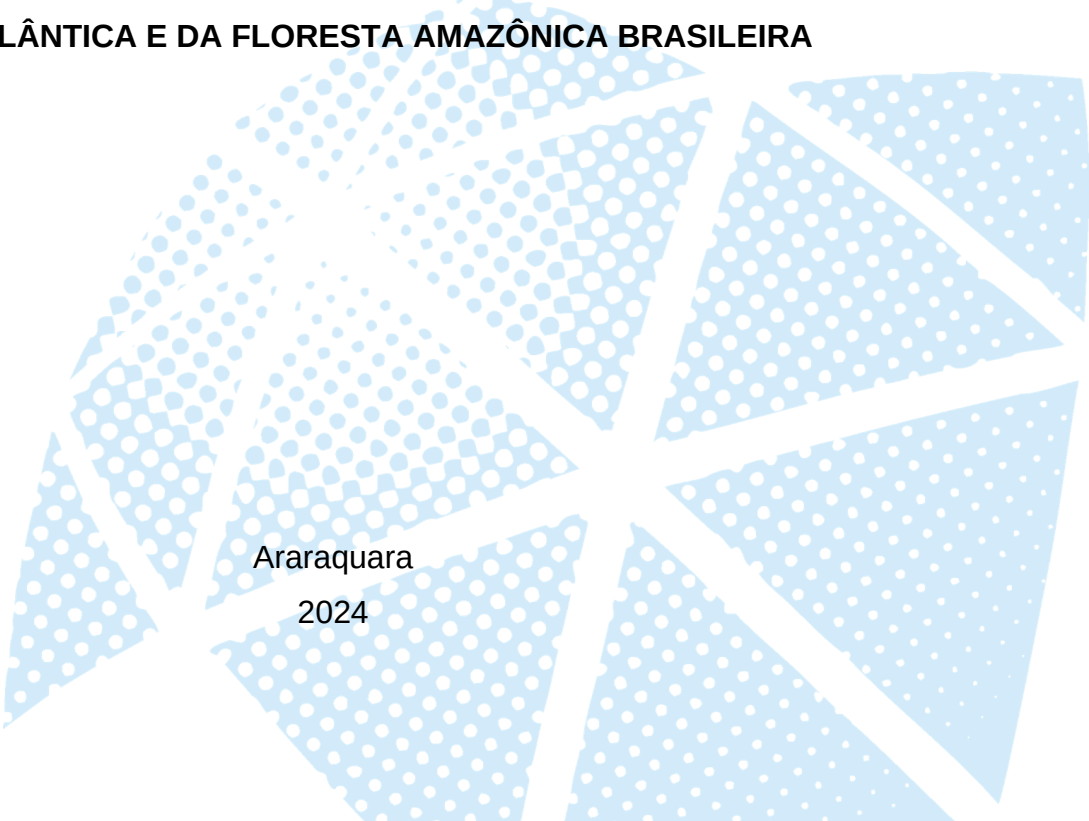


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

JONAS PAULINO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DE DIFERENTES LEVEDURAS
CONSUMIDORAS DE D-XILOSE DO GÊNERO *SPATHASPORA* ISOLADAS DA
MATA ATLÂNTICA E DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA**

Araraquara
2024



JONAS PAULINO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FERMENTATIVA DE DIFERENTES LEVEDURAS
CONSUMIDORAS DE D-XILOSE DO GÊNERO *SPATHASPORA* ISOLADAS DA
MATA ATLÂNTICA E DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Kelly Johana Dussán Medina

Coorientadora: Prof^a. Dra. Débora Danielle Virginio da Silva

Araraquara

2024

S729a

Souza, Jonas Paulino de

Avaliação da capacidade fermentativa de diferentes leveduras consumidoras de D-xilose do gênero *Spathaspora* isoladas da Mata Atlântica e da floresta Amazônica brasileira / Jonas Paulino de Souza. -- Araraquara, 2024
143 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Kelly Johana Dussán Medina

Coorientadora: Débora Danielle Virginio da Silva

1. Hemicelulose. 2. Cana-de-açúcar. 3. Biomassa. 4. Xilitol. 5. Etanol. I.
Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa inova ao utilizar leveduras nativas ainda pouco exploradas para produzir xilitol e etanol a partir de subprodutos agroindustriais, como bagaço e palha de cana-de-açúcar. Alinhada ao ODS 7, que visa garantir acesso à energia acessível e limpa, promove a valorização de recursos locais e a transição para uma economia sustentável baseada em biomassa renovável.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The research is innovative in using native yeasts, still largely unexplored, to produce xylitol and ethanol from agro-industrial by-products, such as sugarcane bagasse and straw. Aligned with SDG 7, which aims to ensure access to affordable and clean energy, it promotes the valorization of local resources and the transition to a sustainable economy based on renewable biomass.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Avaliação da capacidade fermentativa de diferentes leveduras consumidoras de xilose do gênero *Spathaspora* isoladas da Mata Atlântica e da Floresta Amazônica Brasileira"

AUTOR: JONAS PAULINO DE SOUZA

ORIENTADORA: KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

COORIENTADORA: DEBORA DANIELLE VIRGINIO DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA
Data: 29/11/2024 09:31:55-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dra. LARISSA PEREIRA BRUMANO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Naturais e Humanas / Universidade Federal do ABC - UFABC - Santo André

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA LACERDA BRAMBILLA RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Escola de Engenharia - USP - Lorena

Profa. Dra. ARIELA VELOSO DE PAULA (Participação Virtual)
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



Profª Drª ELISÂNGELA DE JESUS CÂNDIDO MORAES (Participação Virtual)
Departamento De Engenharia Química / Escola De Engenharia - USP - Lorena

