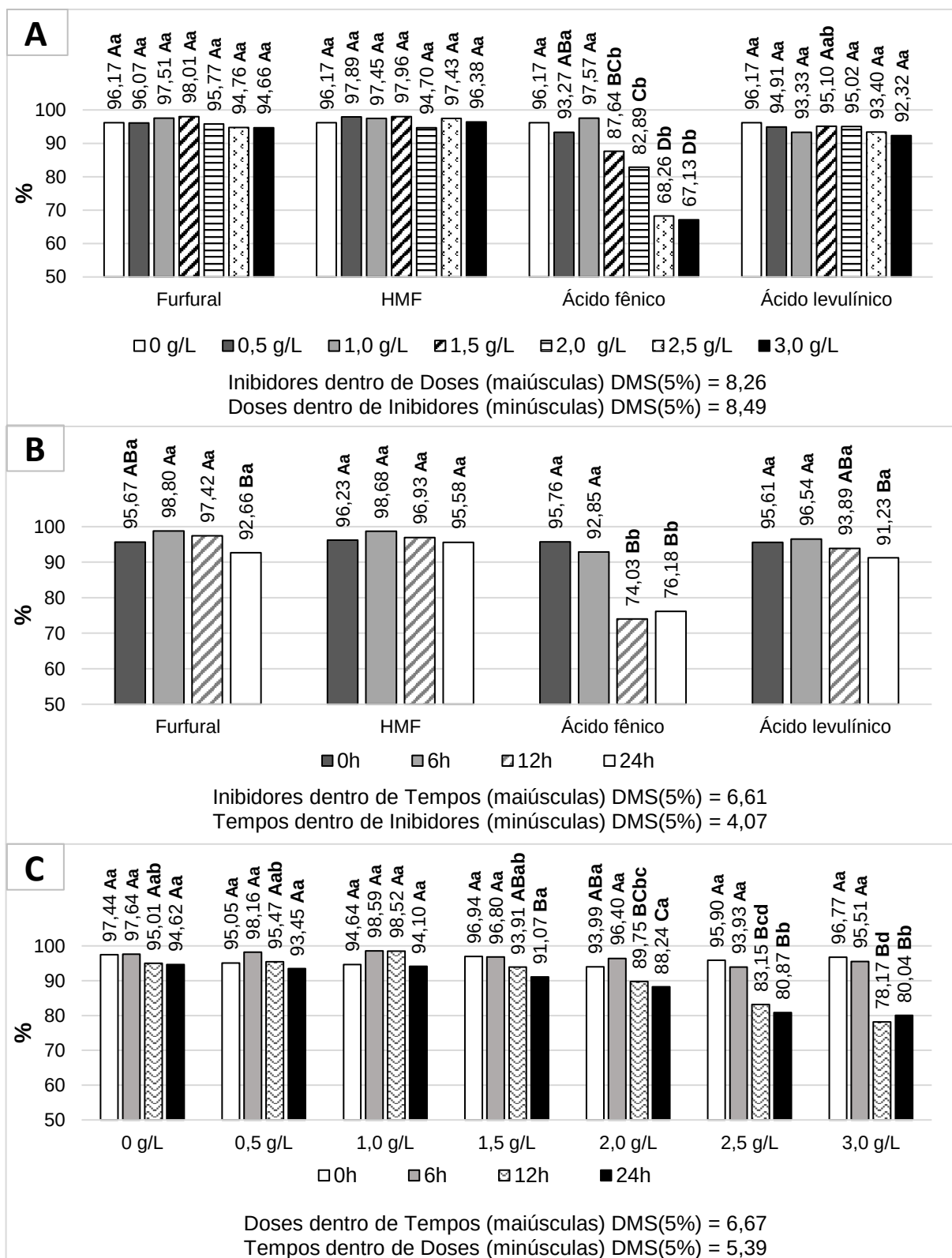


Figura 2 - Desdobramento de interações para viabilidade celular de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.

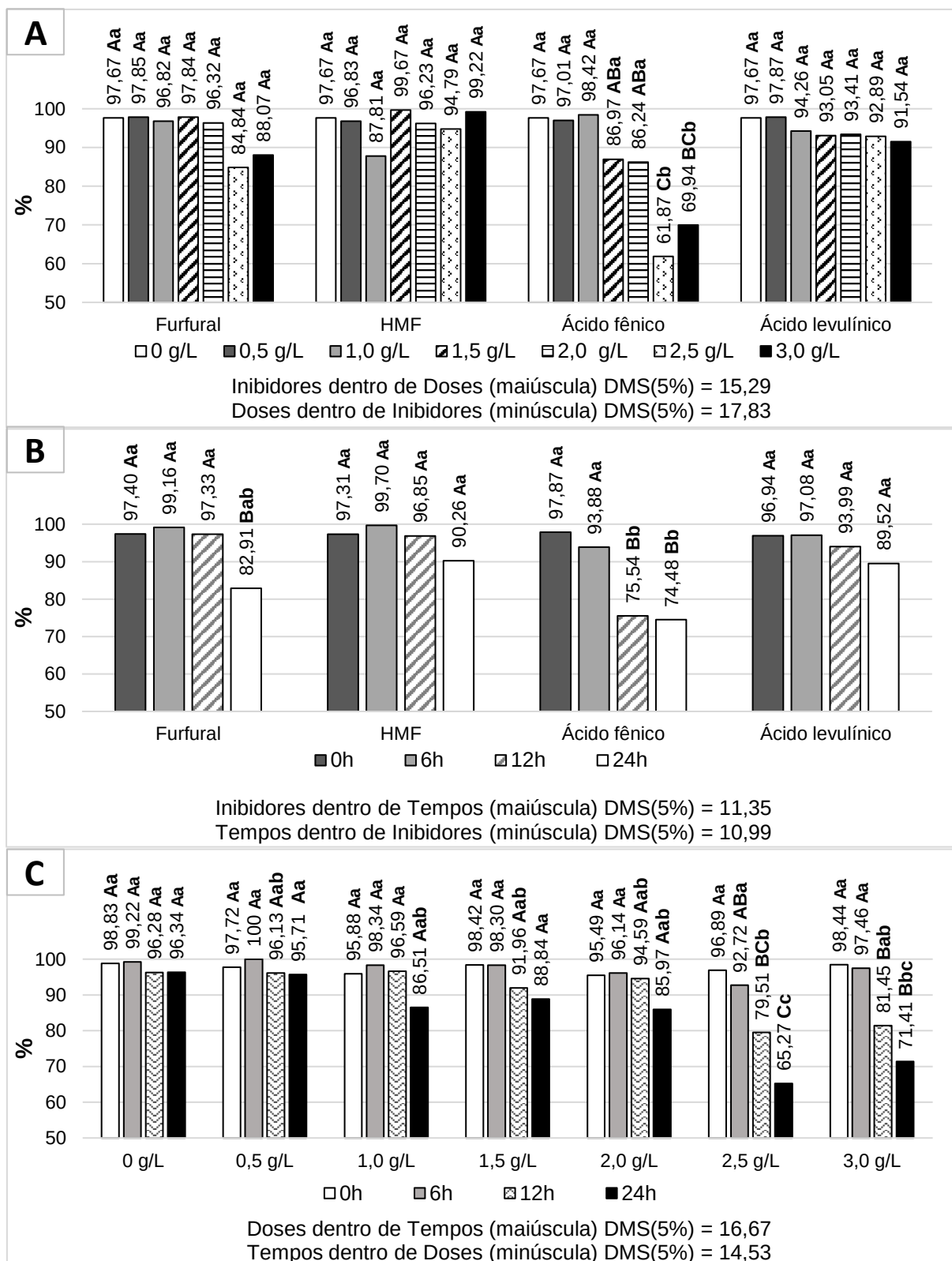


Figura 3 - Desdobramento de interações para viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.

Tabela 4 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para teores de glicose, xilose, glicerol, etanol e ácido acético consumidos e/ou produzidos por *P. membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de Furfural, Hidroximetilfurfural, Ácido fênico e Ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h.

Tratamentos	Glicose (g.L ⁻¹)	Xilose (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)
<i>Tratamento primário</i>					
Inibidores					
Furfural	6,74 b	39,66 c	1,62 d	0,56 b	4,57 a
HMF	6,61 c	39,28 d	1,82 a	0,67 a	4,03 b
Ácido fênico	7,05 a	39,79 b	1,68 c	0,19 d	4,65 a
Ácido levulínico	6,62 c	39,84 a	1,74 b	0,53 c	4,17 b
Teste F	208,32**	1353,94**	159,65**	2089,21**	95,39**
DMS	0,08	0,04	0,04	0,03	0,18
CV	1,57	0,13	2,87	6,99	5,36
<i>Tratamento secundário</i>					
Doses (g.L⁻¹)					
0,0	6,59 f	39,61 d	1,78 a	0,15 g	4,77 a
0,5	6,58 f	39,85 a	1,75 ab	0,21 f	4,61 a
1,0	6,63 e	39,70 c	1,74 b	0,26 e	4,61 a
1,5	6,68 d	39,60 d	1,70 c	0,49 d	4,25 b
2,0	6,84 c	39,473 e	1,69 c	0,64 c	4,11 b
2,5	6,97 b	39,48 e	1,68 cd	0,76 b	4,12 b
3,0	7,01 a	39,78 b	1,66 d	0,90 a	4,01 b
Teste F	1366,52**	606,37**	52,38**	2427,12**	28,49**
DMS	0,02	0,03	0,03	0,03	0,26
CV	0,41	0,08	1,93	6,87	7,30
<i>Tratamento terciário</i>					
Tempos (h)					
0 h	25,06 a	45,058 a	0,00 c	0,00 d	0,00 d
6h	1,19 b	40,16 b	2,27 b	0,37 c	6,79 a
12 h	0,45 c	37,37 c	2,30 a	0,68 b	5,76 b
24 h	0,32 d	35,98 d	2,29 a	0,90 a	4,87 c
Teste F	6642444,52**	72737,83**	28116,65**	12537,32**	26691,21*
DMS	0,02	0,06	0,03	0,01	0,07
CV	0,52	0,28	2,98	5,37	3,16
Interações					
TP x TS	544,34**	1010,38**	25,12**	291,25**	7,88**
TP x TT	1772,11*	109,02**	22,31**	884,81**	103,58**
TS x TT	843,49**	89,16**	4,23**	707,58**	108,96**
TP x TS x TT	457,22**	56,21**	2,08**	135,35**	19,22**

HMF = hidroximetilfurfural. **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns: não significativo ($p > 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. DMS: desvio mínimo significativo. CV: coeficiente de variação. TP x TS: Interação entre inibidores e doses. TP x TT: Interação entre inibidores e tempos. TS x TT: Interação entre doses e tempos. TP x TS x TT: interação entre inibidores, doses e tempos.

A Figura 4A mostra que *P. membranifaciens* LJ04 conseguiu produzir etanol na presença de todos os inibidores até a concentração de 3,0 g.L⁻¹. Entretanto, furfural foi a única substância testada que não apresentou diferença estatística no teor alcoólico com o aumento de suas doses ao meio fermentativo. Ácido fênico e ácido levulínico obtiveram comportamento semelhante: produção de álcool etílico estaticamente iguais até 1,0 g.L⁻¹, com queda acentuada a partir de 1,5 g.L⁻¹.

As fermentações contendo furfural, HMF, ácido levulínico e ácido fênico apresentaram comportamentos semelhantes para todas as doses estudadas: pico da produção de etanol às 6 h de fermentação, com posterior decréscimo da concentração (Figura 4B). Wang *et al.* (2020) perceberam o mesmo comportamento em uma levedura pertencente ao seu banco de microrganismo. Quando inoculada em substrato contendo 3 g.L⁻¹ de furfural e 5 g.L⁻¹ de HMF, houve um declínio na velocidade de geração de álcool etílico, e, conseqüentemente, extensão do período fermentativo.

O efeito inibitório para a produção de etanol por *P. membranifaciens* LJ04 na presença de cada composto estudado pode ser colocado em ordem crescente da seguinte forma: furfural, ácido fênico, HMF e ácido levulínico. No entanto, Gonçalves *et al.* (2015) encontraram resultados semelhante em estudos com leveduras não-convencionais, com o ácido levulínico a substância menos inibitória para *P. stipitis* Y7124 e *Zymomonas mobilis* B14023.

Os resultados demonstram que LJ04 possui habilidade para suportar altas doses de inibidores da fermentação, sendo possível a produção de etanol sem grandes perdas de rendimento ou eficiência fermentativa. Essas informações se tornam mais animadoras quando se observa que as doses testadas neste estudo são muito mais altas do que os geralmente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos (CASEY *et al.*, 2010; HASUNUMA *et al.*, 2011; SHEN *et al.*, 2014). Sendo relatados valores entre 0,024-1,00 g.L⁻¹ para HMF e 0,056-0,73 g.L⁻¹ para furfural em pré-tratamento ácido com H₂SO₄ em resíduos agroindustriais (WANG *et al.*, 2020; AGBOGBO e WENGER, 2007; SUNKAR e BHUKYA, 2021).

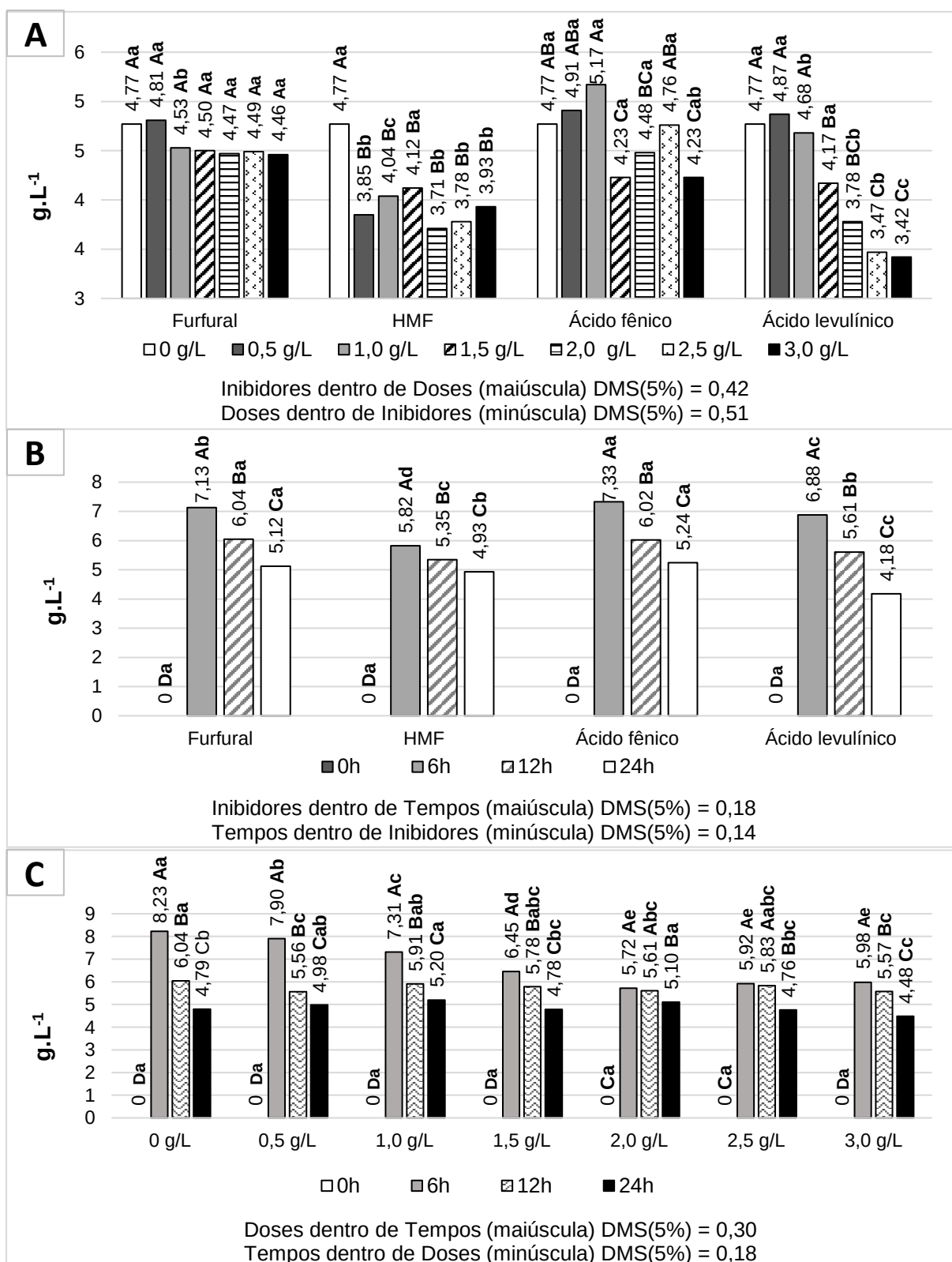


Figura 4 - Desdobramento de interações para etanol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.

Outro fator importante, é a elevada concentração de etanol produzida pela levedura na presença de inibidores. *Pichia membranifaciens* LJ04 conseguiu produzir valores de etanol próximos ao controle em 6 h de fermentação, teor semelhante ou superior a outros microrganismos sugeridos na literatura. *P. stipitis* Y7124, *Zymomonas mobilis* B14023 e *P. stipitis* CECT 1922 produziram cerca de 5,90, 10,38 e 12 g.L⁻¹ em 48 h, respectivamente (DÍAZ *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2015). *Scheffersomyces stipitis* CTBE SA-100 (adaptada em hidrolisado hemicelulósico não destoxificado) quando adicionada na proporção de 6,2 g.L⁻¹ produziu aproximadamente 5 g.L⁻¹ em 72 h (SOARES *et al.*, 2020). *P. stipitis* CBS 6054 produziu 12,23 g.L⁻¹ em 96 h (AGBOGBO e WENGER, 2007).

O pico de produção de etanol para todos os tratamentos ocorreu à 6h de fermentação, havendo perda substancial na concentração após este intervalo. Desempenhos similares já foram relatados em algumas cepas de leveduras não-convencionais utilizadas para a produção de etanol de segunda geração em hidrolisados sintéticos e hemicelulósicos de cana-de-açúcar. Ao observar as Figuras 4 e 5, nota-se que após chegar ao pico máximo de produção de etanol as concentrações exibiram diminuição constantes com aumento proporcional da presença de ácido acético no meio fermentativo. Este comportamento pode ser atribuído à assimilação de etanol pela cepa devido ao rápido esgotamento de açúcar do meio durante o tempo em que o oxigênio estava disponível.

Para que as leveduras garantam sua sobrevivência é necessário que realizem a assimilação de uma ou mais fontes de carbono, conseqüentemente o esgotamento de glicose em um curto intervalo pode induzir à metabolização de outros compostos presentes no meio. *P. membranifaciens* já foi descrita por Kurtzman (2011) como uma levedura capaz de assimilar e crescer em meios com etanol. À vista desses fatores, as altas concentrações de ácido acético encontradas nos tratamentos, podem ser indícios da utilização do etanol como substrato pelas leveduras, uma vez que o álcool é convertido em acetaldeído, que pode ser transformado em acetato ou sofrer oxidação e gerar ácido acético.

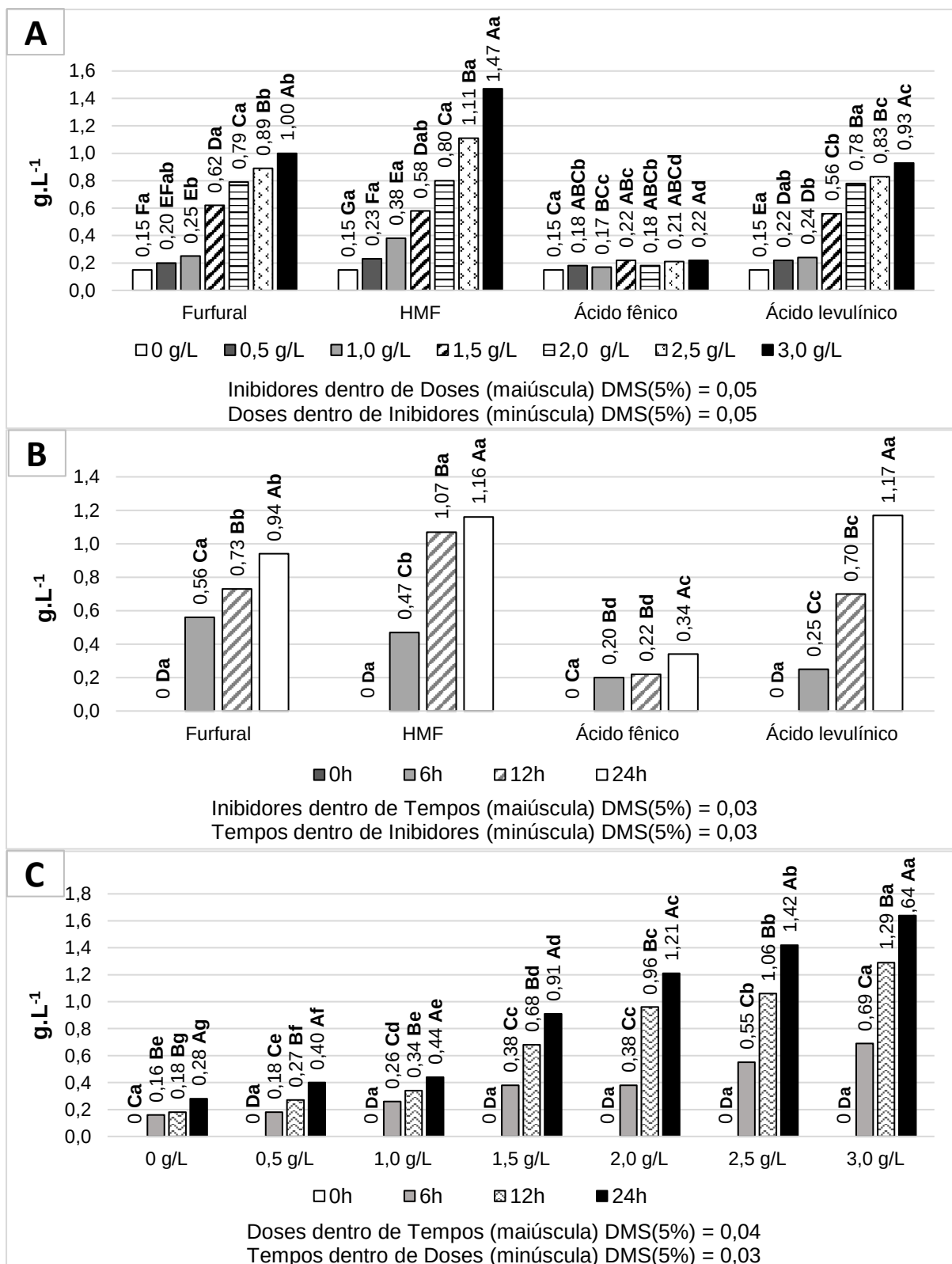


Figura 5 - Desdobramento de interações para ácido acético produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.

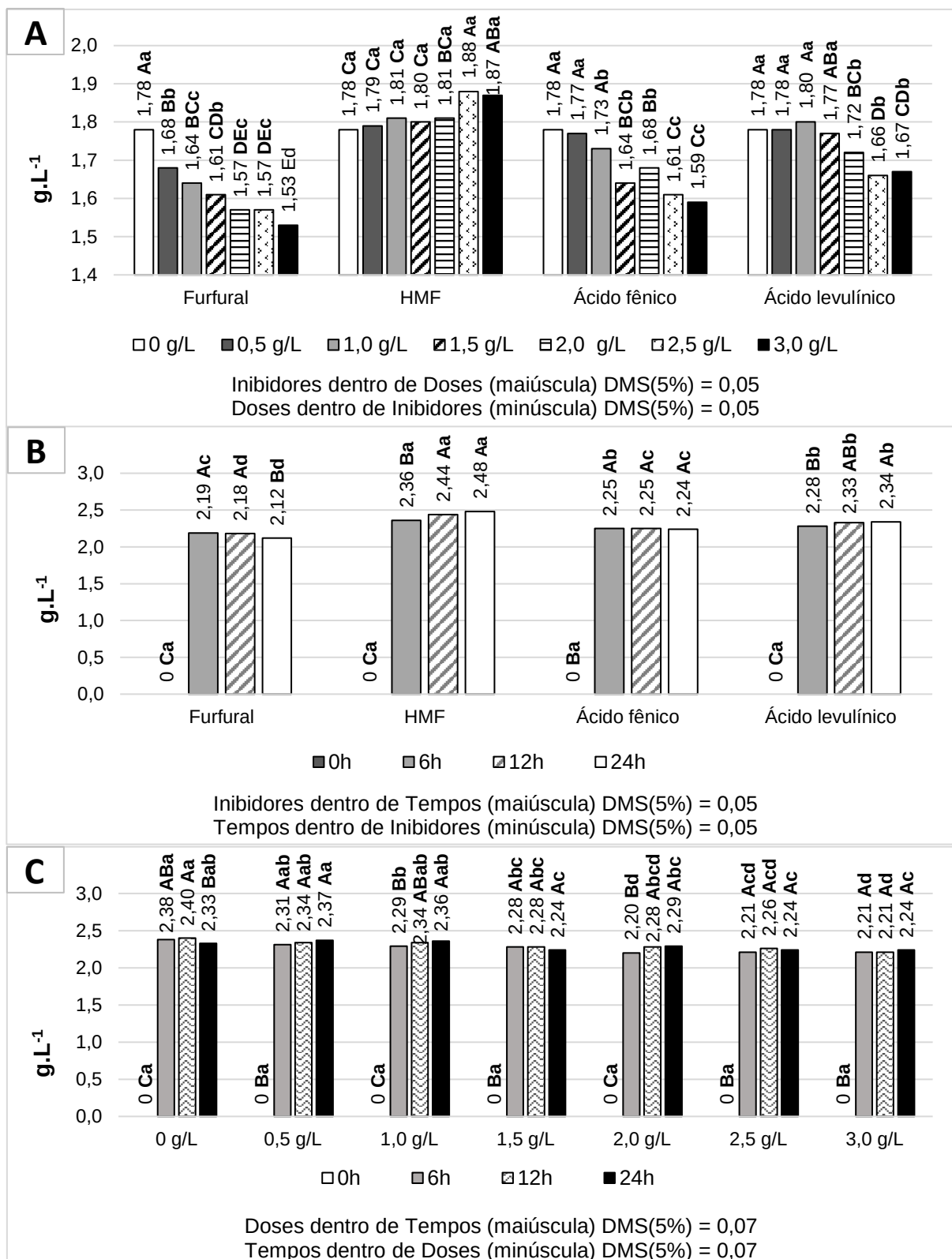


Figura 6 - Desdobramento de interações para glicerol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes doses de furfural hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico em meio sintético contendo glicose (25 g.L⁻¹) e xilose (45 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, durante 24 h. A) Interação entre Inibidores e Doses. B) Interação entre Inibidores e Tempos. C) Interação entre Doses e Tempo.

Durante a fermentação alcoólica, a maior parte dos carboidratos presentes no substrato são convertidos em etanol, gás carbônico (CO₂), biomassa e energia para a manutenção das células. Entretanto, parte desses açúcares são desviados para outras vias metabólicas e geram moléculas que não fazem parte dos interesses das indústrias. Dentre os subprodutos que podem ser produzidos, glicerol é o mais importante quantitativamente, pois sua metabolização está associada à produção de etanol (MUTTON *et al.*, 2019).

A Figura 6 demonstra que a produção de glicerol foi proporcionalmente inversa ao aumento das doses de furfural, ácido fênico e ácido levulínico, ou seja, quanto maior a dose dessas substâncias, menor a concentração de glicerol produzida. Tal comportamento era esperado pois sabe-se que esta molécula é metabolizada principalmente como uma resposta da levedura à elevadas concentrações de etanol do meio. Ao observar as Figuras 4A e 6A fica evidente que a produção de álcool etílico diminuiu à medida que as doses destes compostos aumentaram, consequentemente o glicerol também apresentou a mesma tendência.

Os resultados de glicerol são linearmente associados à produção de etanol, entretanto essa correlação também é influenciada pelas condições a que a levedura é exposta durante o processo. Desta forma, quando a célula sofre estresse de caráter osmótico, a sua resposta é aumentada e a produção desse subproduto se torna linearmente maior (NEVOIGT e STAHL, 1997; MUTTON *et al.*, 2019). Este comportamento pode ser visto em *P. membranifaciens* com o aumento das doses de HMF ao meio fermentativo. De acordo com Liu, Slininger e Gorsich (2005), HMF está entre as substâncias conhecidas que causam estresse osmótico em microrganismos. disto, a alta concentração de íons dissociados e disponíveis no meio podem ter causado estresse osmótico, levando as células a produzirem glicerol para se protegerem.

4. CONCLUSÕES

P. membranifaciens LJ04 foi capaz de crescer e produzir etanol em substratos contendo teores na faixa de 0,5 à 3,0 g.L⁻¹ de furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico; concentrações muito superiores as normalmente quantificadas em hidrolisados hemicelulósicos provenientes de tratamento ácido.

As substâncias testadas podem ser classificadas de acordo com seu efeito inibitório na velocidade específica de crescimento e produção de biomassa de *P. membranifaciens* LJ04 na seguinte ordem: ácido fênico < HMF < ácido levulínico < furfural. Já o efeito inibitório na produção de etanol é classificado em furfural < ácido fênico < HMF < ácido levulínico.

Furfural foi o inibidor que mais afetou o crescimento de *P. membranifaciens*, com decréscimo de 18,95% na concentração de 3,0 g.L⁻¹.

O rendimento em biomassa teve uma redução de 58,82% na presença de 3,0 g.L⁻¹ de ácido levulínico e 2,5 e 3,0 g.L⁻¹ de furfural.

A levedura se manteve viável em todas as doses testadas de furfural, HMF e ácido levulínico durante as 24 h de fermentação.

Ácido fênico apresentou toxicidade a partir de 1,5 g.L⁻¹, com diminuição expressiva do número de células vivas a partir das 12 h.

Furfural foi a única substância que não apresentou diferença estatística no teor alcoólico com o aumento de suas doses ao meio fermentativo.

Ácido fênico e ácido levulínico obtiveram produção de álcool etílico estaticamente iguais até 1,0 g.L⁻¹, com queda acentuada a partir de 1,5 g.L⁻¹.

Os resultados demonstram que LJ04 possui habilidade para suportar altas doses de inibidores da fermentação, sendo possível a produção de etanol sem grandes perdas de rendimento ou eficiência fermentativa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOGBO, F. K.; WENGER, K. S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 723-727, 2007.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005.

BANUVALLI, B.; MUDLIAR, S.; BOKADE, V.; DEBNATH, S. Evaluation of inhibition kinetics of furfural, 5-hydroxymethylfurfural and acetic acid on xylitol fermentation by *Pichia stipitis*. **Authorea Preprints**, 2022.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos - AgroEstat**, versão 1.1.0.711, 2015.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868-10874, 2011.

BHAVANA, B. K.; MUDLIAR, S. N.; BOKADE, V. V.; DEBNATH, S. Effect of furfural, acetic acid and 5-hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-15, 2022.

BORGES, C. P.; ROSA, V. A.; SILVA, M. B. Pré-tratamento de material lignocelulósico em bancada. **Enciclopédia Biosfera**, v. 18, n. 38, p. 690, 2021.

BRONZATO, G. R. F. **Avaliação do aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol 2G**. 2021. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 108 p. 2021.

BRONZATO, G. R. F.; REIS, V. A. C. A.; BORRO, J. A.; LEÃO, A. L.; CESARINO, I. Second generation ethanol made from coir husk under the biomass Cascade approach. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 693, n. 1, p. 107–114, 2019. DOI: 10.1080/15421406.2020.1723890

BRONZATO, G. R. F.; ZIEGLER, S. M.; SILVA, R. C.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Characterization of the pre-treated biomass of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) for the second generation ethanol production. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 655, n. 1, 2017. DOI: 10.1080/15421406.2017.1360696

BRONZATO, G. R. F.; ZIEGLER, S. M.; SILVA, R. C.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Water hyacinth second-generation ethanol production: a mitigation alternative for an environmental problem. **Journal of Natural Fibers**, 2018. DOI: 10.1080/15440478.2018.1458000

CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N. W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 4, p. 385-393, 2010.

DEVI, A.; SINGH, A.; BAJAR, S.; PANT, D.; DIN, Z. U. Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105798, 2021.

DÍAZ, M. J.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, M.; CASTRO, E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 891–899, 2009.

DÍAZ-NAVA, L. E.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; ORTIZ-MUÑIZ, B.; MONTES-GARCÍA, N.; DOMÍNGUEZ, J. M.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J. Acetic acid-tolerant native yeast *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 isolated from sweet sorghum juice for ethanol production. **Sugar Tech**, v. 24, n. 2, p. 576–584, 2022.

DONINI, C. A.; SILVA, M. K. L.; BRONZATO, G. R. LEÃO, A. L. CESARINO, I. Evaluation of a biosensor based on reduced graphene oxide and glucose oxidase enzyme on the monitoring of second-generation ethanol production. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, 2020. DOI: 10.1007/s10008-019-04471-7

ESPIRITO-SANTO, M. C. **Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar após diversos pré-tratamentos visando melhorar o rendimento de hidrólise enzimática**. 2020. 181 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2020.

FIELD, S. J.; RYDEN, P.; WILSON, D.; JAMES, S. A.; ROBERTS, I. N.; RICHARDSON, D. J.; CLARKE, T. A. Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, p. 1-8, 2015.

FREITA, C. M. **Emprego da *Moringa oleífera* Lam para destoxificação do licor hemicelulósico de sorgo e cana-energia para produção de etanol de segunda geração**. 2020. 120 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2020.

GHOSH, S.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARYA, P. Sustainability of cereal straws for the fermentative production of second generation biofuels: A review of the efficiency

and economics of biochemical pretreatment processes. **Applied Energy**, v. 198, p. 284–298, 2017.

GONÇALVES, F. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. *Journal of Basic Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 695–708, 2015.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 677–685, 2007.

HASUNUMA, T.; SANDA, T.; YAMADA, R.; YOSHIMURA, K.; ISHII, J.; KONDO, A. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 2, 2011.

HEER, D.; HEINE, D.; SAUER, U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7631–7638, 2009.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 489–496, 2016.

HOLLUPI, N. T. **Isolamento, caracterização e identificação de leveduras do ecossistema de produção do sorgo sacarino**. 2015. 58 f. Monografia (Graduação) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2015.

JOFRE, F. M. **Aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2019.

- KORDALA, N.; WALTER, M.; BRZOZOWSKI, B.; LEWANDOWSKA, M. 2G-biofuel ethanol: an overview of crucial operations, advances and limitations. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02861-y>
- KURTZMAN, Cletus P. *Pichia* E.C. Hansen (1904). Em: KURTZMAN, C P; FELL, J W; BOEKHOUT, Teun (org.). **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 5. ed. Elsevier, 2011. p. 685–707. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00057-4>.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LI, X.; CHEN, Y.; NIELSEN, J. Harnessing xylose pathways for biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 57 p. 56-65, 2019. [10.1016/j.copbio.2019.01.006](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.006)
- LIU, C. G.; XIAO, Y.; XIA, X. X.; ZHAO, X. Q.; PENG, L.; SRINOPHAKUN, P.; BAI, F. W. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 491-504, 2019.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 451-460, 2005.
- MUTTON, M. J. R.; FERRARI, F. C.; FREITA, L. A.; FREITA, C. M.; ANDRIETTA, M. D. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 389-394, 2019.
- NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 231-241, 1997.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17–24, 2000a.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000b.

PAVANI, C. D.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A.; COSTA, G. H. G.; MUTTON, M. J. R. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn sobre a fisiologia da levedura em fermentação. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, v. 5, 2013.