Araraquara, 28 de novembro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	JONAS PAULINO DE SOUZA 18/11/1990
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	Souza, J.P. J.P. de Souza
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Engenharia, Física e Matemática Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900 Telefone: (16) 3301-9868
Currículo Lattes	https://lattes.cnpq.br/8998062189801580
ORCID	https://orcid.org/0000-0003-1212-7933
outro identificador	
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2010/2015	Ciências Biológicas – Licenciatura plena Universidade Federal de São Carlos
2016/2018	Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular Universidade Federal de São Carlos
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
Souza, J.P., Fogarin, H.M., Almeida, S.G.C. <i>et al.</i> Fermentation of Sugarcane Biomass Hemicellulosic Hydrolysate by Yeast-Producer of Xylitol and Ethanol Isolated from the Atlantic Forest and the Brazilian Amazon Forest. <i>Waste Biomass Valor</i> (2024). https://doi.org/10.1007/s12649-024-02535-y de Almeida, S.G.C., Souza, J.P., Fogarin, H.M. <i>et al.</i> Assessment of lipid synthesis from sugarcane biomass by adaptive strains of <i>Rhodospiridium toruloides</i>. <i>Biomass Conv. Bioref.</i> (2024). https://doi.org/10.1007/s13399-024-05499-0	

de Almeida, S.G.C., Silva, V.T.F., **Souza, J.P.**, Prado, C.D., Oliveira, D.K.S, Silva, D.D.V, Dussán, K.J. (2022). **Methods for Hemicellulose Deconstruction Aiming to Xylose Recovery: Recent Progress and Future Perspectives**. In: de Almeida Felipe, M.d.G., Chandel, A.K. (eds) Current Advances in Biotechnological Production of Xylitol. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04942-2_1.

F.A.F Antunes, T.M. Rocha, R.R. Philippini, S.E. Martiniano, C.A. Prado, E. Mier-Alba, A.F. Hernandez-Perez, F.M. Jofre, P. Abdeslahian, D.R. Ribeaux, M.J. Castro-Alonso, T.R. Balbino, K.J. Dussán, D.D.V. Da Silva, **J.P. de Souza**, S. Sanchez-Muñoz, R. Reyes-Guzman, A.P. Ingle, M.G.A. Felipe, J.C. Santos, S.S. da Silva. **The Potential of Vegetal Biomass for Biomolecules Production**, Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, 2021, ISBN 9780124095489. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819727-1.00053-4>

Prado, C.D., Mandrujano, G.P.L., Souza, J.P.*et al.* **Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation**. *Biotechnol Biofuels* **13**, 178 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS E ORIENTAÇÕES

Bancas de trabalhos de conclusão

Orientações

Bianca Cristina Sena Santos. **Adaptação da Levedura *Spathaspora brasiliensis* ao Hidrolisado de Biomassa de Cana-de-Açúcar como Estratégia para a Produção de Xilitol e Etanol**. 2023.Orientador: Jonas Paulino de Souza. 2023. Supervisão científica (Graduanda em Engenharia Química) - Unesp, Araraquara, 2023.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

SOUZA, J. P, FILLETTI, E. R., FOGARIN, H. M., ALMEIDA, S. G. C., SILVA, D. D. V., DUSSAN MEDINA, K. J., **Artificial neural networks coupled genetic algorithm as a strategy for optimizing xylitol production by xylose fermenting**. 53rd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2024, Aguas de Lindóia (**Apresentador**).

Souza, J. P.; Fogarin, Henrique M.; Coelho, S. G.; Santos, B. C. S.; Silva, D. D. V.; Dussán, K. J. **Co-production of ethanol and xylitol from sugarcane hemicellulose hydrolysate by yeasts isolated from the Atlantic Forest and the Brazilian Amazon Forest**. CHANIA 2023 10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2023, Chania.

Coelho, S. G.; **Souza, J. P.**; Fogarin, Henrique M.; Franca, B. V.; Dussán, K. J. **Growth characterization of adapted *Rhodospiridium toruloides* in sugarcane biomass hemicellulosic hydrolysate.** CHANIA 2023 10th International Conference on Sustainable Solid Waste Management, 2023, Chania.

Sâmilla Almeida, **Jonas Paulino de Souza**, Bruno Valente Franca, Kelly Johana Dussán. **Evaluation of the effect Adaptive Laboratory Evolution (ALE) in *Rhodospiridium toruloides*: increasing resistance to growth inhibitors and improving sugars consumption.** WCCE11 – 11th World Congress of Chemical Engineering, 2023, Buenos Aires – Argentina.

Souza, Jonas Paulino De; Almeida, Sâmilla Gabriella Coêlho De; Silva, Debora Danielle V.; Medina, Kelly Johana Dussán. **Influence of C/N ratios on ethanol and xylitol production from sugarcane hemicellulose hydrolysate using a wild xylose-fermenting yeast from brazilian biome.** V Simpósio Internacional De Microbiologia E Biotecnologia, 2021. Viçosa - MG (**Apresentador**)

Dedico este trabalho a toda minha família:
meus pais, Paulino de Sousa e Benedita
Maria, meus irmãos Paula Paulina e João
Paulino, e minha tia Marta.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Kelly Johana Dussán Medina, e à minha coorientadora, Profa. Dra. Débora Danielle Virginio da Silva, pela orientação, paciência, apoio e conhecimento compartilhado ao longo dessa trajetória.

Agradeço ao Departamento de Engenharia, Física e Matemática do Instituto de Química – Unesp de Araraquara - SP e ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN) pelo suporte e pela infraestrutura disponibilizados para a realização desta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, da Universidade Federal de Minas Gerais, por gentilmente fornecer as leveduras utilizadas neste trabalho. Sua colaboração foi importante para o desenvolvimento desta pesquisa.

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

Aos meus colegas de laboratório do grupo de pesquisa APIBIL, que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando momentos de aprendizado.