PEREZ, C. L.; PEREIRA, L. P. R. C.; MILESSI, T. S.; SANDRI, J. P.; DEMEKE, M.; FOULQUIE-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M.; ZANGIROLAMI, T. C. Towards a practical industrial 2G ethanol production process based on immobilized recombinant *S. cerevisiae*: Medium and strain selection for robust integrated fixed-bed reactor operation. **Renewable Energy**, v. 185, p. 363-375, 2022.

PERNA, M. S. C.; BASTOS, R. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 119, 2018.

RIBEIRO, N. N. **Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2019.

RIBEIRO, N. N.; FREITA, L. A.; TRALLI, L. F.; SILVA, A. F.; FREITA, C. M.; MENDES, F. Q.; TEIXEIRA, V.; SILVA JUNIOR, C. N.; MUTTON, M. J. R. Otimização das condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 720–728, 2019.

SATO, A.; SOEPRIJANTO; WIDJAJA, A. Influence of alkaline hydrothermal pretreatment of rice straw on biomass composition. **International Energy Journal**, v. 19, n. 2, p. 115–124, 2019.

SEWSYNKER-SUKAI, Y.; NAOM-DAVID, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Recent developments in the application of kraft pulping alkaline chemicals for lignocellulosic pretreatment: Potential beneficiation of green liquor dregs waste. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123225, 2020. 10.1016/j.biortech.2020.123225

SHEN, Y.; LI, H.; WANG, X.; ZHANG, X.; HOU, J.; WANG, L.; GAO, N.; BAO, X. High vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 11, p. 1637–1645, 2014.

SILVA, A. F. **Avaliação do potencial de leveduras fermentadoras de pentoses na produção de etanol 2G, a partir de bagaço de sorgo**. 2019. 90 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2019.

SILVA, C. N. S.; BRONZATO, G. R. F.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Second-generation ethanol from pineapple leaf fibers. **Journal of Natural Fibers**, v. 17, n. 1, p. 113–121, 2020. DOI: 10.1080/15440478.2018.1469453

SOARES, L. B.; BONAN, C. I. D. G.; BIAZI, L. E.; DIONÍSIO, S. R.; BONATELLI, M. L.; ANDRADE, A. L. D.; RENZANO, E. C.; COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, p. 105549, 2020.

ŠTORNIK, A.; SKOK, B.; TRČEK, J. Comparison of cultivable acetic acid bacterial microbiota in organic and conventional apple cider vinegar. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 113–119, 2016.

SUNKAR, B.; BHUKYA, B. Bi-phasic hydrolysis of corncobs for the extraction of total sugars and ethanol production using inhibitor resistant and thermotolerant yeast, *Pichia kudriavzevii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 153, p. 106230, 2021.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. **Biofuels**, 2011.

VANMARCKE, G.; DEMEKE, M. M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Identification of the major fermentation inhibitors of recombinant 2G yeasts in diverse lignocellulose hydrolysates. **Biotechnology for biofuels**, v. 14, p. 1-15, 2021.

WANG, L. Q.; CAI, L. Y.; MA, Y. L. Study on inhibitors from acid pretreatment of corn stalk on ethanol fermentation by alcohol yeast. **RSC Advances**, v. 10, n. 63, p. 38409–38415, 2020.

WANNAWILAI, S.; LEE, W. C.; CHISTI, Y.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Furfural and glucose can enhance conversion of xylose to xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. **Journal of biotechnology**, v. 241, p. 147-157, 2017.

XU, Y.; WANG, D. Integrating starchy substrate into cellulosic ethanol production to boost ethanol titers and yields. **Applied Energy**, v. 195, p. 196–203, 2017.

ZHENG, Y.; LEE, C.; YU, C.; CHENG, Y. S.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. **Applied Energy**, v. 105, p. 1–7, 2013.

Capítulo 3 - PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO SEM DESTOXIFICAÇÃO POR *Pichia membranifaciens*

RESUMO

O etanol de segunda geração (2G), é um biocombustível que pode ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos. Para isto é necessário que as biomassas passem por pré-tratamento para despolimerizar a hemicelulose e parte da celulose. A utilização de ácido diluído é o método mais eficaz para liberação da fração hemicelulósica em resíduos agroindustriais. Entretanto, além de carboidratos simples (xilose e glicose), os hidrolisados podem apresentar substâncias tóxicas ao processo fermentativo. Tais compostos podem ser produzidos pela degradação do material lignocelulósico ou açúcares disponibilizados durante o pré-tratamento; podendo, posteriormente, inibir o metabolismo de leveduras. Desta forma, a realização da destoxificação do hidrolisado mostra-se benéfica e muitas vezes necessária. Entretanto, apesar de essencial, esta operação acarreta no aumento do custo do tratamento. Neste contexto, o estudo de leveduras que se mantêm viáveis em níveis altos destes componentes tóxicos sem perda de eficiência fermentativa é extremamente importante. O presente estudo teve como objetivo estudar e avaliar o desempenho fermentativo de *Pichia membranifaciens* LJ04 em mosto preparado com hidrolisado hemicelulósico, obtido por pré-tratamento ácido de bagaço de cana-energia, sem destoxificação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema de parcelas subdivididas (Split-Plot), com 3 repetições. Os tratamentos principais foram caracterizados pelos hidrolisado hemicelulósicos (hidrolisado sintético, hidrolisado destoxificado e hidrolisado sem destoxificação) e os secundários aos tempos (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h). As avaliações dos parâmetros microbiológicos (viabilidade celular, índice brotamento e viabilidade dos brotos) da fermentação foram realizadas em Câmara de Neubauer e as concentrações de Glicose, Xilose, Glicerol, Etanol e Ácido acético determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC). É possível a produção de etanol por *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação, sem que haja perdas significativas no rendimento do processo. A presença de inibidores da fermentação no hidrolisado levou a um crescimento celular mais vagaroso, mas não

afetou a velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida, velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x). A maior produção de etanol foi encontrada no meio sintético, com valores semelhantes para o substrato destoxificado e sem destoxificação

Palavras-chave: Biocombustível, Cana-energia, Fermentação alcoólica, Inibidores de fermentação, Leveduras não-convencionais, Pré-tratamento ácido.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção de etanol de segunda geração (2G) tem se mostrado uma alternativa promissora para a reutilização de resíduos agrícolas (BRONZATO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020; BRONZATO, 2021). Esta tecnologia utiliza a biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de etanol. Seu uso contribui para a produção de combustíveis sem a necessidade de expansão das áreas cultivadas ou de competição com o setor alimentício, podendo aumentar em até 50% a produtividade atual do setor sucroenergético (RAMYA *et al.*, 2021). Diversos resíduos agroindustriais podem atuar como substratos para a produção de etanol de segunda geração, como, por exemplo, bagaço, palha, cascas, caules, pedúnculos e folhas (KORDALA *et al.*, 2022).

O processo de produção de biocombustíveis de segunda geração inclui algumas etapas adicionais ao processo convencional, empregando diferentes métodos biotecnológicos para promover a liberação dos açúcares fermentescíveis. Dentre estas etapas, o pré-tratamento é um processo fundamental, uma vez que possui o objetivo de romper a rígida estrutura lignocelulósica, influenciando diretamente os processos seguintes (CANDIDO *et al.*, 2019).

Para isso foram desenvolvidas inúmeras técnicas de pré-tratamentos, os quais podem fazer uso de métodos químicos, físicos, biológicos e/ou físico-químicos. Durante tais processos ocorre a despolimerização da biomassa com deslignificação e quebra de açúcares da cadeia hemicelulósica (BRONZATO, 2021). Sendo assim, o principal objetivo do pré-tratamento é separar a lignina dos polissacarídeos do complexo lignocelulósico, diminuir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material para que as enzimas (celulases) tenham melhor acesso aos

polissacarídeos na etapa de hidrólise enzimática (LAMICHHANE *et al.*, 2021; KORDALA *et al.*, 2022).

Desta forma, a maioria das pesquisas atuais priorizam a obtenção do hidrolisado celulósico, sem estudar efetivamente um uso para o hidrolisado hemicelulósico obtido durante o pré-tratamento (BRONZATO *et al.*, 2017; BRONZATO *et al.*, 2018; BRONZATO *et al.*, 2019; DONINI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; BRONZATO, 2021). Consequentemente apenas a fração celulósica da biomassa é fermentada, ficando a fração hemicelulósica subaproveitada ou desprezada (PEREZ *et al.*, 2022).

Presente nas biomassas em geral, a hemicelulose é constituída por diferentes substâncias, dentre elas açúcares de cinco carbonos como a D-xilose e L-arabinose. A D-xilose é o segundo açúcar mais abundante nos materiais lignocelulósicos e corresponde a cerca de 81% de todos os açúcares produzidos durante o pré-tratamento (LI, CHEN e NIELSEN, 2019; KORDALA *et al.*, 2022). A vista disso, a busca por melhores processos tecnológicos e maiores rendimentos industriais têm incentivado a procura por leveduras capazes de fermentar D-xilose, assim como, a pesquisa por pré-tratamentos eficientes que disponibilizem altas concentrações de pentoses SEWSYNKER-SUKAI, NAOM-DAVID e GUEGUIM-KANA, 2020).

Um tipo de pré-tratamento muito utilizado é a hidrólise ácida, a qual consiste no uso de ácidos para promover a disponibilização dos açúcares (CHANDEL *et al.*, 2018). Dentre os mais utilizados, o ácido sulfúrico (H_2SO_4), clorídrico (HCl), fosfórico (H_3PO_4) e nítrico (HNO_3) têm sido alvo de estudos devido a quantidade de açúcares que podem gerar, uma vez que existem variações no modo de ação de cada tipo de ácido. Contudo, esta forma de pré-tratamento pode levar à formação de compostos residuais nocivos que causam danos ao metabolismo dos microrganismos, afetando a metabolização dos açúcares fermentescíveis (SANDRI *et al.*, 2023).

Estes compostos tóxicos correspondem a mais de 35 substâncias, as quais são divididas em três grupos principais: ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos (COLOMBI; ZANONI; TAVARES, 2018). Assim, os ácidos fracos, como o ácido acético, reduzem o crescimento microbiano, enquanto os compostos fenólicos interferem na integridade da membrana celular, influenciando diretamente sua função biológica de barreira seletiva e matriz enzimática (JÖNSSON; ALRIKSSON;

NILVEBRANT, 2013; COLOMBI; ZANONI; TAVARES, 2018). Dentre os principais compostos derivados de furanos que podem ser gerados durante o pré-tratamento estão o furfural e o hidroximetilfurfural, que quando em altas concentrações são capazes de inibir o crescimento dos microrganismos, além de provocar o rompimento de moléculas de DNA, bem como a interrupção da síntese de RNA e proteínas. Além disso, a degradação destes compostos leva à formação de ácidos que podem contribuir para a inibição da fermentação, como o ácido fórmico e o ácido levulínico (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; WANG *et al.*, 2016; ASTUTI *et al.* 2018).

Muitas espécies microbianas, incluindo as leveduras, são suscetíveis a esses compostos (XU e WANG, 2017). Portanto, o uso de microrganismos que sejam eficientes na metabolização de pentoses e hexoses e tolerantes quanto à presença de compostos tóxicos é fundamental para garantir a máxima eficiência do processo produtivo do etanol de segunda geração (NDUBUISI *et al.*, 2020; NDUBUISI *et al.*, 2023).

Sabendo que que *Saccharomyces cerevisiae* não pode fermentar pentoses naturalmente, a modificação genética tornou-se uma estratégia a ser considerada (SHARMA, LARROCHE e DUSSAP, 2020). Deste modo, cepas industriais já foram modificadas, recebendo vias metabólicas para consumo de xilose (via redutora/oxidativa (OXR) e via de isomerização (XI)) (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2021). Apesar de serem capazes de assimilar e fermentar a xilose, o uso de organismos geneticamente modificados (OMGs) ainda é limitado e caro em ambientes industriais (SANDRI *et al.*, 2023); principalmente em países com regulamentações rígidas de biosegurança, como o Brasil (MILESSI *et al.*, 2020).

Neste contexto, o emprego de microrganismos naturais que fermentam pentoses e hexoses, são uma alternativa às cepas recombinantes (ROBAK e BALCEREK, 2018; ROBAK e BALCEREK, 2020; SANDRI *et al.*, 2023). De acordo com registros da literatura há um grande número de leveduras que metabolizam xilose. Entretanto somente cerca de 1% delas são capazes de fermentar xilose em etanol (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007), dentre estas destaca-se as leveduras do gênero *Kluyveromyces spp.*; *Candida spp.*, *Scheffersomyces spp.* e *Pichia spp.*

Cepas de leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Candida shehatae* e *Scheffersomyces stipitis* já foram estudadas, mas apresentam baixa tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado, exigindo condições de processo específicas (ROBAK e BALCEREK, 2018; ROBAK e BALCEREK, 2020; SANDRI *et al.*, 2023). Estudos prévios, demonstraram que *P. membranifaciens* LJ04 consegue suportar doses altas de inibidores presentes nos hidrolisados. Neste contexto o presente estudo visou estudar as eficiências e rendimentos de fermentações realizadas com hidrolisados hemicelulósicos com e sem destoxificação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Pichia membranifaciens LJ04 (Figura 1) foi obtida por cultura estoque mantida à 4°C no banco de leveduras do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Cepa isolada de amostras de solo coletado em área experimental de sorgo sacarino (HOLLUPI, 2015) e identificada por Silva (2019).



Figura 1 - *Pichia membranifaciens* LJ04 cultivada em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose e ágar). Fonte: De autoria própria.

2.2 Preparo do inóculo

Para reativação e preparo do inóculo foi preparado meio YPXD: 20 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de glicose e 10 g.L⁻¹ de xilose

(GOVINDASWAMY e VANE, 2007). Uma alça da cultura estoque (levedura pura) foi transferida para frascos erlenmeyers (500 mL) contendo 250 mL de meio.

Em seguida, os frascos foram incubados durante intervalo de 72 horas à temperatura de 32°C e agitação orbital de 125 rpm. Ao final desse período, o meio de cultura foi centrifugado e a fração líquida descartada. Por fim, a massa celular obtida foi suspensa em solução salina (NaCl 0,85%) e armazenada à 4°C. Todos os procedimentos foram repetidos até se obter massa celular necessária para a realização dos ensaios fermentativos.



Figura 2 – Crescimento de *Pichia membranifaciens* LJ04 em meio YPXD (extrato de levedura, peptona, D-xilose, D-glicose). Da esquerda para a direita: Inoculação da levedura em meio YPXD líquido; meio de crescimento centrifugado após 72h; massa de levedura recuperada e suspensa em solução salina (NaCl 0,85%). Fonte: Elaboração própria.

2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num esquema de parcelas subdivididas (Split-Plot), com 3 repetições. Os tratamentos principais foram caracterizados pelos hidrolisados hemicelulósicos (hidrolisado sintético, hidrolisado destoxificado e hidrolisado sem destoxificação) e os secundários aos tempos (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h).

2.4 Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses utilizado nesta etapa foi preparado por Freitas (2020), através do emprego de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (0,5% m.v⁻¹) em bagaço de cana-energia Vertix 3.

De acordo com análise realizada em HPLC, calculou-se a concentração necessária para obtenção de açúcares (glicose+xilose) próxima a 70 g.L⁻¹, e, em seguida, o hidrolisado foi colocado em rotaevaporador de simples efeito à 60°C com sistema de vácuo a 635 mmHg. Metade do volume do hidrolisado concentrado foi armazenado para uso posterior, enquanto o restante foi enviado para a etapa de destoxificação.

Para a remoção de compostos inibidores gerados no pré-tratamento, inicialmente o pH do licor concentrado foi ajustado para 7,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO), seguido de redução até pH 4,5 utilizando ácido fosfórico (H₃PO₄). O hidrolisado foi centrifugado ao final de cada etapa de alteração de pH.

Para a etapa de adsorção de ácidos orgânicos, carvão ativado foi adicionado na proporção de 1% m.v⁻¹ ao licor. Logo após, os frascos foram colocados em incubadora a 50°C durante 30 minutos e, ao final, as soluções concentradas e destoxificadas foram filtradas (MARTON, 2002).

2.5 Preparo do hidrolisado hemicelulósico sintético

Para realização do processo fermentativo, preparou-se mosto sintético contendo 45 g.L⁻¹ de xilose e 25 g.L⁻¹ de glicose. Tal procedimento objetivou a reprodução de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado, obtido a partir de pré-tratamento ácido com H₂SO₄ à 0,5% m.V⁻¹. Como fontes de nutrientes foram adicionados 1,43 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,35 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄.H₂O, 0,68 g.L⁻¹ de K₂SO₄, 0,47 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,03 g.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O, 0,04 g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O (PAVANI *et al.*, 2013; RIBEIRO, 2019) e 1,20 g.L⁻¹ de extrato de levedura (SILVA, 2019); todos com pureza de 99%.

2.6 Preparo e esterilização do mosto

O pH dos hidrolisados hemicelulósicos (sintético, destoxificado e sem destoxificação) foi ajustado até 4,5±0,05 através da adição de solução diluída de

H₂SO₄ 0,05% (Figura 3). Posteriormente, todos os meios foram esterilizados por calor úmido utilizando-se autoclave (120°C, 1 atm, 20 min).



Figura 3 - Hidrolisados hemicelulósicos após ajuste de pH. Da esquerda para direita: Hidrolisado sem destoxificação, hidrolisado destoxificado e hidrolisado sintético. Fonte: De autoria própria.

2.7 Processo fermentativo

Após centrifugação do inóculo suspenso em solução salina, a levedura foi adicionada à frascos (erlenmeyers) de 250 mL com massa correspondente a 2,8 g.L⁻¹ de levedura seca (concentração celular de 10⁷ células.mL⁻¹).

Foram realizadas duas alimentações de 50 mL de mosto a cada 40 minutos para permitir a adaptação da levedura ao substrato, obtendo-se um volume final de 100 mL de hidrolisado hemicelulósico sintético.

Os frascos foram incubados por 72 horas em mesa agitadora à 32°C e controle de rotação de 125 rpm, condições ideais estabelecidas em trabalho anterior (RIBEIRO *et al.*, 2019).

2.1 Métodos analíticos e quantitativos

Para acompanhamento do comportamento da levedura na presença de inibidores, cerca de 2 mL de meio sintético foram retirados em intervalos de tempo pré-determinados. Alíquotas do mosto inoculado foram coletadas ao início do processo fermentativo (0h), enquanto amostras de vinho após 6, 12, 24, 48 e 72h (fim da fermentação).

2.6.1 Análises microbiológicas

A determinação da viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos foi realizada em câmara de Neubauer pelo método de Lee, Robinson e Wang (1981).

A biomassa (g.L^{-1}) produzida durante a fermentação foi determinada com base na relação entre absorbância e peso seco da levedura (massa celular seca até peso constante). Para isto, o crescimento celular foi monitorado por espectrofotometria quantificando-se a absorbância à 600 nm (SOARES *et al.*, 2020).

2.6.2 Análise cromatográfica

Após a coleta, as alíquotas de mosto e vinho destinadas à cromatografia foram centrifugadas à 500 rpm por 5 min. Os sobrenadantes obtidos foram diluídos (1:10) e armazenados à -4°C .

Para garantir que não houvesse qualquer matéria estranha que pudesse interferir ou danificar o equipamento durante as análises, as amostras foram passadas em filtro com recheio de sílica (Sep-Pak tC18 Plus Short, com porosidade de 125 Å e retenção de partículas com 37-55 μm), recomendado para preparo de amostras cromatográficas.

As concentrações de xilose, glicose, glicerol, ácido acético e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu LC-10AD, Kyoto, Japão), usando um detector de índice de refração e um Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) Coluna Aminex HPX-87H à 45°C , com H_2SO_4 0,01 N como eluente, com vazão de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

2.8 Análises cinéticas

O modelo matemático de Monod é formado por três equações diferenciais ordinárias de 1ª ordem e 1º grau evolutivas, não-lineares. Dentre elas, a Equação 1 permite determinar a função $\mu_x = \mu_x(t)$ para cálculo da velocidade específica de crescimento (μ_x).

$$(1) \quad \frac{dX}{dt} = \mu_x X$$

Simplificando este modelo, obtemos a Equação 2:

$$(2) \quad \mu_x = \frac{\frac{dX}{dt}}{X} \cong \frac{\frac{\Delta X}{\Delta t}}{X} = \frac{\frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}}{X}$$

Considerando-se diferentes limites iniciais e finais de tempo, gráficos de dispersão com linha de tendência linear foram traçados para valores de **‘ln(biomassa) X tempo’** para cada dose e inibidor testado, assim como, na sua ausência.

Os gráficos que exibiram melhores coeficientes de correlação (r^2), foram escolhidos para representar a fase exponencial de crescimento da levedura (Apêndice A). Por fim, o coeficiente angular de cada reta foi determinado para estabelecimento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) de *P. membranifaciens* LJ04.

As velocidades de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) foram determinadas de acordo com as Equações 3 e 4:

$$(3) \quad Q_g = \frac{[g]_0 - [g]_f}{t}$$

$$(4) \quad Q_x = \frac{[x]_0 - [x]_f}{t}$$

Onde:

Q_g : velocidade de consumo de glicose ($g.L^{-1}.h^{-1}$); **$[g]_0$:** concentração inicial de glicose ($g.L^{-1}$); **$[g]_f$:** concentração final de glicose ($g.L^{-1}$); **t :** tempo de fermentação (h); **Q_x :** velocidade de consumo de xilose ($g.L^{-1}.h^{-1}$); **$[x]_0$:** concentração inicial de xilose ($g.L^{-1}$); **$[x]_f$:** concentração final de xilose ($g.L^{-1}$).

Os rendimentos de etanol ($Y_{P/S}$) e biomassa ($Y_{X/S}$) foram determinados com base no consumo de glicose e xilose de acordo com as Equações 5 e 6.

$$(5) \quad Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

$$(6) \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Onde:

$Y_{X/S}$: rendimento de crescimento celular baseado no consumo de substrato (g biomassa/g substrato); $Y_{P/S}$: rendimento do produto (etanol) com base no consumo de substrato (g etanol/g substrato); X : concentração celular final (g.L^{-1}); X_0 : concentração celular inicial (g.L^{-1}); P : concentração máxima de etanol (g.L^{-1}); P_0 : concentração inicial de etanol (g.L^{-1}); S : concentração final do substrato (g.L^{-1}); S_0 : concentração inicial do substrato (g.L^{-1}).

2.9 Análise dos dados

O software Microsoft Excel 2019 MSO (versão 2302 Build 16.0.16130.20332) foi utilizado para traçar gráficos de curva de crescimento (Apêndice A) e calcular o desvio padrão dos dados de cinética fermentativa. Os demais resultados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e de comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o Software AgroEstat (BARBOSA e MALDONADO JUNIOR, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cinética fermentativa

Os efeitos de diferentes hidrolisados hemicelulósicos na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica crescimento (μ_x), produção de biomassa, velocidade de consumo de glicose, velocidade de consumo de xilose, rendimento em biomassa e rendimento em etanol de *P. membranifaciens* LJ04, foram analisados e quantificados durante período de 72 h. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

A Tabela 1 demonstra que o uso de hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação obteve velocidade específica máxima de crescimento inferior ao hidrolisado sintético e destoxificado. Destaca-se que a fase de crescimento exponencial da levedura foi mais longa em relação aos demais tratamentos, evidenciando que o crescimento foi mais lento nesta condição. A cepa recombinante de *P. kudriavzevii* N-X (CCTCC M2017759) apresentou comportamento similar, pesquisadores observaram que um menor crescimento celular e uma fase lag

prolongada foi obtida em hidrolisado não-destoxificado como substrato (HAO *et al.*, 2013).

Ao se analisar os demais parâmetros percebe-se que os resultados para hidrolisado destoxificado e sem destoxificação possuem valores muito semelhantes. A presença de inibidores da fermentação levou a um crescimento celular mais vagaroso, mas parece não afetar as demais vias metabólicas uma vez que a velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida, velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) não possuem diferenças significativas.

Outro fator importante é a diminuição na velocidade de consumo de glicose e aumento na velocidade de xilose para os hidrolisados hemicelulósicos destoxificado e sem destoxificação. As condições presentes favoreceram a assimilação de açúcares de cinco carbonos, o que explica a redução do uso de glicose.

P. membranifaciens apresentou velocidade de consumo de 0,66 g.L⁻¹.h⁻¹ para glicose e 0,75 g.L⁻¹.h⁻¹ para xilose. Outras espécies de leveduras obtiveram resultados inferiores, 0,41 g.L⁻¹.h⁻¹ para *P. stipitis* Y7-1 (cepa adaptada) e 0,41 g.L⁻¹.h⁻¹ para *Scheffersomyces stipitis* NRRLY-7124 (HAO *et al.*, 2013; NAKANISHI *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Efeitos de diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos na velocidade específica máxima de crescimento (μ_m), velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida e velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x) de *Pichia membranifaciens* LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

Hidrolisado hemicelulósico	Velocidade específica máxima de crescimento (μ_m , h ⁻¹)	t_{μ_m} ^A (h)	Velocidade específica de crescimento (μ_x , h ⁻¹)	Biomassa produzida ^B (g.L ⁻¹)	Q_g (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Q_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Sintético	0,031 ± 0,002	0-12	0,009 ± 0,001	1,835 ± 0,177	1,074 ± 0,001	0,350 ± 0,001
Destoxificado	0,030 ± 0,008	0-12	0,006 ± 0,001	1,085 ± 0,267	0,638 ± 0,002	0,624 ± 0,000
Sem destoxificação	0,019 ± 0,001	0-24	0,007 ± 0,001	1,305 ± 0,045	0,664 ± 0,001	0,746 ± 0,004

Desvio padrão (±) entre os dados resultantes das repetições experimentais.

^A Intervalo de tempo usado para determinação de μ_m .

^B Diferença entre os valores de biomassa em 72h e 0h de incubação.

A Tabela 2 demonstra que o rendimento em biomassa foi superior para o hidrolisado sintético, com resultados semelhantes para os demais hidrolisados. Já a conversão de açúcares em etanol, teve redução de 8,48% para o substrato

destoxificado e 20,47% para o meio sem destoxificação. Independentemente do tratamento utilizado, os rendimentos de etanol do presente estudo foram menores aos verificados em meio sem destoxificação por *P. stipitis* Y7-1 (0,43 g.g⁻¹) (HAO *et al.*, 2013).

Tabela 2 - Efeitos de diferentes tipos de hidrolisados hemicelulósicos no rendimento de biomassa e etanol de *Pichia membranifaciens* LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

Substrato	Tempo	Yx/s ^a (g.g ⁻¹)	Yp/s ^b (g.g ⁻¹)
Hidrolisado sintético	6h	0,012 ± 0,001	0,342 ± 0,004
	12h	0,027 ± 0,001	0,292 ± 0,001
	24h	0,037 ± 0,006	0,249 ± 0,002
	48h	0,045 ± 0,005	0,145 ± 0,000
	72h	0,054 ± 0,005	0,073 ± 0,001
Hidrolisado destoxificado	6h	0,020 ± 0,007	0,313 ± 0,002
	12h	0,026 ± 0,006	0,280 ± 0,000
	24h	0,031 ± 0,007	0,233 ± 0,002
	48h	0,034 ± 0,005	0,144 ± 0,003
	72h	0,036 ± 0,009	0,095 ± 0,000
Hidrolisado sem destoxificação	6h	0,011 ± 0,002	0,272 ± 0,000
	12h	0,013 ± 0,003	0,189 ± 0,001
	24h	0,033 ± 0,000	0,139 ± 0,001
	48h	0,037 ± 0,005	0,102 ± 0,000
	72h	0,039 ± 0,001	0,078 ± 0,000

Desvio padrão (±) entre os dados resultantes das repetições experimentais.

^a Rendimento de biomassa.

^b Rendimento de etanol.

3.2 Análises microbiológicas

Os valores de viabilidade celular, índice de brotamento, viabilidade dos brotos e produção de massa celular foram analisados durante todo processo fermentativo. Os dados coletados encontram-se na Tabela 3.

Da análise dos resultados (Tabela 3), percebe-se que entre os substratos testados houveram diferenças significativas apenas para viabilidade brotos na presença de hidrolisado destoxificado e sem destoxificação. Quanto aos tempos, verifica-se que ao longo da fermentação houve decréscimo da viabilidade celular.

Tabela 3 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para massa celular, viabilidade celular e viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

Tratamentos	Massa celular (g.L ⁻¹)	Viabilidade celular (%)	Viabilidade dos brotos (%)
<i>Tratamento primário</i>			
Hidrolisado hemicelulósico			
Sintético	2,86 a	93,73 a	95,75 a
Destoxificado	2,873 a	92,74 a	86,65 b
Sem destoxificação	2,45 a	82,19 a	86,53 b
Teste F	4,44ns	7,50ns	61,77**
DMS	0,66	13,81	3,98
CV	14,28	9,04	2,60
<i>Tratamento secundário</i>			
Tempos (h)			
0	1,95 d	94,97 a	93,14 a
6	2,33 c	91,98 ab	91,81 a
12	2,59 c	90,35 bc	86,71 a
24	2,94 b	83,85 d	86,15 a
48	3,18 ab	90,17 bc	94,86 a
72	3,36 a	86,00 cd	85,19 a
Teste F	79,96**	16,81**	2,14ns
DMS	0,27	4,52	12,93
CV	5,38	2,69	7,69
Interações			
TP x TS	3,11*	7,87**	2,57*

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns: não significativo ($p \geq 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. DMS: desvio mínimo significativo. CV: coeficiente de variação. TP x TS: Interação entre doses e tempos.

Para melhor compreensão dos valores presentes da Tabela 3, realizou-se os desdobramentos das interações. Os resultados desta análise encontram-se representados graficamente nas Figuras 4 e 5.

Em relação ao crescimento celular (Figura 4), nota-se que as médias identificadas foram similares para hidrolisado hemicelulósico destoxificado e sem destoxificação. Mostrando que presença de inibidores presentes no meio não afetou substancialmente o metabolismo de crescimento de *P. membranifaciens*.

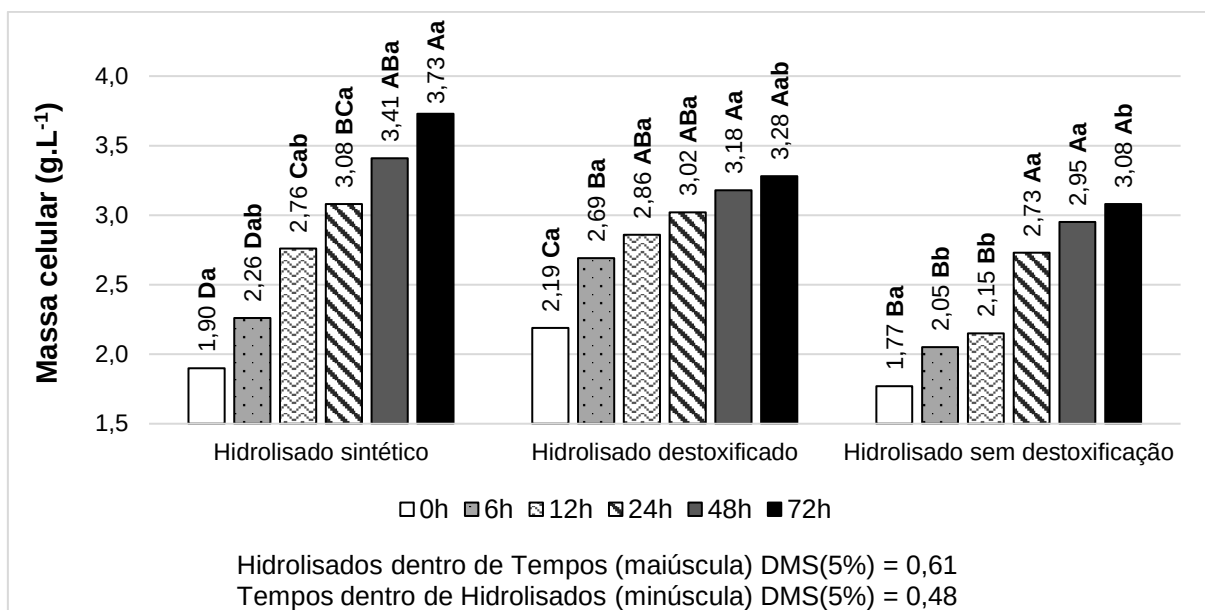


Figura 4 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para massa celular produzida por *Pichia membranifaciens* LJ04 produzida na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

P. membranifaciens LJ04 teve declínio da viabilidade celular no hidrolisado sem destoxificação (Figura 5) e queda na viabilidade dos brotos no meio destoxificado (Figura 6), ambos no intervalo de 12 à 24h de fermentação. A metabolização de grandes quantidades em um pequeno intervalo de tempo, como o verificado nas primeiras 12h, podem levar a aumento da pressão osmótica no meio e desequilíbrios na membrana celular da levedura (SILVA *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2019). O que pode explicar a diminuição vistas nestes dois casos. Apesar disto, nota-se que a partir de 48h o fermento conseguiu se recuperar, apresentando médias $\geq 85\%$. Faixa recomendada em processos que visam a separação e tratamento do fermento para posterior utilização em novos processos fermentativos (AMORIM, 2005).