À minha família, que foi meu pilar durante todos os desafios e me motivou a seguir adiante, especialmente nos momentos mais difíceis.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”

(*)

* FREIRE, P. A importância do ato de ler: em três artigos que se completam. [s.l.] Cortez editora, 1989

RESUMO

A crescente demanda por combustíveis renováveis e produtos sustentáveis tem direcionado esforços para o desenvolvimento de alternativas baseadas em biomassa vegetal, como a biomassa de cana-de-açúcar. Contudo, a conversão eficiente de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e bioprodutos apresenta desafios significativos, sobretudo devido à complexidade estrutural desses materiais e à necessidade de microrganismos com alta eficiência fermentativa. Nesse cenário, o gênero *Spathaspora* se destaca por incluir espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose, com grande potencial para a produção de biocombustíveis, como o etanol, e bioprodutos de alto valor, como o xilitol. Portanto, este estudo propôs uma abordagem inovadora ao avaliar, pela primeira vez, a capacidade fermentativa de *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306 e *Spathaspora brasiliensis* UFMG-HMD19.3 em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar. Na primeira etapa, os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer para otimizar quatro fontes de nitrogênio (ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio) na produção de xilitol e etanol. Os resultados indicaram condições específicas para cada levedura. Para *S. boniae*, sem destoxificação do hidrolisado, os valores experimentais de xilitol foram de 9,74 g/L ($Y_{P/S} = 0,455$ g/g, $Q_P = 0,135$ g/Lh) e de etanol 4,71 g/L ($Y_{P/S} = 0,191$ g/g, $Q_P = 0,065$ g/Lh). Já para *S. brasiliensis*, em hidrolisado destoxificado, os valores foram de 10,11 g/L de xilitol ($Y_{P/S} = 0,473$ g/g, $Q_P = 0,140$ g/Lh) e 2,60 g/L de etanol ($Y_{P/S} = 0,121$ g/g, $Q_P = 0,036$ g/Lh). Na segunda etapa, a produção de xilitol por *S. boniae* foi otimizada em biorreator utilizando hidrolisado sem destoxificação. Parâmetros como agitação e aeração foram ajustados, resultando em condições ideais de 97 rpm e 1,5 vvm, com valor predito de 13,96 g/L de xilitol. Além disso, a atividade das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) foi avaliada, revelando que a maior produção de xilitol está associada à elevada atividade de XR (dependente de NADPH) em condições de baixa agitação e aeração. Em contrapartida, maior agitação favoreceu a atividade de XDH (dependente de NAD^+), resultando em menor razão XR/XDH e desvio metabólico para a produção de biomassa. O estudo demonstrou que *S. boniae* apresenta vantagens significativas, incluindo maior produção de xilitol em comparação ao etanol, especialmente sob condições de baixa agitação e aeração. Notavelmente, a capacidade de fermentar hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação pode simplificar o processo, reduzir custos e destaca a *S. boniae* como uma candidata promissora para a produção sustentável de xilitol e outros bioprodutos. A valorização de leveduras nativas, como as de biomas brasileiros, e o reaproveitamento de resíduos agroindustriais reforçam o papel desse estudo na busca por soluções biotecnológicas sustentáveis.

Palavras-chave: *Spathaspora boniae*, *Spathaspora brasiliensis*, D-xilose, hemicelulose, biomassa de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The increasing demand for renewable fuels and sustainable products has driven efforts toward the development of biomass-based alternatives, such as sugarcane biomass. However, the efficient conversion of lignocellulosic materials into biofuels and bioproducts presents significant challenges, primarily due to the structural complexity of these materials and the need for microorganisms with high fermentative efficiency. In this context, the genus *Spathaspora* stands out for including yeast species capable of fermenting D-xylose, with great potential for the production of biofuels, such as ethanol, and high-value bioproducts, such as xylitol. Therefore, this study proposed an innovative approach by evaluating, for the first time, the fermentative capacity of *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306 and *Spathaspora brasiliensis* UFMG-HMD19.3 in hemicellulosic hydrolysate from sugarcane biomass. In the first phase, experiments were conducted in Erlenmeyer flasks to optimize four nitrogen sources (urea, yeast extract, peptone, and ammonium sulfate) for xylitol and ethanol production. The results indicated specific conditions for each yeast. For *S. boniae*, using non-detoxified hydrolysate, the experimental values for xylitol were 9.74 g/L ($Y_{P/S} = 0.455$ g/g, $Q_P = 0.135$ g/Lh) and for ethanol, 4.71 g/L ($Y_{P/S} = 0.191$ g/g, $Q_P = 0.065$ g/Lh). For *S. brasiliensis*, with detoxified hydrolysate, the values were 10.11 g/L of xylitol ($Y_{P/S} = 0.473$ g/g, $Q_P = 0.140$ g/Lh) and 2.60 g/L of ethanol ($Y_{P/S} = 0.121$ g/g, $Q_P = 0.036$ g/Lh). In the second phase, xylitol production by *S. boniae* was optimized in a bioreactor using non-detoxified hydrolysate. Parameters such as agitation and aeration were adjusted, resulting in optimal conditions of 97 rpm and 1.5 vvm, with a predicted value of 13.96 g/L of xylitol. Furthermore, the activities of xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) enzymes were evaluated, revealing that higher xylitol production is associated with elevated XR activity (NADPH-dependent) under low agitation and aeration conditions. Conversely, increased agitation favored XDH activity (NAD⁺-dependent), leading to a lower XR/XDH ratio and a metabolic shift toward biomass production. The study demonstrated that *S. boniae* offers significant advantages, including higher xylitol production compared to ethanol, especially under low agitation and aeration conditions. Notably, the ability to ferment hemicellulosic hydrolysate without detoxification can simplify the process, reduce costs, and highlight *S. boniae* as a promising candidate for the sustainable production of xylitol and other bioproducts. The valorization of native yeasts, such as those from Brazilian biomes, and the reuse of agro-industrial residues underscore the relevance of this study in the pursuit of sustainable biotechnological solutions.

Keywords: *Spathaspora boniae*, *Spathaspora brasiliensis*, xylose, hemicellulose, sugarcane biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da biomassa lignocelulósica.	25
Figura 2. Esquema indicando as principais rotas de formação de inibidores.	31
Figura 3. Via metabólicas de assimilação de D-xilose em leveduras.	35
Figura 4. Estrutura química do xilitol.	38
Figura 5. Produção de xilitol por rotas químicas e biotecnológicas.	40
Figura 6. Fluxograma da metodologia utilizada no trabalho.	54
Figura 7. Sensor de CO ₂ utilizado no biorreator de bancada.	64
Figura 8. Biorreator Bioflo 2000, New Brunswick Scientific.	64
Figura 9. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central (Tabela 12) para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 1 ao 8.	81
Figura 10. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central (Tabela 12) para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 9 ao 16.	82
Figura 11. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central (Tabela 12) para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 17 ao 20.	83
Figura 12. Consumo de L-arabinose e ácido acético e pH para a levedura <i>Spathaspora boniae</i> em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar - Experimento 15 (6,1 g/L de extrato de levedura, 0,7 g/L de ureia, 2,5 g/L de peptona e 1,5 g/L de sulfato de amônio).	86
Figura 13. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 1 ao 8.	92