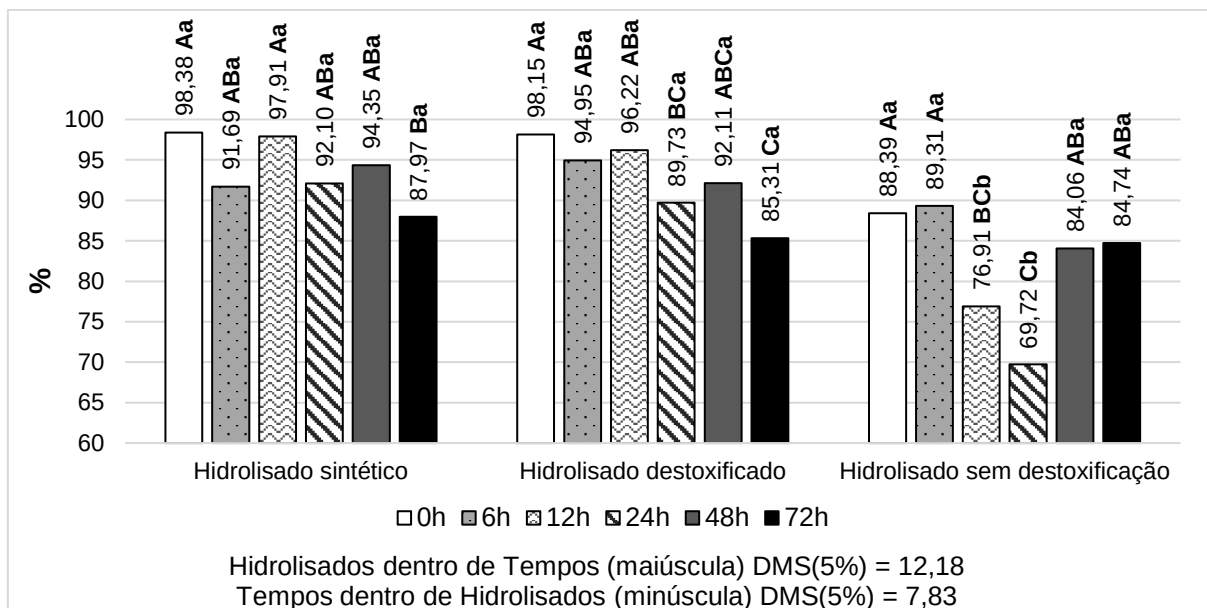


Figura 5 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para viabilidade celular de *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

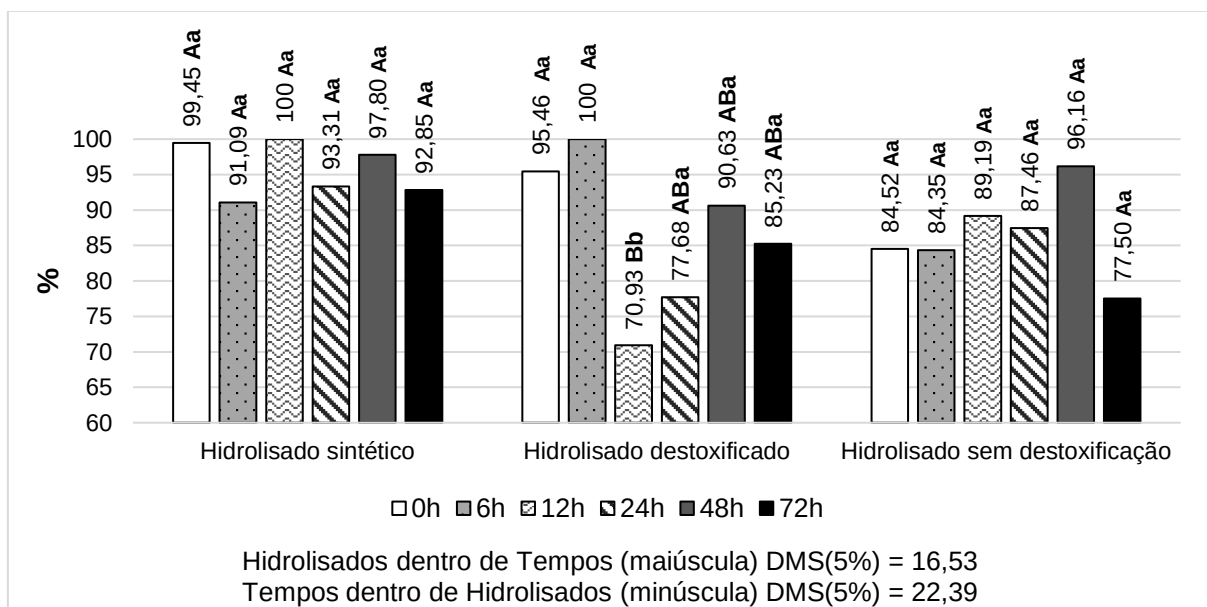


Figura 6 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para viabilidade dos brotos de *Pichia membranifaciens* LJ04 produzida na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 horas.

3.3 Produtos da fermentação alcoólica

As concentrações de etanol, ácido acético e glicerol produzidos durante o processo fermentativo foram quantificadas e encontram-se na Tabela 4.

Da análise dos resultados (Tabela 4), percebe-se que entre os hidrolisados hemicelulósicos estudados, não houve diferença entre as médias de glicerol encontradas para meio sintético e sem destoxificação. Para os demais tratamentos, não foi possível uma análise detalhada sem a realização dos desdobramentos das interações. Os resultados desta análise encontram-se representados graficamente nas Figuras 7 à 9.

Tabela 4 - Análise de variância (Teste F) e teste de médias (Tukey) para teores de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol consumidos e/ou produzidos por *Pichia membranifaciens* LJ04, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

Tratamentos	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ácido acético (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)
<i>Tratamento primário</i>			
Hidrolisado hemicelulósico			
Sintético	1,40 a	2,95 c	5,78 a
Destoxificado	1,26 b	3,42 b	4,70 b
Sem destoxificação	1,46 a	3,79 a	3,77 c
Teste F	54,80**	1444,60**	10508,19**
DMS	0,08	0,07	0,06
CV	3,58	1,13	0,69
<i>Tratamento secundário</i>			
Tempos (h)			
0	0,00 f	0,00 f	0,00 f
6	1,31 e	1,00 e	8,31 a
12	1,52 d	1,97 d	7,32 b
24	1,69 c	3,41 c	6,05 c
48	1,82 b	5,90 b	4,11 d
72	1,91 a	8,05 a	2,68 e
Teste F	1407,47**	35693,37**	53450,45**
DMS	0,0865	0,07	0,06
CV	3,36	1,18	0,69
Interações			
TP x TS	22,76*	161,09**	1623,55**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 < p < 0,05$); ns: não significativo ($p > 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. DMS: desvio mínimo significativo. CV: coeficiente de variação. TP x TS: Interação entre doses e tempos.

A produtividade do etanol em hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação depende da tolerância da linhagem utilizada à inibidores e sua capacidade de conversão (ALMEIDA *et al.*, 2007; DEVI *et al.*, 2021). Conforme exposto no capítulo

2, *Pichia membranifaciens* LJ04 apresentou tolerância à furfural, hidroximetilfurfural, ácido fênico e ácido levulínico, com produção de altas concentrações de etanol. Entretanto, não há até o presente momento um estudo com hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação com esta cepa.

Os resultados demonstraram que a maior produção de etanol foi encontrada no meio sintético, com valores semelhantes, porém diferentes estatisticamente, para o substrato destoxificado e sem destoxificação (Figura 7). Comportamento similar foi relatado por Zhang *et al.* (2014) utilizando-se *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, sendo o teor alcoólico do hidrolisado sem destoxificação semelhante ao controle.

Dentre as estratégias que podem ser tomadas para minimizar os efeitos inibitórios presentes nos hidrolisados sem destoxificação, a que melhor se adequa a *P. membranifaciens* é evitar altas concentrações de etanol presentes no meio, através da sua remoção por evaporação a vácuo ou separação por membrana. Uma vez que, em altas concentrações, o álcool etílico se torna um composto tóxico, mesmo para os microrganismos que o produzem (TAHERZADEH e KARIMI, 2011). Desta forma, a produção de altas doses de etanol em meio sem destoxificação potencializa o efeito inibitório do metabolismo fermentativo de LJ04.

Em relação ao teor alcoólico, nota-se que a maior concentração foi obtida após 6h de fermentação. Após este período houve declínio nos teores alcoólicos para todos os tratamentos, obtendo-se médias menores que 2,70 g.L⁻¹. Desempenho que já havia sido observado com *P. membranifaciens* LJ04 em estudo anterior (RIBEIRO, 2019), que detectou teores de etanol após 72h, cerca de 4 vezes menores ao produzido em 6h de fermentação em meio sintético e destoxificado

Em fermentações alcoólicas para etanol 2G, é comum que haja, após o rápido consumo da glicose pelas leveduras, crescente aumento nas concentrações de ácido acético no meio de fermentação. Segundo Walker (1998), estes resultados indicam que o microrganismo passou a utilizar o etanol como fonte de carbono pelas leveduras. Desta forma, ele é convertido em acetaldeído, e posteriormente transformado em acetato ou ácido acético. De acordo com a literatura, é confirmado que o rápido consumo de uma fonte de carbono nos substratos pode induzir à metabolização de outros compostos orgânicos presentes no meio (KURTZMAN, 1998), sendo comprovado cientificamente que *Pichia membranifaciens* é uma

levedura capaz de crescer e metabolizar etanol como fonte de alimento (KURTZMAN, 2011).

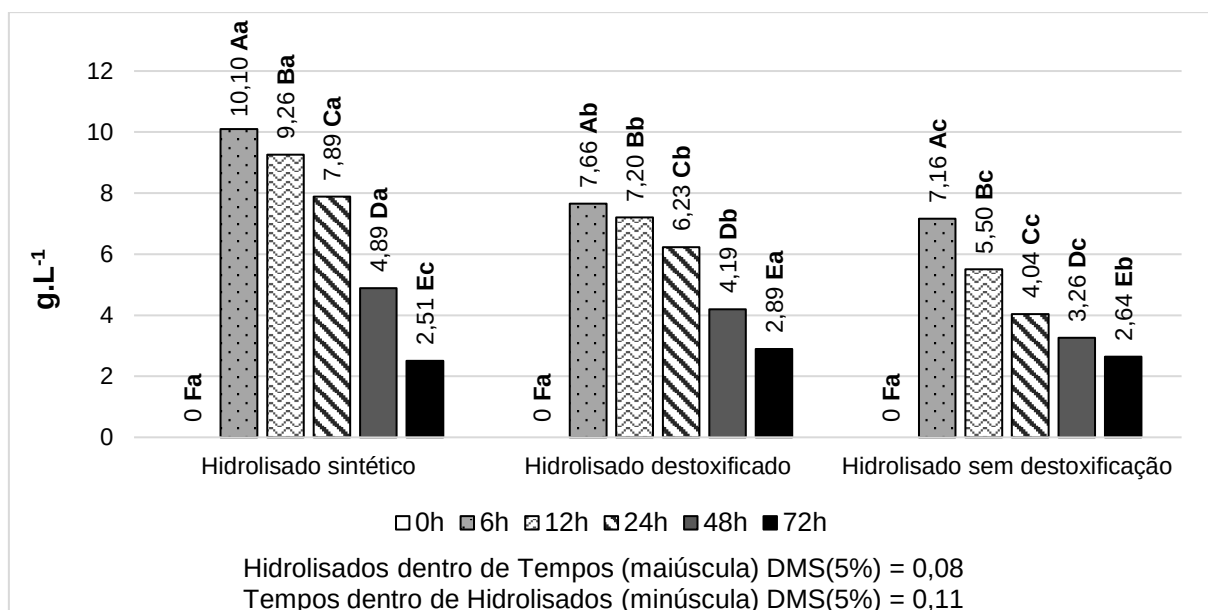


Figura 7 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para etanol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

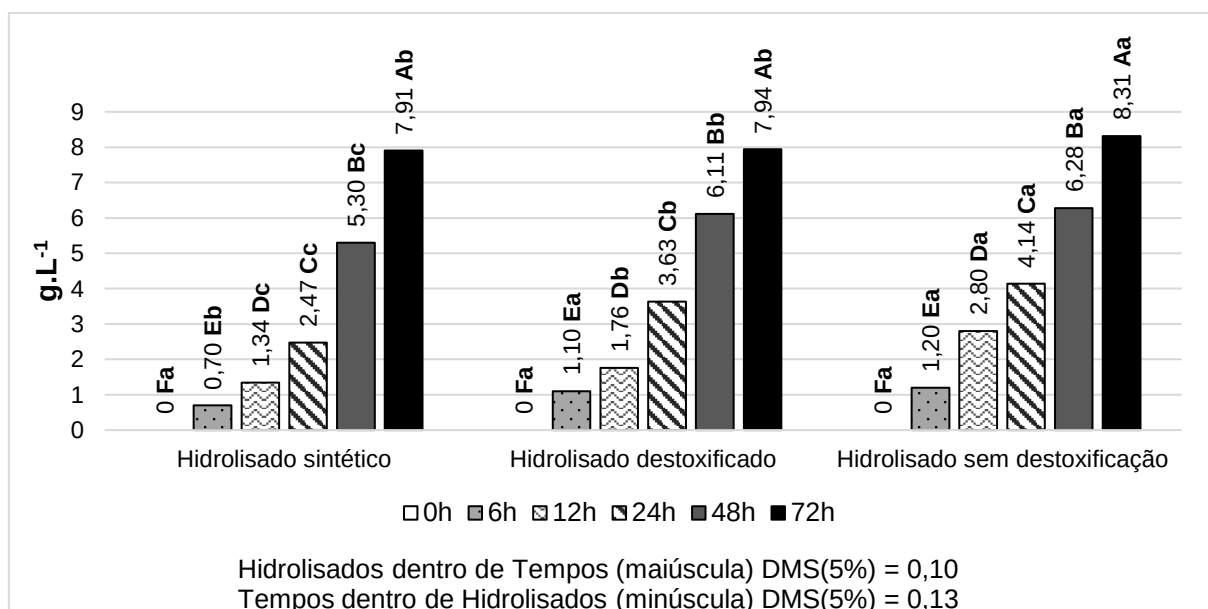


Figura 8 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para ácido acético produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

A Figura 9 demonstra que a produção de glicerol foi semelhante entre os meios fermentativos, entretanto o hidrolisado sem destoxificação produziu teor estatisticamente maior que os demais tratamentos. Grande parte dos açúcares presentes no substrato são convertidos em etanol, gás carbônico, massa celular e energia pelas leveduras. Apesar disto, parte desses carboidratos são desviados para outras vias e geram moléculas que não fazem parte do interesse das usinas. Dentre os subprodutos produzidos, glicerol é a molécula mais sintetizada pelas leveduras, pois sua metabolização é linearmente associada à produção de etanol (MUTTON *et al.*, 2019).

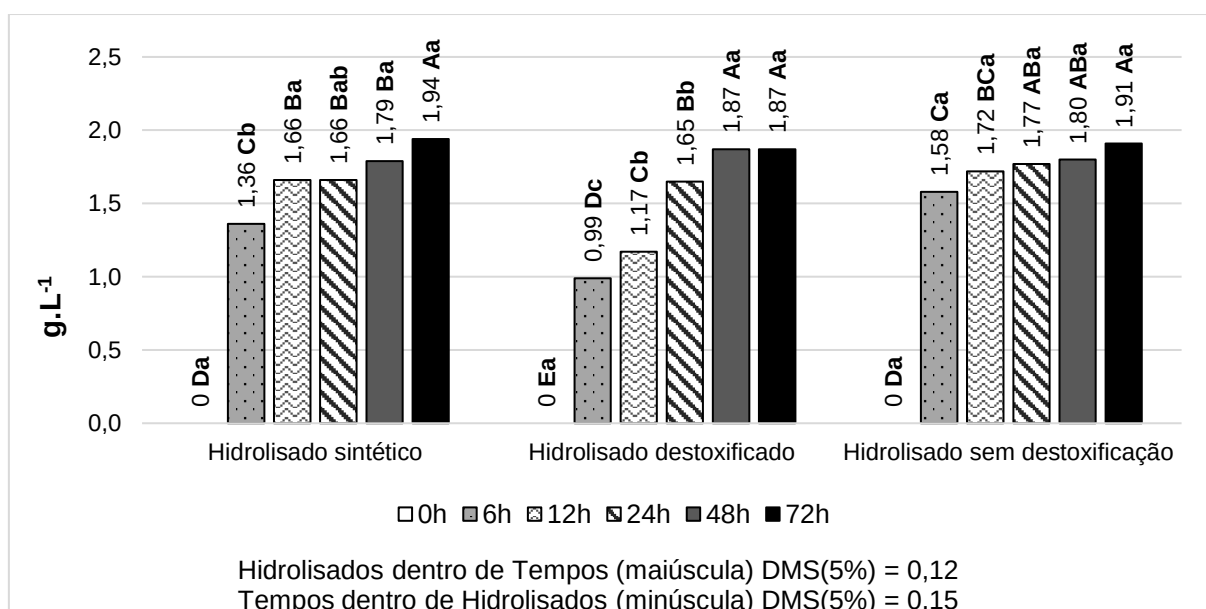


Figura 9 - Desdobramento da Interação Hidrolisados x Tempos para glicerol produzido por *Pichia membranifaciens* LJ04 na presença de diferentes substratos de fermentação, à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 2,8 g.L⁻¹, durante 72 h.

4. CONCLUSÕES

O trabalho demonstrou que é possível a produção de etanol por *Pichia membranifaciens* LJ04 em hidrolisados hemicelulósicos sem destoxificação, sem que haja perdas significativas no rendimento do processo fermentativo de produção de etanol.

A presença de inibidores da fermentação no hidrolisado levou a um crescimento celular mais vagaroso, mas não afetou a velocidade específica de crescimento (μ_x), biomassa produzida, velocidade de consumo de glicose (Q_g) e xilose (Q_x).

Houve diminuição na velocidade de consumo de glicose e aumento na velocidade de xilose em hidrolisado destoxificado e sem destoxificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005.

ASTUTI, R. I.; NURHAYATI, N.; ALIFIYANTI, S.; SUNARTI, T. C.; MERYANDINI, A. Exogenous L-proline increases stress tolerance of yeast *Pichia kudriavzevii* against inhibitors in lignocellulose hydrolysates and enhances its ethanol production. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2018. p. 012052.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Sistema para Análises Estatísticas de Ensaaios Agronômicos - AgroEstat**, versão 1.1.0.711, 2015.

BRONZATO, G. R. F. **Avaliação do aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol 2G**. 2021. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 108 p. 2021.

BRONZATO, G. R. F.; REIS, V. A. C. A.; BORRO, J. A.; LEÃO, A. L.; CESARINO, I. Second generation ethanol made from coir husk under the biomass Cascade approach. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 693, n. 1, p. 107–114, 2019. DOI: 10.1080/15421406.2020.1723890

BRONZATO, G. R. F.; ZIEGLER, S. M.; SILVA, R. C.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Characterization of the pre-treated biomass of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth)

for the second generation ethanol production. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 655, n. 1, 2017. DOI: 10.1080/15421406.2017.1360696

BRONZATO, G. R. F.; ZIEGLER, S. M.; SILVA, R. C.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Water hyacinth second-generation ethanol production: a mitigation alternative for an environmental problem. **Journal of Natural Fibers**, 2018. DOI: 10.1080/15440478.2018.1458000

CANDIDO, R. G. *et al.* **Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis**. Elsevier, v. 142, 2019.

CARVALHO, P.; COSTA, C. E.; BAPTISTA, S. I. L.; DOMINGUES, L. CARVALHO. Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy. **Biofuel Research Journal**, v. 8, n.4, p. 1529-1549, 2021.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; CODATO, C. B.; MARTINI, C.; BASTOS, R. G.; TAUKTORNISIELO, S. M. Yeast for pentose fermentation: isolation, screening, performance, manipulation, and prospects. **Advances of basic science for second generation bioethanol from sugarcane**, p. 133-157, 2017.

CHANDEL, A. K.; GARLAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; SILVA, S. S. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource technology**, v. 264, p. 370-381, 2018.

COLOMBI, B. L.; ZANONI, P. R. S.; TAVARES, L. B. B. Effect of phenolic compounds on bioconversion of glucose to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 7, p. 1444-1450, 2018.