Figura 14. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 9 ao 16.....	93
Figura 15. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 17 ao 20.....	94
Figura 16. Consumo de L-arabinose e ácido acético e pH para a levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana de açúcar - Experimento 3 (Tabela 13).	94
Figura 17. Gráfico de Pareto, estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) da variável resposta concentração de xilitol (g/L) de acordo com o Planejamento composto central 2^{4-1} , <i>Spathaspora boniae</i>	95
Figura 18. Gráfico de Pareto, estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) da variável resposta concentração de xilitol (g/L) de acordo com o Planejamento composto central 2^{4-1} , <i>Spathaspora brasiliensis</i>	96
Figura 19. Valores preditos em função dos observados em relação a produção de xilitol pela levedura <i>Spathaspora boniae</i>	97
Figura 20 Valores preditos em função dos observados em relação a produção de xilitol pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i>	98
Figura 21 Superfície de resposta para a produção de xilitol em função das variáveis independentes ureia, extrato de levedura e peptona e sulfato de amônio para a levedura <i>S. boniae</i>	99
Figura 22 Gráfico de Superfície de resposta para a produção de xilitol em função das variáveis independentes extrato de levedura e peptona para a levedura <i>S. brasiliensis</i>	100
Figura 23 Perfis para valores previstos e desejabilidade para a produção de xilitol pela levedura <i>Spathaspora boniae</i>	101
Figura 24 Perfis para valores previstos e desejabilidade para a produção de xilitol pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i>	102

Figura 25. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> (a) no experimento de validação de otimização e (b) de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio.	104
Figura 26. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> (a) no experimento de validação de otimização e (b) de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio.	105
Figura 27. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central rotacional para o estudo das variáveis independentes agitação e aeração, experimentos 1 ao 4.	112
Figura 28. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central rotacional para o estudo das variáveis independentes agitação e aeração, experimentos 5 e 10.	113
Figura 29. Concentrações de CO ₂ , oxigênio dissolvido (OD), crescimento celular, etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central, experimentos 1 ao 8.	116
Figura 30. Concentrações de CO ₂ , oxigênio dissolvido (OD), crescimento celular, etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> de acordo com planejamento composto central, experimentos 9 e 10.	117
Figura 31. Influência da aeração e agitação na atividade específica máxima de XR e XDH de <i>Spathaspora boniae</i> na fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação, experimentos 1 ao 8.	120
Figura 32. Influência da aeração e agitação na atividade específica máxima de XR e XDH de <i>Spathaspora boniae</i> na fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação, experimentos 9 e 10.	121

Figura 33. Gráfico de Pareto, estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) da variável resposta concentração de xilitol (g/L) de acordo com o Planejamento composto central rotacional pela levedura <i>Spathaspora boniae</i>	122
Figura 34. Valores preditos em função dos observados em relação a produção de xilitol pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> no planejamento composto central rotacional.	123
Figura 35. Gráfico de Superfície de resposta (a) e superfície de contorno (b) para a produção de xilitol em função das variáveis independentes agitação (rpm) e aeração (vvm).	123
Figura 36. Perfis para valores previstos e desejabilidade para a produção de xilitol pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> em biorreator de bancada.	124
Figura 37 Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> no (a) experimento de validação da otimização do planejamento composto central rotacional para (b) o estudo das variáveis independentes agitação e aeração.	126
Figura 38 . Influência da aeração e agitação na atividade específica máxima de XR e XDH de <i>Spathaspora boniae</i> na fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação para o experimento de validação do modelo.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fontes de nitrogênio utilizadas na fermentação por diferentes espécies de leveduras.....	47
Tabela 2. Diferentes modos de operação em biorreatores para a produção de xilitol.	50
Tabela 3. Codificação dos níveis para as variáveis ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio para produção de etanol e/ou xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de <i>biomassa</i> de cana-de-açúcar pelas leveduras <i>Spathaspora boniae</i> e <i>Spathaspora brasiliensis</i>	61
Tabela 4. Matriz de Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com três repetições no ponto central para o estudo das variáveis: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio na produção de etanol e/ou xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.	61
Tabela 5. Matriz de pontos tipo face centrada com uma repetição no ponto central adicionada ao Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (Tabela 2) para formação do Planejamento Composto Central tipo Face Centrada para o estudo das variáveis: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio na produção de etanol e/ou xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.....	62
Tabela 6. Codificação dos níveis para as variáveis agitação e vazão de ar para produção de xilitol e/ou etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i>	66
Tabela 7. Matriz de Planejamento composto central rotacional com duas repetições no ponto central e quatro pontos axiais para o estudo das variáveis agitação e vazão de ar, na produção de xilitol e/ou etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i>	66
Tabela 8. Caracterização química da biomassa de cana-de-açúcar e após pré-tratamento	73
Tabela 9. Composição química percentual do bagaço da cana-de-açúcar e comparação com os dados da literatura.	73
Tabela 10. Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar obtido pelo pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e detoxificado.	76

Tabela 11. Teste de produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de <i>biomassa</i> de cana-de-açúcar sem destoxificar pelas leveduras <i>Spathaspora boniae</i> , <i>Spathaspora brasiliensis</i> .	77
Tabela 12. Matriz do planejamento composto central 2^{4-1} para o estudo variáveis independentes: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, para a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar usando a levedura <i>Spathaspora boniae</i> .	78
Tabela 13. Matriz de planejamento composto central 2^{4-1} para o estudo variáveis independentes: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio para a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> .	87
Tabela 14. Análise de variância da regressão para o modelo da produção de xilitol (g/L), <i>Spathaspora boniae</i> .	96
Tabela 15. Análise de variância da regressão para o modelo da produção de xilitol (g/L), <i>Spathaspora brasiliensis</i> .	97
Tabela 16 . Resultados obtidos utilizando as condições definidas pela função de desejabilidade do planejamento composto central durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar pela <i>Spathaspora boniae</i> .	103
Tabela 17. Matriz de planejamento composto central rotacional 2^2 para o estudo variáveis independentes: agitação e aeração para a produção de xilitol e etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> .	107
Tabela 18. Análise de variância da regressão para o modelo da produção de xilitol (g/L) em biorreator de bancada para <i>Spathaspora boniae</i> .	122
Tabela 19. Resultados obtidos utilizando as condições definidas para validação do modelo do planejamento composto central rotacional durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar pela <i>Spathaspora boniae</i> .	125

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	Biomassa Lignocelulósica	24
2.1.1	Hemicelulose	25
2.1.2	Celulose.....	26
2.1.3	Lignina	27
2.2	Biomassa de cana-de-açúcar.....	28
2.3	Pré-tratamento com ácido diluído	29
2.4	Compostos inibitórios após pré-tratamento.....	30
2.5	Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico	32
2.6	Leveduras fermentadoras de D-xilose: Gênero <i>Spathaspora</i>	33
2.7	Metabolismo de D-xilose	34
2.8	Produção de bioetanol	37
2.9	Xilitol.....	38
2.9.1	Características e aplicações	38
2.9.2	Produção do xilitol	39
2.10	Fatores que favorecem o crescimento dos microrganismos	41
2.10.1	Temperatura e pH.....	41
2.10.2	Fontes de carbono.....	42
2.10.3	Aeração	44
2.10.4	Fontes de nitrogênio	45
2.11	Biorreatores.....	48
3	OBJETIVOS.....	52
	Objetivo Geral	52
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	Fluxograma da metodologia.....	53

4.2	Material e preparo do hidrolisado hemicelulósico da cana-de-açúcar.....	55
4.2.1	Biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar	55
4.2.2	Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar	55
4.2.3	Caracterização química da biomassa de cana-de-açúcar	56
4.2.4	Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da biomassa da cana-de-açúcar	57
4.3	Leveduras e condições de crescimento	57
4.3.1	Micro-organismos	57
4.3.2	Curva padrão da produção de biomassa celular	57
4.3.3	Preparo do inóculo.....	58
4.4	Efeito das fontes de nitrogênio na fermentação de hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar para produção de xilitol e/ou etanol	59
4.4.1	Fermentação em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação.....	59
4.4.2	Planejamento experimental fracionado 2 ⁴⁻¹ para estudo das fontes de nitrogênio pelas leveduras <i>Spathaspora boniae</i> e <i>Spathaspora brasiliensis</i> para produção de xilitol e/ou etanol	60
4.4.3	Planejamento composto central para otimização das fontes de nitrogênio para produção de xilitol e/ou etanol	62
5	Avaliação em biorreator de bancada do desempenho fermentativo da levedura <i>Spathaspora boniae</i> em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar	63
5.1	Microorganismo e preparo do inóculo	63
5.2	Características do biorreator agitado	63
5.3	Otimização da agitação e vazão de ar para produção xilitol e/ou etanol.....	65
5.3.1	Condições de fermentação	65
5.3.2	Planejamento experimental	65
5.3.3	Coleta e análise de amostras	65
5.3.4	Análise de contaminação.....	65

6	Atividade enzimática das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)	66
6.1	Rompimento celular	66
6.2	Atividade enzimática	67
6.3	Determinação da proteína solúvel.....	68
7	Métodos analíticos	68
7.1	Determinação da concentração celular	68
7.2	Determinação de fenóis totais.....	68
7.3	Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, etanol e xilitol	69
7.4	Determinação de compostos fenólicos.....	69
7.5	Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).....	69
7.6	Determinação dos parâmetros fermentativos para processos descontínuos de fermentação	70
7.6.1	Fator de conversão de açúcares em etanol ou xilitol.....	70
7.6.2	Produtividade volumétrica em etanol ou xilitol (g/L.h).....	71
7.6.3	Fator de conversão de açúcares em biomassa celular.....	71
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
8.1	Caracterização química da biomassa da cana-de-açúcar.....	72
8.1.1	Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar	73
8.2	Avaliação da capacidade fermentativa das leveduras do gênero <i>Spathaspora</i> em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar	76
8.2.1	Fermentação em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação.....	76
8.2.2	Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na fermentação pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> UFMG-CM-Y306	77
8.2.3	Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na fermentação pela levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> UFMG-HMD19.3.....	86

8.3	Otimização das fontes de nitrogênio para maximização da produção de xilitol pelas leveduras <i>Spathaspora boniae</i> e <i>Spathaspora brasiliensis</i>	95
8.3.1	Análise dos resultados para a variável resposta produção de xilitol	95
8.3.2	Validação do modelo	102
8.4	Avaliação do desempenho fermentativo em biorreator de bancada da levedura <i>Spathaspora boniae</i> em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar	105
8.4.1	Estudo da influência das variáveis agitação e aeração na fermentação em biorreator de bancada pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> UFMG-CM-Y306....	106
8.4.2	Estudo do CO ₂ durante a fermentação em biorreator de bancada pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> UFMG-CM-Y306	113
8.4.3	Efeito da agitação e aeração nas atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)	117
8.4.4	Otimização das variáveis agitação e aeração para maximização de xilitol pela levedura <i>Spathaspora boniae</i> UFMG-CM-Y306	121
8.4.5	Validação do modelo	124
9	CONCLUSÕES.....	127
	REFERÊNCIAS.....	129

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por combustíveis renováveis e produtos químicos sustentáveis tem impulsionado a busca por alternativas que utilizem biomassa vegetal como matéria-prima. Entre as diversas fontes de biomassa, a cana-de-açúcar destaca-se devido à sua ampla disponibilidade e elevado rendimento em regiões tropicais, especialmente no Brasil. A produção de açúcar e etanol a partir da cana gera subprodutos como o bagaço e a palha, que são ricos em hemicelulose, celulose e lignina. Tradicionalmente, esses subprodutos são utilizados para a geração de energia térmica em usinas de açúcar e álcool e parte da palha é deixada no campo para proteger o solo e melhorar sua qualidade. No entanto, há um interesse crescente em explorar o potencial da hemicelulose para a produção de compostos de maior valor agregado, como o xilitol.