DEVI, A.; SINGH, A.; BAJAR, S.; PANT, D.; DIN, Z. U. Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering, Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105798, 2021.

DONINI, C. A.; SILVA, M. K. L.; BRONZATO, G. R. LEÃO, A. L. CESARINO, I. Evaluation of a biosensor based on reduced graphene oxide and glucose oxidase enzyme on the monitoring of second-generation ethanol production. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, 2020. DOI: 10.1007/s10008-019-04471-7

FREITA, C. M. **Emprego da *Moringa oleífera* Lam para destoxificação do licor hemicelulósico de sorgo e cana-energia para produção de etanol de segunda geração.** 2020. 120 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2020.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 677–685, 2007.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74: 937-953, 2007.

HAO, X. C.; YANG, X. S.; WAN, P.; TIAN, S. Comparative proteomic analysis of a new adaptive *Pichia Stipitis* strain to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2013.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 489–496, 2016.

HOLLUPI, N. T. **Isolamento, caracterização e identificação de leveduras do ecossistema de produção do sorgo sacarino.** 2015. 58 f. Monografia (Graduação) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2015.

JÖNSSON, L. J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-10, 2013.

KORDALA, N.; WALTER, M.; BRZOZOWSKI, B.; LEWANDOWSKA, M. 2G-biofuel ethanol: an overview of crucial operations, advances and limitations. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02861-y>

KURTZMAN, C. P. *Pichia* E. G. Hansen emend. Kurtzman. In: Kurtzman, C. P.; FELL, J. W. (Eds.). **The Yeasts: A Taxonomic Study**, 4. ed., v. 1. Elsevier Science, 1998.

LAMICHHANE, G.; ACHARYA, A.; POUDEL, D. K.; ARYAL, B.; GYAWALI, N.; NIRLAULA, P.; PARAJULI, N. Recent advances in bioethanol production from

lignocellulosic biomass. **International Journal of Green Energy**, v. 18, n. 7, p. 731-744, 2021.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LI, X.; CHEN, Y.; NIELSEN, J. Harnessing xylose pathways for biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 57 p. 56-65, 2019. 10.1016/j.copbio.2019.01.006

MARTON, J. M. **Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2002.

MILESSI, T. S.; SILVA, C. R.; MORAES, G. S.; AQUINO, P. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.; ZANGIROLAMI, T. C. Continuous 2G ethanol production from xylose in a fixed-bed reactor by native *Saccharomyces cerevisiae* strain through simultaneous isomerization and fermentation. **Cellulose**, v. 27, p. 4429-4442, 2020.

MUTTON, M. J. R.; FERRARI, F. C.; FREITA, L. A.; FREITA, C. M.; ANDRIETTA, M. D. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 389-394, 2019.

NAKANISHI, S. C.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.. NASCIMENTO, V. M.; COSTA, A. C.; ROCHA, G. J. M.; IENCZAK, J. L. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211-2221, 2017.

NDUBUISI, I. A.; AMADI, C. O.; NWAGU, T. N., MURATA; Y., & OGBONNA; J. C. Non-conventional yeast strains: unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. **Biotechnology Advances**, v. 63, p. 108100, 2023.

NDUBUISI, I. A.; QIN, Q.; LIAO, G.; WANG, B.; MONEKE, A. N.; OGBONNA, J. C.; FANG, W. Effects of various inhibitory substances and immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-12, 2020.

PAVANI, C. D.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A.; COSTA, G. H. G.; MUTTON, M. J. R. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn sobre a fisiologia da levedura em fermentação. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, v. 5, 2013.

PEREZ, C. L.; PEREIRA, L. P. R. C.; MILESSI, T. S.; SANDRI, J. P.; DEMEKE, M.; FOULQUIE-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M.; ZANGIROLAMI, T. C. Towards a practical industrial 2G ethanol production process based on immobilized recombinant *S. cerevisiae*: Medium and strain selection for robust integrated fixed-bed reactor operation. **Renewable Energy**, v. 185, p. 363-375, 2022.

RAMYA, P.; GOMATHI, V.; DEVI, R. P.; BALACHANDAR, D. *Pichia kudriavzevii*—a potential soil yeast candidate for improving soil physical, chemical and biological properties. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4619-4628, 2021.

RIBEIRO, N. N. **Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração**. 2019. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista, 2019.

RIBEIRO, N. N.; FREITA, L. A.; TRALLI, L. F.; SILVA, A. F.; FREITA, C. M.; MENDES, F. Q.; TEIXEIRA, V.; SILVA JUNIOR, C. N.; MUTTON, M. J. R. Otimização das condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 720–728, 2019.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Microbiological Research**, v. 240, p. 126534, 2020.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.

SANDRI, J. P.; MILESSI, T. S.; ZANGIROLAMI, T. C.; MUSSATTO, S. I. Screening of yeast co-culture using crude hydrolysate for co-fermentation of pentose and hexose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 17, n. 6, p. 1639-1653, 2023.

SEWSYNKER-SUKAI, Y.; NAOM-DAVID, A.; GUEGUIM-KANA, E. B. Recent developments in the application of kraft pulping alkaline chemicals for lignocellulosic pretreatment: Potential beneficiation of green liquor dregs waste. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123225, 2020. 10.1016/j.biortech.2020.123225

SHARMA, B.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C. G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource technology**, v. 313, p. 123630, 2020.

SILVA, A. F. **Avaliação do potencial de leveduras fermentadoras de pentoses na produção de etanol 2G, a partir de bagaço de sorgo**. 2019. 90 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2019.

SILVA, C. N. S.; BRONZATO, G. R. F.; CESARINO, I.; LEÃO, A. L. Second-generation ethanol from pineapple leaf fibers. **Journal of Natural Fibers**, v. 17, n. 1, p. 113–121, 2020. DOI: 10.1080/15440478.2018.1469453

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H. D.; ALVES, R. R. D. N.; SANTANA, D. P. D. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, p. 695-698, 2006.

SOARES, L. B.; BONAN, C. I. D. G.; BIAZI, L. E.; DIONÍSIO, S. R.; BONATELLI, M. L.; ANDRADE, A. L. D.; RENZANO, E. C.; COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, p. 105549, 2020.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. **Biofuels**, p. 287-311, 2011. doi:10.1016/b978-0-12-385099-7.00012-7 (2011).

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. John Wiley & Sons, 1998.

WANG, S.; CHENG, G.; JOSHUA, C.; ZIJUN, H.; XINXIAO, S.; RUIMIN, L.; QIPENG, Y. Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p. 250, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0668-x>

XU, Y.; WANG, D. Integrating starchy substrate into cellulosic ethanol production to boost ethanol titers and yields. **Applied Energy**, v. 195, p. 196-203, 2017.

ZHANG, Y.; HOU, T.; LI, B.; LIU, C.; MU, X.; WANG, H. Acetone-butanol-ethanol production from corn stover pretreated by alkaline twin-screw extrusion pretreatment. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, p. 913-921, 2014.

APÊNDICES

Apêndice A – EFEITO DE FURFURAL, HIDROXIMETILFURFURAL, ÁCIDO FÊNICO E ÁCIDO LEVULÍNICO NA CINÉTICA FERMENTATIVA DE *Pichia membranifaciens* LJ04

Detecção da fase de crescimento exponencial e velocidade específica máxima de crescimento

Considerando-se diferentes limites iniciais e finais de tempo, gráficos de dispersão com linha de tendência linear foram traçados para valores de ‘ $\ln (\text{Biomassa final/Biomassa inicial}) \times \text{tempo}$ ’ para processos fermentativos realizados na presença de 0,5 g.L⁻¹, 1,0 g.L⁻¹, 1,5 g.L⁻¹, 2,0 g.L⁻¹, 2,5 g.L⁻¹ e 3,0 g.L⁻¹ de furfural, HMF (hidroximetilfurfural), ácido fênico e ácido levulínico, assim como, na ausência de substâncias inibidoras.

Os gráficos que exibiram melhores coeficientes de correlação (r^2), foram escolhidos para representar a fase exponencial de crescimento da levedura. Por fim, o coeficiente angular de cada reta foi determinado para estabelecimento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) de *P. membranifaciens* LJ04 em diferentes condições.

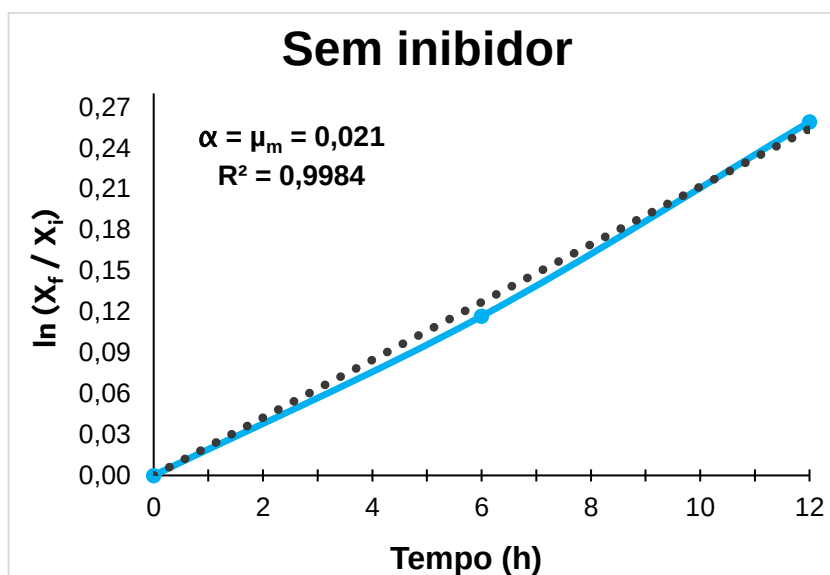


Figura 1A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético sem inibidores, contendo glicose (25,0 g.L⁻¹) e xilose (45,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

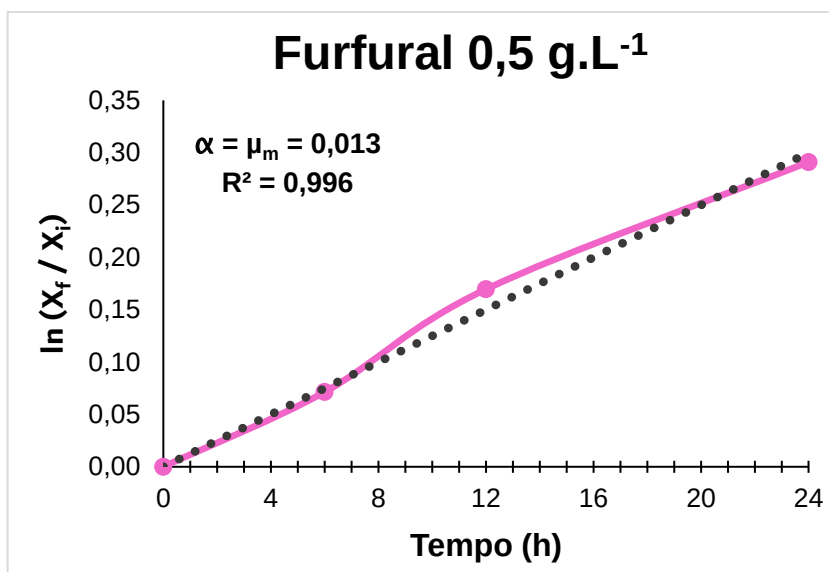


Figura 2A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

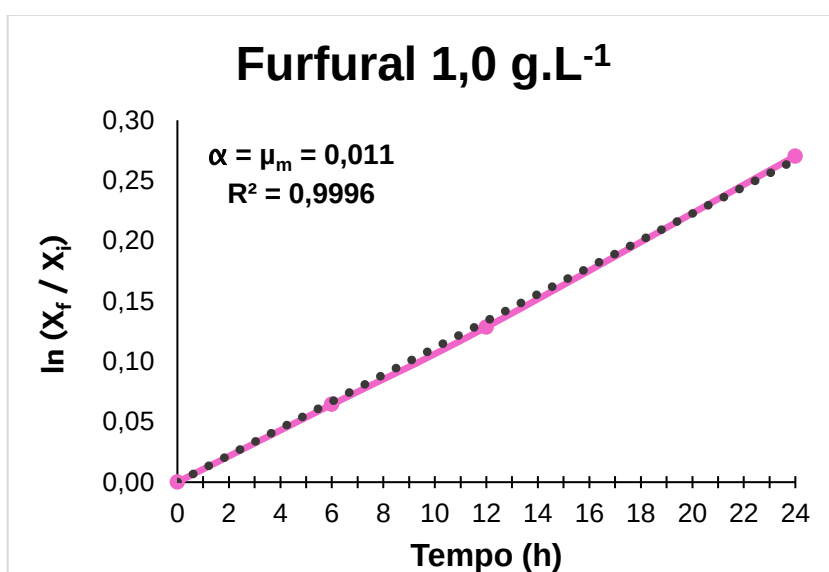


Figura 3A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

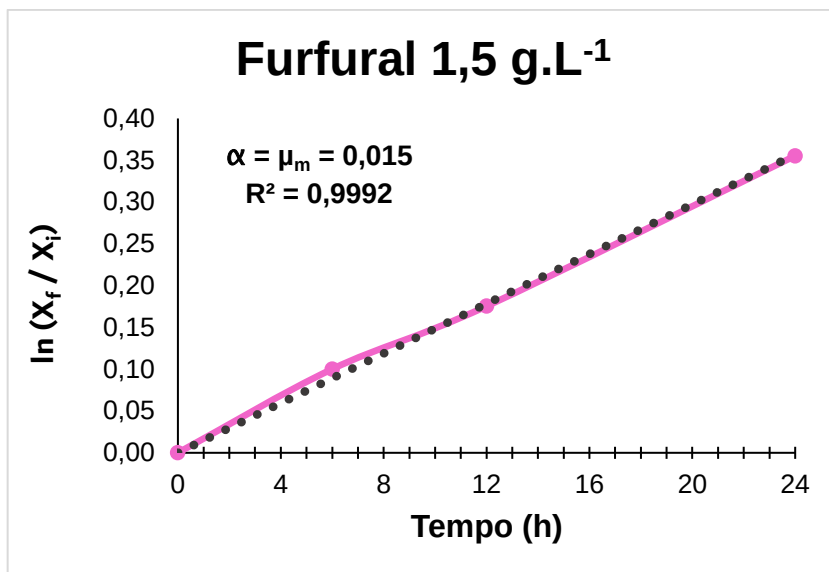


Figura 4A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

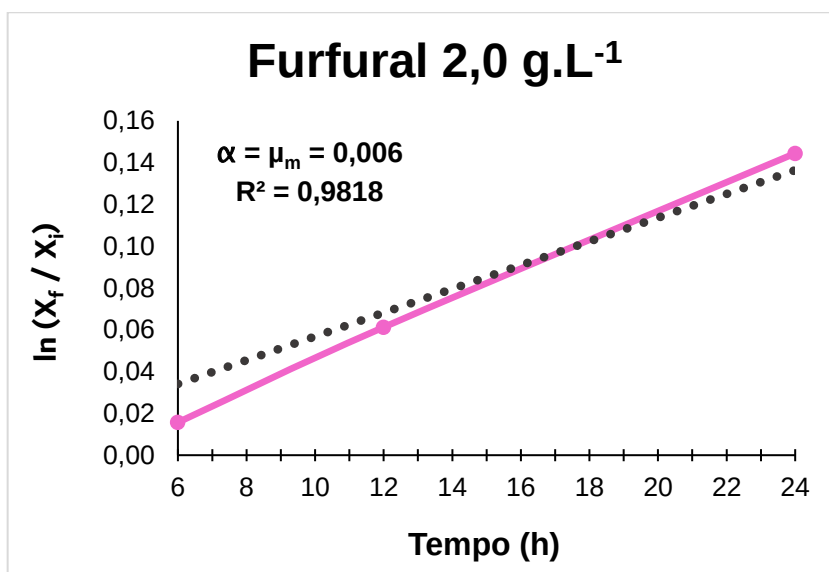


Figura 5A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

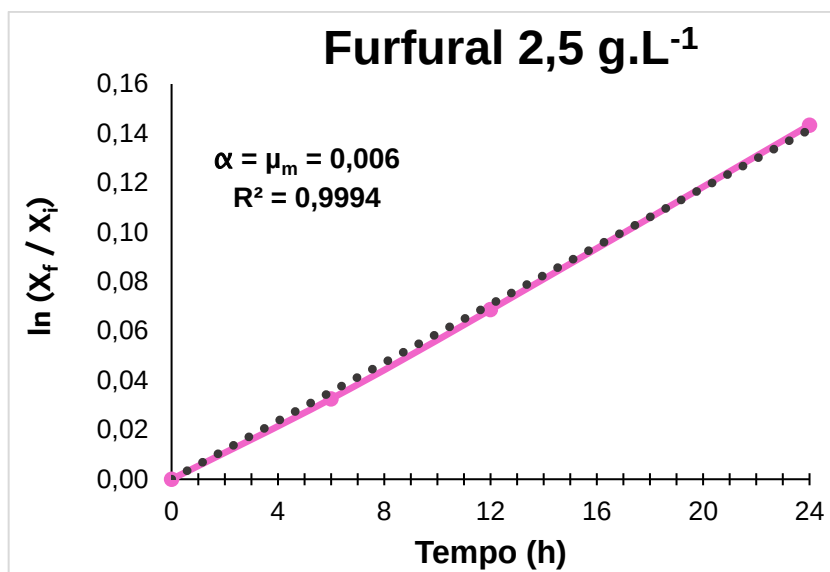


Figura 6A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (2,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