O xilitol é um adoçante natural de baixo valor calórico, amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica devido às suas propriedades benéficas à saúde, como a prevenção de cáries dentárias. A produção convencional de xilitol envolve a hidrogenação da D-xilose, um processo químico que requer condições severas de temperatura e pressão, além do uso de catalisadores metálicos caros. Alternativamente, a produção biotecnológica de xilitol, utilizando microrganismos fermentativos, tem emergido como uma opção mais sustentável e economicamente viável.

Além da produção de xilitol, a exploração de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração tem ganhado destaque. O etanol de segunda geração é produzido a partir de materiais lignocelulósicos, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, que são subprodutos da produção de etanol de primeira geração.

A primeira etapa do processo de produção de etanol de segunda geração e xilitol é o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, que é crucial para a quebra da estrutura resistente da lignocelulose e a liberação de D-xilose e D-glicose. No entanto, este pré-tratamento causa a formação de furfural e 5-hidroximetilfurfural devido à desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, e a formação de vários compostos fenólicos a partir da lignina. Esses compostos não açucarados atuam como inibidores do metabolismo microbiano e afetam fortemente o desempenho microbiano durante a fermentação. Desse modo, a destoxificação do hidrolisado

hemicelulósico é uma etapa essencial para remover os compostos inibidores e aumentar a eficiência da fermentação. Portanto, há uma necessidade urgente de encontrar leveduras que sejam naturalmente capazes de fermentar D-xilose e que também possuam resistência aos inibidores presentes no hidrolisado obtidos na etapa de pré-tratamento.

O gênero *Spathaspora* inclui várias espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose, com potencial para a produção de biocombustíveis e bioprodutos como xilitol a partir de materiais lignocelulósicos. Este gênero foi inicialmente descrito para classificar a levedura *Spathaspora passalidarum*, isolada do intestino de um besouro nos EUA. No Brasil, também foram identificadas espécies do gênero, como *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis*, encontradas em ecossistemas locais. A levedura *Spathaspora brasiliensis* foi isolada de madeira em decomposição na Floresta Amazônica em Roraima e é capaz de produzir etanol a partir de D-xilose e D-glicose. Por outro lado, a *Spathaspora boniae* foi isolada de madeira em decomposição da Mata Atlântica na região de Minas Gerais, destacou-se pela produção de xilitol, característica comum em outras espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose.

Neste contexto, a presente tese investigou a capacidade fermentativa das leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* visando a produção de xilitol e/ou etanol de segunda geração, a partir do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar (50% de palha e 50% de bagaço). Este estudo é pioneiro ao avaliar, pela primeira vez, a capacidade fermentativa dessas leveduras nesse tipo de substrato, destacando sua relevância no aproveitamento sustentável de resíduos agroindustriais e na valorização de leveduras nativas de biomas brasileiros.

Estas leveduras têm demonstrado um potencial significativo na bioconversão de D-xilose tanto em etanol quanto xilitol, tornando-se candidatas promissoras para processos industriais de produção desses dois produtos.

O uso de bagaço e palha de cana-de-açúcar não apenas valoriza resíduos agroindustriais, contribuindo para a sustentabilidade do setor sucroenergético, como também oferece uma solução biotecnológica para a produção de xilitol. Este processo não só reduz a dependência de métodos químicos tradicionais, mas também promove a utilização de recursos renováveis, alinhando-se com os princípios da economia circular. Além disso, essa abordagem está em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), especialmente o Objetivo 7, que trata de energia

acessível e limpa. Um dos seus principais compromissos é, até 2030, aumentar substancialmente a participação de energias renováveis na matriz energética global, o que reforça a importância de alternativas como a biomassa lignocelulósica para a substituição de combustíveis fósseis. Com o desenvolvimento da pesquisa é possível avançar o conhecimento na área de bioprocessos e contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais verdes e eficientes para a produção de compostos bioquímicos de alto valor agregado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é reconhecida como a forma mais prevalente de biomassa no mundo, com uma produção anual estimada em cerca de 181,5 bilhões de toneladas, originando-se de excedentes de colheitas, resíduos agrícolas, detritos florestais e resíduos urbanos (1). Os resíduos provenientes da agricultura englobam materiais como a palha de arroz e trigo, os restos de milho, os talos de milho e o bagaço de cana-de-açúcar, entre outros. Esses subprodutos agrícolas são exemplos de lignocelulose derivada de gramíneas (2). A biomassa lignocelulósica é um produto direto da fotossíntese, por meio da qual o gás carbônico é convertido em açúcares que, por sua vez, são convertidos em polímeros estruturais (celulose, hemicelulose) presentes nas paredes celulares (3). A estrutura complexa da parede celular secundária da biomassa lignocelulósica, composta por celulose, hemicelulose e lignina, confere resistência mecânica e rigidez à célula, ao mesmo tempo que torna os materiais lignocelulósicos essencialmente resistentes a tratamentos químicos e enzimáticos durante os processos de tratamento e fracionamento da biomassa lignocelulósica (4). As macromoléculas de celulose se organizam de maneira regular para formar microfibras robustas, desempenhando o papel de material estrutural na parede celular, sendo o espaço interno preenchido com hemicelulose amorfa e material de ligação de lignina, Figura 1 (5). As interações entre a celulose e as moléculas de hemicelulose ou lignina ocorrem principalmente por meio de ligações de hidrogênio, enquanto as conexões entre hemicelulose e lignina envolvem tanto ligações de hidrogênio quanto ligações covalentes (6).

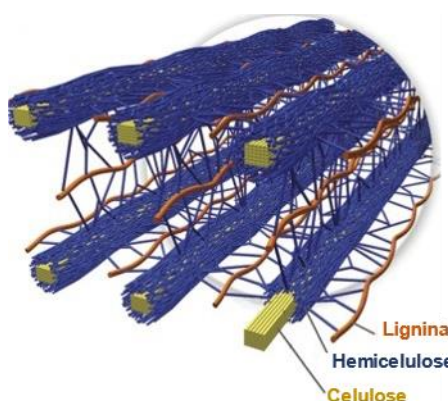


Figura 1. Representação esquemática da biomassa lignocelulósica.
Fonte: Adaptado de Naidu *et al.* (7)

2.1.1 Hemicelulose

A hemicelulose é um biopolímero que contém um grupo heterogêneo de polissacarídeos consistindo de monossacarídeos incluindo hexoses (D-glicose, manose e galactose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e uma pequena quantidade de outros sacarídeos (ramnose e frutose) (2). Além disso, a hemicelulose contém ácidos urônicos e grupos acetil (8). A proporção de hemicelulose na biomassa lignocelulósica varia entre 15% e 35%, dependendo do tipo de planta que origina a biomassa (7). Adicionalmente, a hemicelulose pode ser categorizada em quatro grupos principais com base na composição de suas unidades de açúcar: xilana, manana, xiloglucano e β -glucanos de ligação mista. Nas madeiras macias, o manano é o componente predominante da hemicelulose, enquanto nas plantas herbáceas e madeiras nobres, a xilana é a mais abundante (9).

Xilana é a hemicelulose mais abundante, de modo geral, a estrutura fundamental consiste em resíduos de D-xilose (β -d-xilopiranosil) conectados por ligações β -(1,4) glicosídicas e é comumente modificado por diversos grupos substituintes, como L-arabinose, acetil, ácidos glucurônicos, ácido ferúlico e ácido p-cumárico (10). O xilano encontra-se entrelaçado com a celulose e a lignina por meio de ligações de hidrogênio e ligações covalentes, respectivamente, estabelecendo uma interface entre a lignina e a celulose, o que contribui para a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (11).

2.1.2 Celulose

A celulose compõe de 30% a 50% da biomassa lignocelulósica total e é encontrada principalmente na parede celular das plantas. Sua composição pode variar dependendo do tipo de planta, da espécie e da idade, sendo nas angiospermas e gimnospermas o principal componente das paredes celulares primárias (12).

Assim, a celulose é um dos principais componentes estruturais da parede celular vegetal, representando cerca de 15-30% do peso seco da parede celular primária. É considerado um polissacarídeo de alto peso molecular composto por unidades repetidas de D-glicose, caracterizado por sua força, estrutura cristalina e resistência à hidrólise, diferente da hemicelulose que possui uma estrutura amorfa e aleatória, com menor resistência em comparação à celulose (13).

A celulose é um polímero formado por uma longa cadeia de unidades repetidas de D-glicose unidas por ligações β -1 $\rightarrow$ 4. Cada unidade de β -D-glucopiranosose é rotacionada 180° em relação à unidade adjacente, o que contribui para o arranjo da cadeia de celulose (14).

Essas cadeias se organizam e formam microfibrilas através de interações de van der Waals e ligações de hidrogênio, tanto intra quanto intermoleculares. Na parede celular primária, o nível típico de polimerização é de cerca de 6.000 unidades, podendo chegar a 14.000 unidades de D-glicose nas paredes celulares secundárias (15). As microfibrilas de celulose são altamente cristalinas e hidrofóbicas, o que aumenta a recalcitrância da biomassa. Sendo considerada um componente estrutural essencial em plantas superiores, bactérias, algas e outras biomassa, além de ser secretada por oomicetos e algumas espécies bacterianas para formar biofilmes (15).

2.1.3 Lignina

O processo de deposição de lignina tem início após a diferenciação celular, durante a etapa de espessamento secundário das paredes celulares. As características da lignina, incluindo quantidade e tipos de unidades, apresentam variações entre distintas espécies de plantas, tecidos e tipos celulares, sendo influenciadas por fatores ambientais e de desenvolvimento, como estressores abióticos e bióticos (16).

A lignina é um polímero aromático amorfo, altamente ramificado e heterogêneo que não possui estrutura primária, é composta de três monômeros fundamentais de fenilpropano como unidades repetitivas, álcool p-cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico, que são comumente chamados de “monolignóis”(17). A lignina é ligada covalentemente a grupos laterais em diferentes hemiceluloses, formando uma matriz complexa que envolve as microfibrilas de celulose, na parede celular da planta varia de 2 a 40% (18). A lignina de madeira macia é composta principalmente de álcool coniferílico, a lignina de madeira dura é composta de álcoois sinapílicos e álcool coniferílico, enquanto a lignina presente nas gramíneas contém todos os três monolignóis mencionados anteriormente (19). A existência de fortes ligações carbono-carbono (C-C) e éter (C-O-C) na lignina dá à parede celular da planta resistência e proteção contra ataques de microrganismos celulolíticos (18).

Para diferenciar essas ligações, os pesquisadores identificaram os carbonos das cadeias laterais alifáticas das unidades estruturais da lignina como α , β e γ , enquanto os carbonos nos anéis de benzeno foram numerados de 1 a 6. Assim, as principais ligações entre as unidades estruturais da lignina incluem β -O-4 (éter β -aril), α -O-4 (éter α -aril), 4-O-5 (éter diaril), β - β (resinol), β -5 (fenilcumarano), β -1 (espirodienona) e 5-5 (bifenil), entre outras. Além disso, a lignina possui grupos funcionais ativos, como metoxi ($-\text{OCH}_3$), hidroxila fenólica (Ph-OH), hidroxila alcoólica ($\text{Ph-CH}_2\text{OH}$), ligação dupla carbono-carbono ($\text{C}=\text{C}$) e carbonila ($\text{C}=\text{O}$), que influenciam suas propriedades químicas (20).

2.2 Biomassa de cana-de-açúcar

O Brasil se destaca por ser o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo com uma produção estimada de 689,8 milhões de toneladas para a safra de 2024/25 (21). Os principais subprodutos sólidos provenientes da indústria canavieira são o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. O bagaço é gerado durante o processo de extração do caldo da cana e parte do bagaço é queimada em caldeiras para a geração de vapor para produção de energia elétrica, enquanto a outra porção é armazenada para uso futuro (22). Cada tonelada de cana-de-açúcar processada gera aproximadamente 250 quilos de bagaço e 204 quilos de palha, que, juntos, têm o potencial de produzir cerca de 199,9 kWh (23). Em 2023, o bagaço e a palha de cana foram os principais combustíveis para a geração de bioeletricidade no Brasil, oferecendo 20.973 GWh para a rede, um aumento de 14% em relação a 2022 (24). Assim, deve-se destacar que apenas uma parte da biomassa produzida é utilizada para a produção de bioenergia; um terço da planta é utilizado para a produção de açúcar, um terço é bagaço, que é queimado para a produção de eletricidade e o terço restante é deixado no campo, que é decomposto pelos microrganismos (25).