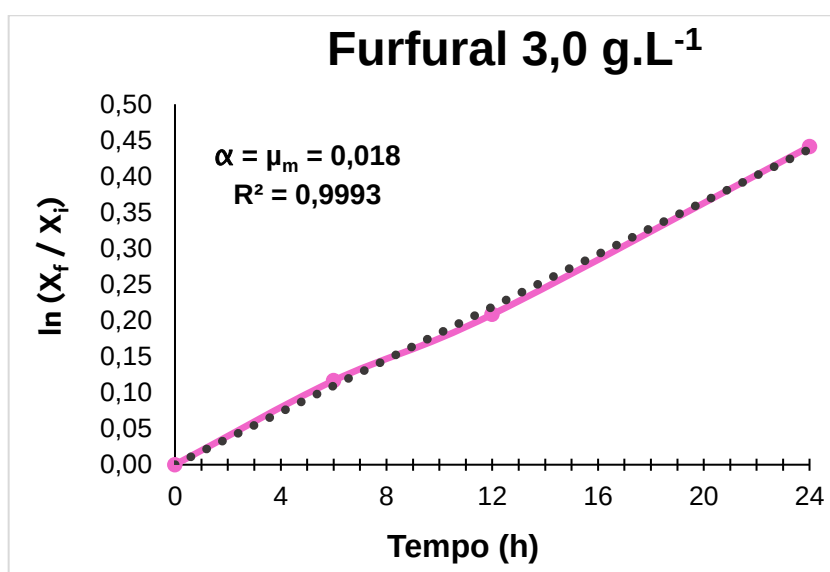


Figura 7A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e furfural (3,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

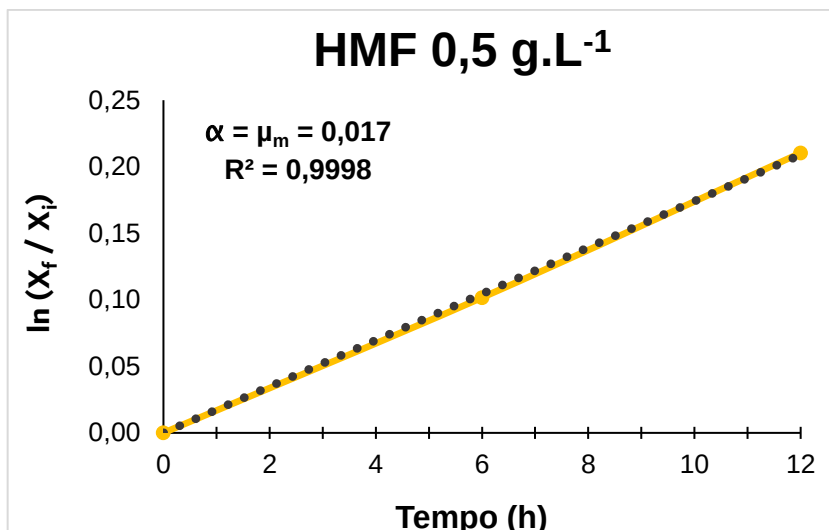


Figura 8A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

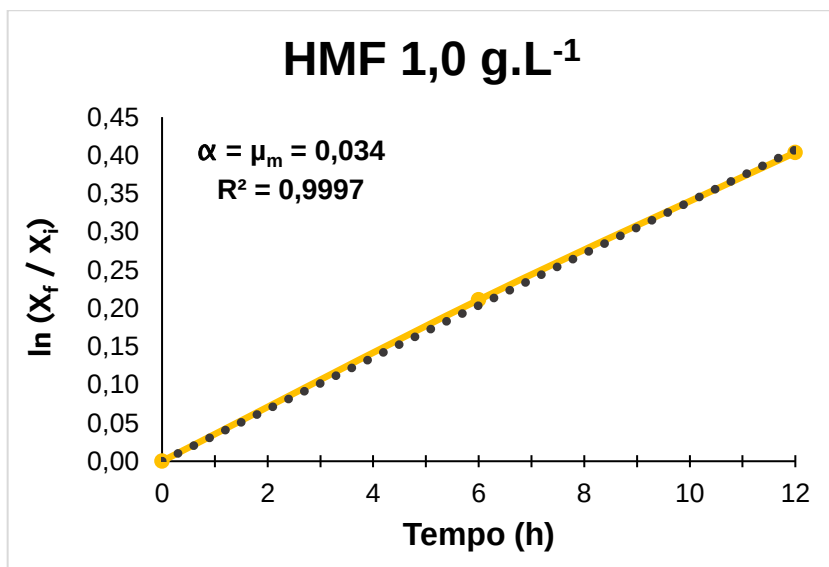


Figura 9A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

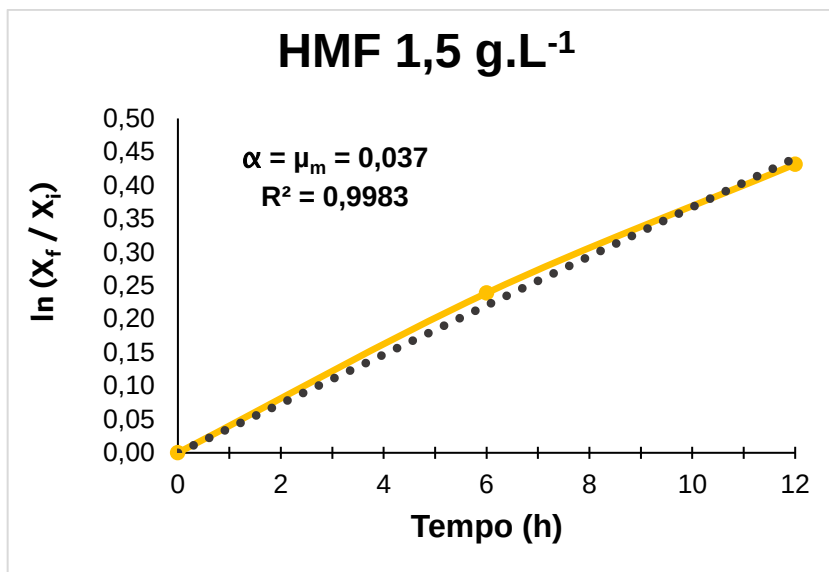


Figura 10A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

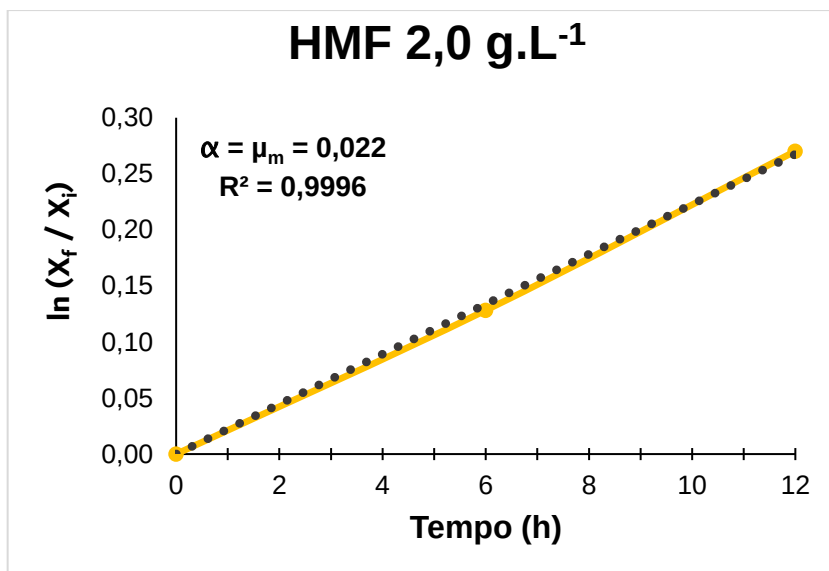


Figura 11A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

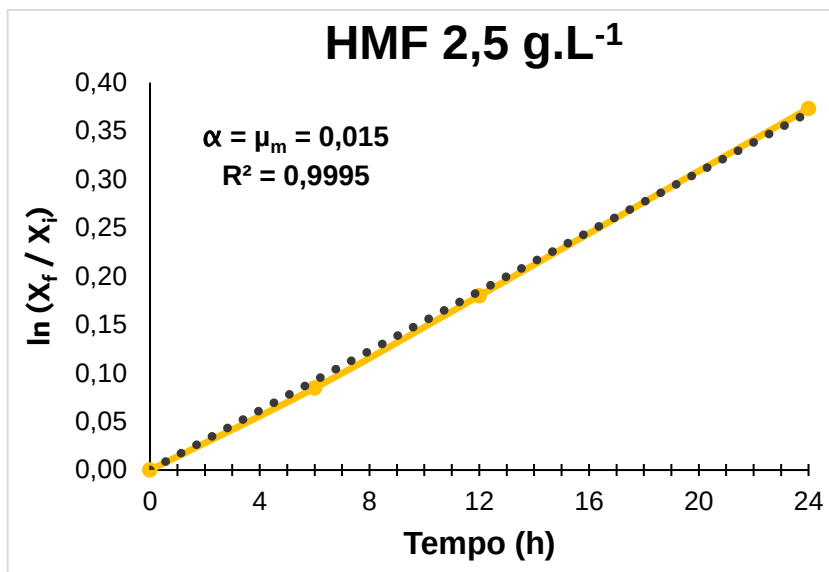


Figura 12A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (2,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

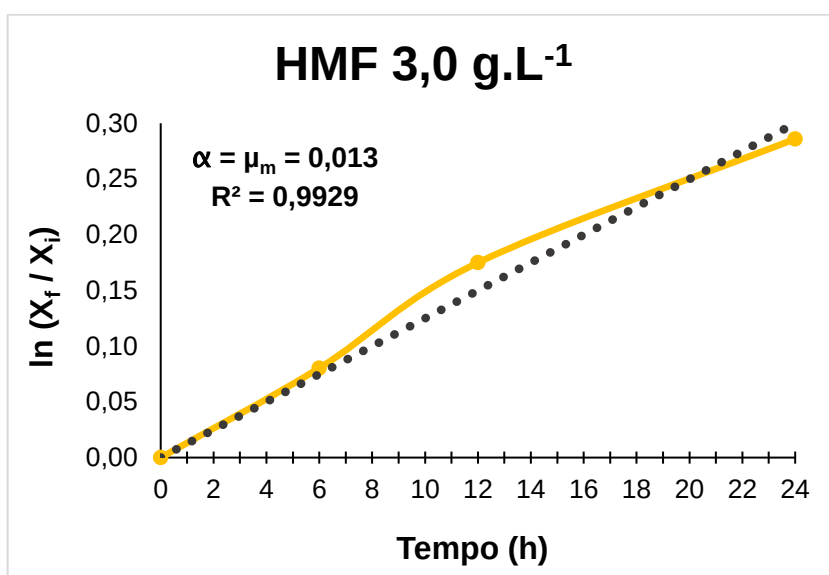


Figura 13A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e hidroximetilfurfural (3,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

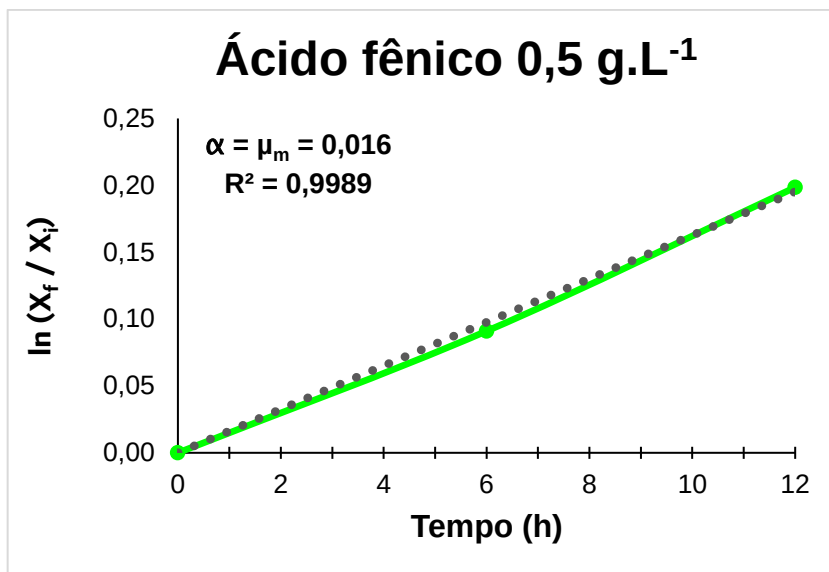


Figura 14A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

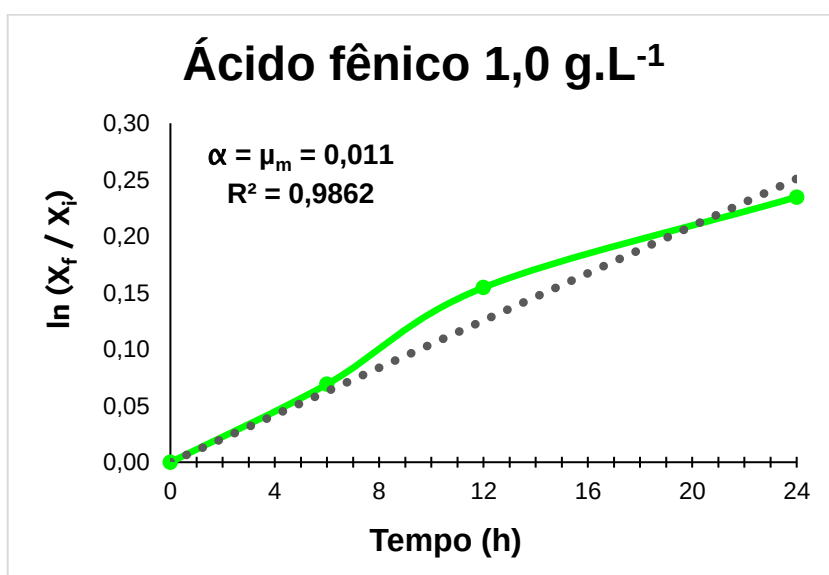


Figura 15A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

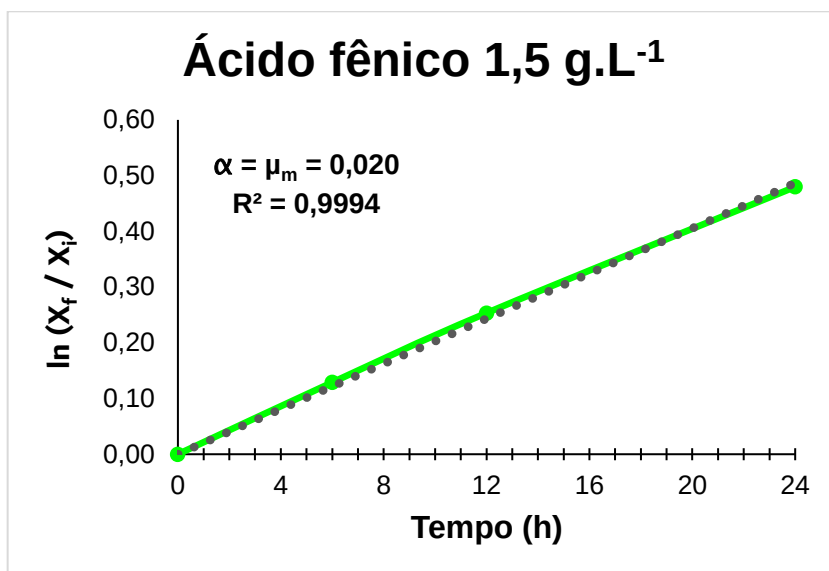


Figura 16A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

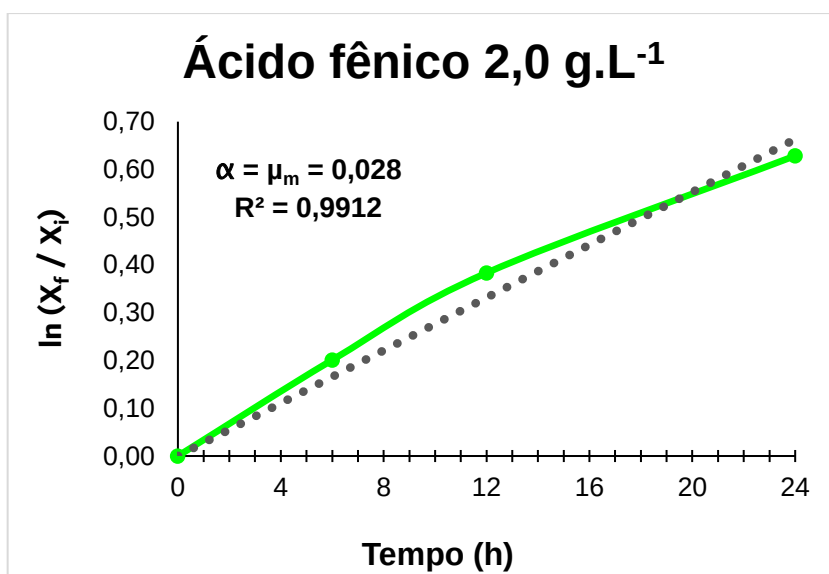


Figura 17A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

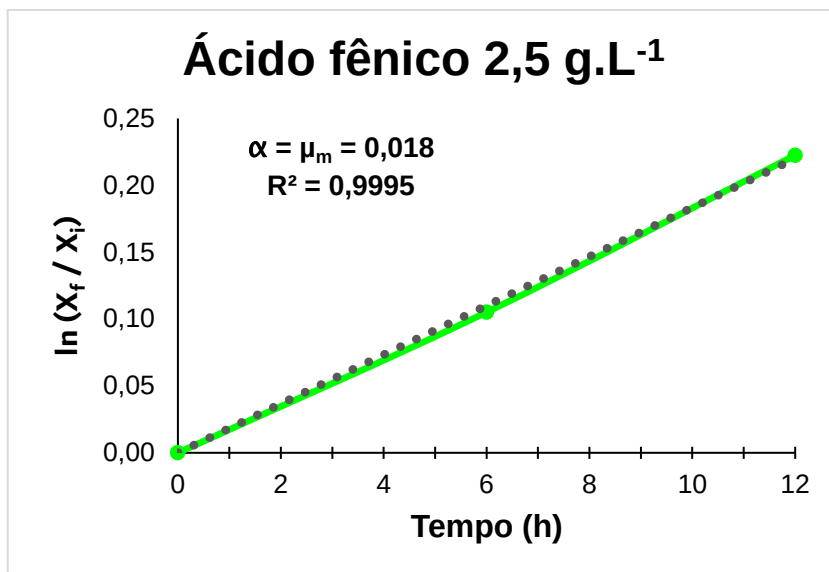


Figura 18A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (2,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

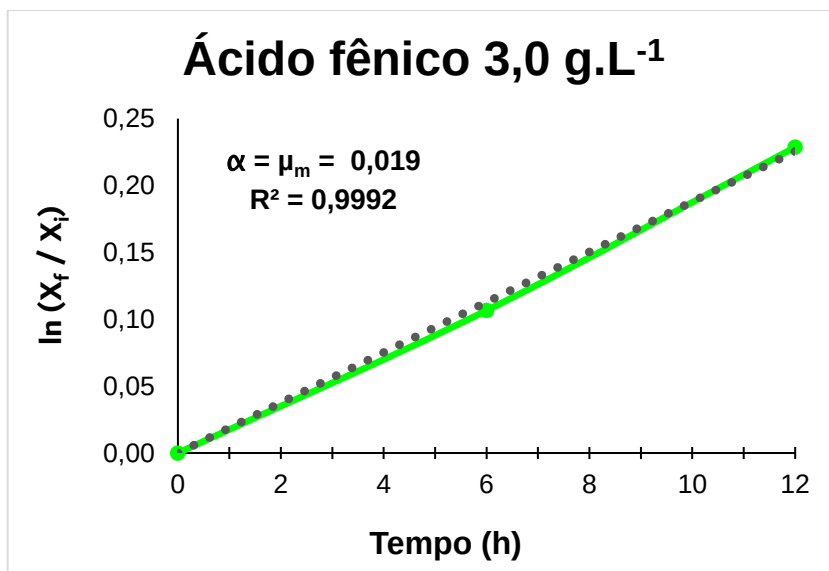


Figura 19A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido fênico (3,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

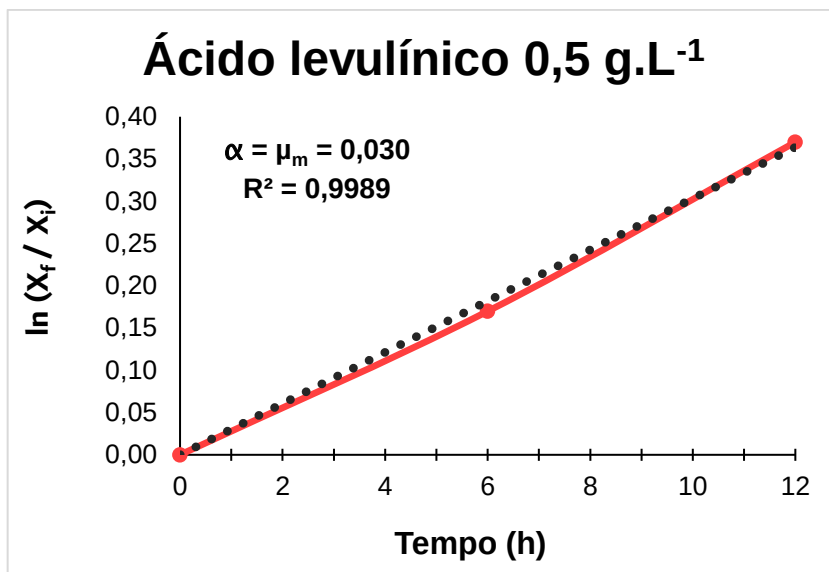


Figura 20A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (0,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

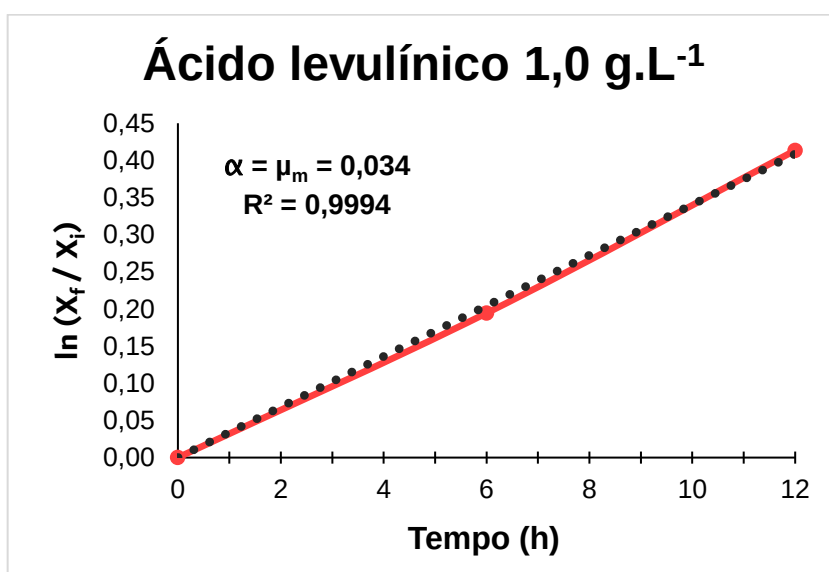


Figura 21A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (1,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

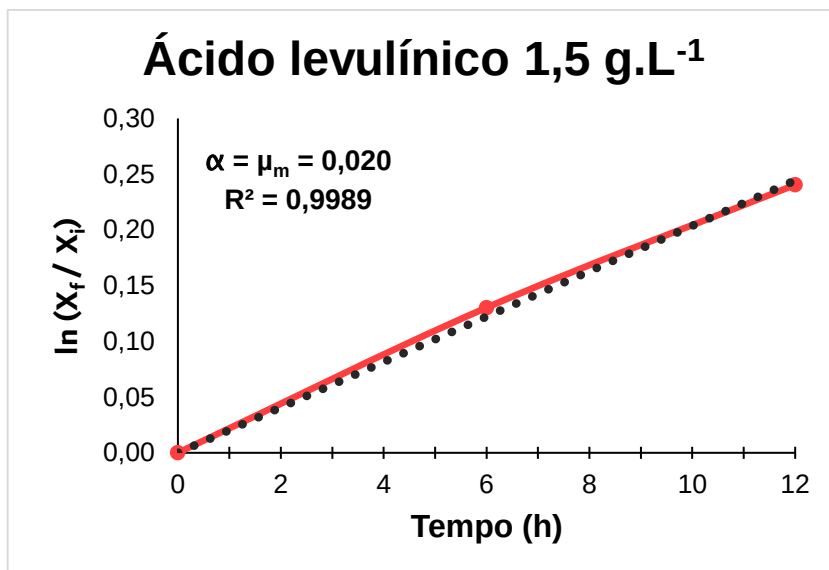


Figura 22A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (1,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

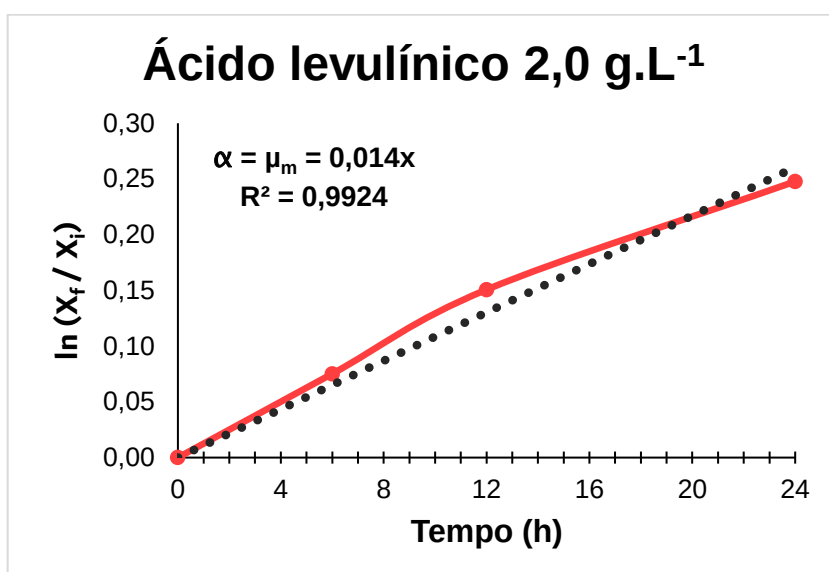


Figura 23A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (2,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

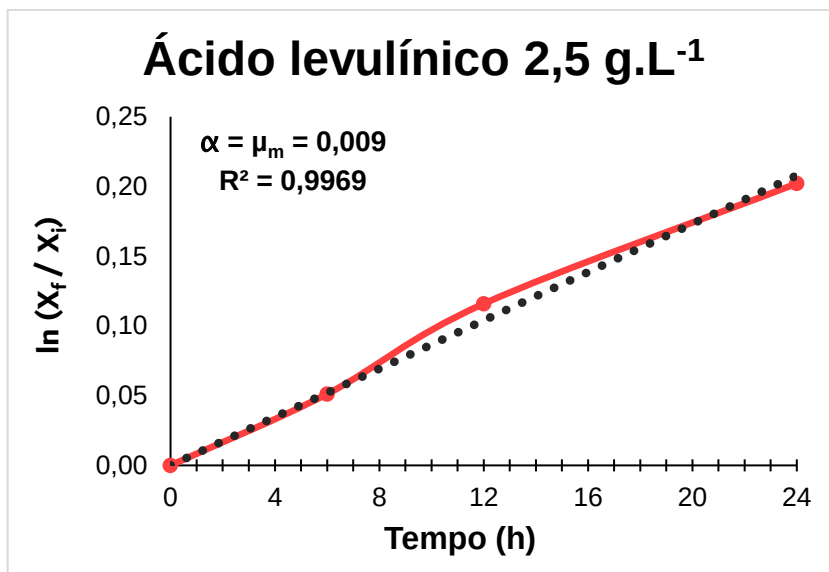


Figura 24A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (2,5 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

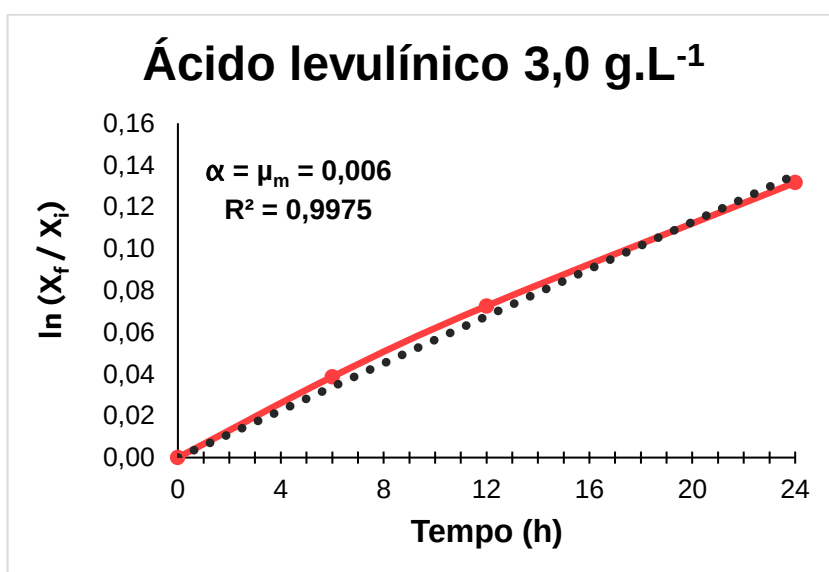


Figura 25A - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em meio sintético contendo glicose (25,0 g.L⁻¹), xilose (45,0 g.L⁻¹) e ácido levulínico (3,0 g.L⁻¹), à 32°C, 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de 3,0 g.L⁻¹, pelo período de 24 h.

Apêndice B – EFEITOS DE DIFERENTES HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS NA CINÉTICA FERMENTATIVA DE *Pichia membranifaciens* LJ04

Detecção da fase de crescimento exponencial e velocidade específica máxima de crescimento

Considerando-se diferentes limites iniciais e finais de tempo, gráficos de dispersão com linha de tendência linear foram traçados para valores de ‘ $\ln (\text{Biomassa final/Biomassa inicial}) \times \text{tempo}$ ’ para processos fermentativos realizados em hidrolisado hemicelulósico sintético, destoxificado e sem destoxificação,

Os gráficos que exibiram melhores coeficientes de correlação (r^2), foram escolhidos para representar a fase exponencial de crescimento da levedura. Por fim, o coeficiente angular de cada reta foi determinado para estabelecimento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) de *P. membranifaciens* LJ04 em diferentes condições.

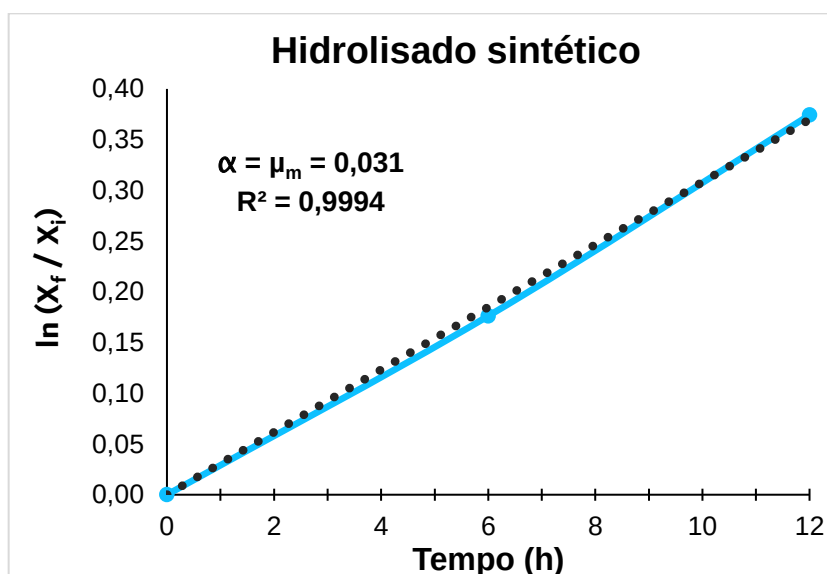


Figura 1B - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em hidrolisado hemicelulósico sintético (sem inibidores), contendo glicose (26 g.L^{-1}) e xilose (43 g.L^{-1}), à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $1,8 \text{ g.L}^{-1}$, pelo período de 72 h.

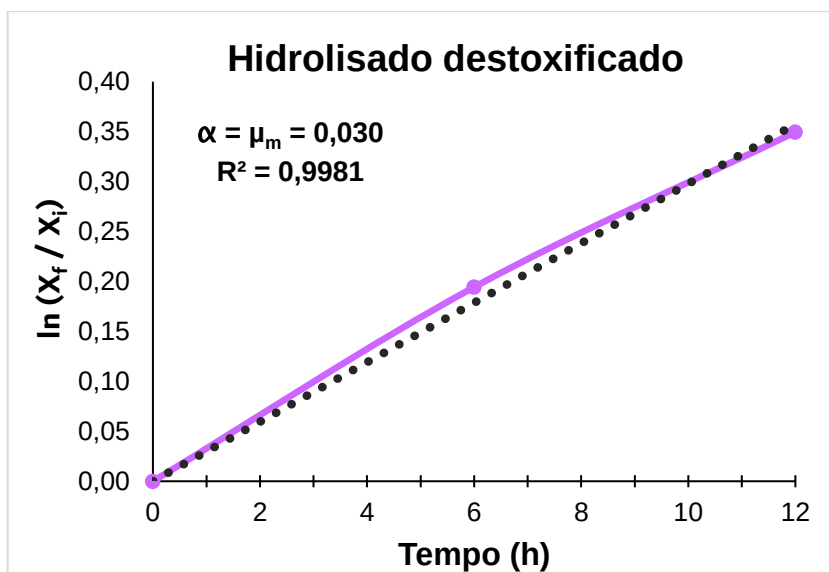


Figura 2B - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em hidrolisado hemicelulósico de cana-energia destoxificado, contendo glicose (15 g.L^{-1}) e xilose (39 g.L^{-1}), à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $1,8 \text{ g.L}^{-1}$, pelo período de 72 h.

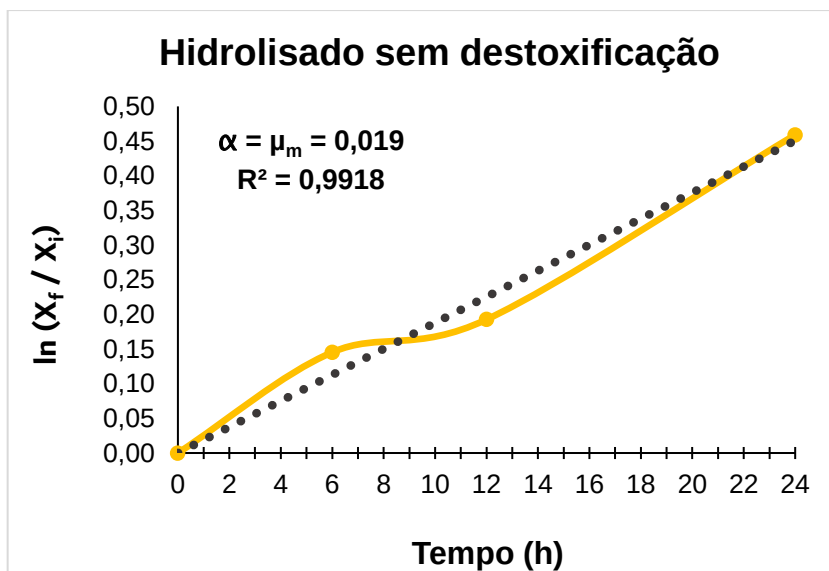


Figura 3B - Determinação da fase de crescimento exponencial de *P. membranifaciens* LJ04 em hidrolisado hemicelulósico de cana-energia sem destoxificação, contendo glicose (16 g.L^{-1}) e xilose (37 g.L^{-1}), à 32°C , 125 rpm, pH 4,5 e concentração celular inicial de $1,8 \text{ g.L}^{-1}$, pelo período de 72 h.