Contudo, desde 2007 a adoção do sistema de colheita mecanizada (colheita verde) da cana-de-açúcar tem aumentado consideravelmente, alcançando aproximadamente 90% da safra colhida mecanicamente no Brasil (26). Como resultado dessa prática, vastas quantidades de palha ficam no campo (20-30 Mg h⁻¹), proporcionando a este subproduto agrícola um potencial significativo para ser utilizado como matéria-prima na produção de bioenergia (27,28). Uma vez que no Brasil, a produtividade média de cana-de-açúcar é de 85 toneladas por hectare, gerando cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca por tonelada de cana processada, o que corresponde a 12 toneladas de cada por hectare (29).

O milho, a cana-de-açúcar e a beterraba são as principais culturas agrícolas tradicionais usadas na produção de bioetanol, mas essas culturas não conseguem atender à demanda global de produção de bioetanol devido ao seu valor primário de alimentos e rações (30). Dessa forma, a vantagem dos bioprocessos que empregam a palha e o bagaço da cana-de-açúcar reside no fato de que não concorrem diretamente com a produção de alimentos (12).

A composição bioquímica da biomassa de cana-de-açúcar depende de fatores como o local de coleta, as condições climáticas, o estágio de desenvolvimento da

planta e a variedade. Normalmente, a palha de cana de açúcar é constituída por celulose (31–45%), hemiceluloses (20–30%) e lignina (12–31%) (31). Enquanto que os componentes macromoleculares estruturais do bagaço de cana-de-açúcar são constituídos, em média, por 33 a 36 % de celulose, 28-30% de hemicelulose e 18-20% de lignina (32).

A xilana é o principal componente hemicelulósico presente no bagaço, enquanto os glucanos constituem tanto a celulose quanto a hemicelulose (33). Estima-se que, ao converter 1 tonelada de glucano, seja possível obter aproximadamente 1,11 toneladas de açúcares C6, resultando em uma produção de cerca de 650 litros de etanol após a fermentação. Por outro lado, a xilana, ao ser convertida, gera cerca de 1,14 toneladas de açúcares C5, levando a uma produção de aproximadamente 666 litros de etanol (34).

2.3 Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento é uma etapa fundamental para a sacarificação subsequente da biomassa lignocelulósica e na sua conversão em xilitol e etanol. Os métodos de pré-tratamento podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Os métodos de pré-tratamento químico envolvem o uso de álcalis, ácidos diluídos, amônia, solventes orgânicos, agentes oxidantes e outros produtos químicos. Estes métodos são reconhecidos por fornecerem altos rendimentos de conversão em um curto período de tempo (35).

No método de pré-tratamento ácido, ácidos como sulfúrico, clorídrico, fluorídrico, nítrico e fosfórico são utilizados como catalisadores. O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, em particular, é um processo bem estabelecido para a despolimerização de hemiceluloses na biomassa lignocelulósica, transformando-as em açúcares monoméricos (36).

Os processos de pré-tratamento com ácido diluído empregam condições menos severas e, ainda assim, alcançam elevados rendimentos na conversão de xilana em D-xilose. Obter altos rendimentos de conversão de xilana em D-xilose é essencial para assegurar a viabilidade econômica do processo, uma vez que a xilana representa até um terço do total de carboidratos em muitos materiais lignocelulósicos (37).

Parâmetros como tempo de reação, pressão, proporção sólido-líquido, temperatura e diferentes concentrações de ácido devem ser ajustados para aumentar a concentração de D-xilose no hidrolisado e reduzir a formação de inibidores (38). Unrean e Ketsub (39) trataram o bagaço de cana-de-açúcar com 2,5% (p/v) de H_2SO_4 , 20% (m/v) de carga sólida por 30 minutos, obtendo 20,04 g/L de D-xilose e 4,01 g/L de D-glicose. Zahed *et al* (40) estudaram o efeito da variação da concentração de ácido sulfúrico (2%, 3,5% e 5%) a 100 °C no pré-tratamento da palha de arroz e descobriram que as concentrações ótimas de D-xilose e D-glicose, 15,05 g/L e 2,3 g/L respectivamente, foram obtidas com 3,5% de ácido. Em um estudo realizado por Misra, Raghuwanshi e Saxena (41), o pré-tratamento de sabugo de milho em condições otimizadas de 121 °C por 30 minutos, usando 1,0% de H_2SO_4 e uma razão sólido-líquido de 1:8, resultou nas seguintes concentrações (g/L): D-xilose 21,98 g/L, D-glicose 3,56 g/L, L-arabinose 2,17 g/L, ácido acético 1,31 g/L e furfural 0,21 g/L. O trabalho realizado por Almeida, de *et al.* (42) realizou o pré-tratamento da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1 m/m) utilizando ácido sulfúrico diluído (0,5 % m/v) em uma relação sólido:líquido de 1:10, temperatura de 140 °C, e um tempo de reação de 15 min. Nessas condições, o hidrolisado obtido apresentou concentrações de D-xilose (26,29 g/L), D-glicose (3,79 g/L), L-arabinose (3,58 g/L) e ácido acético (3,77 g/L), demonstrando a eficiência do pré-tratamento na recuperação de açúcares fermentáveis essenciais para bioprocessos (43).

2.4 Compostos inibitórios após pré-tratamento

O pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica, além de gerar açúcares, produz diversos inibidores que comprometem o crescimento de microrganismos e o processo de fermentação. Os níveis toleráveis desses inibidores variam conforme o microrganismo utilizado, seu grau de adaptação, o modo de fermentação utilizado e a presença de outros inibidores (44)

A alta temperatura e pressão durante o pré-tratamento ácido resultam na degradação da D-xilose, levando à formação de furfural, enquanto hidroximetilfurfural (HMF) é gerado durante a degradação de hexoses. Furfural e HMF não apenas afetam as atividades enzimáticas e biológicas das leveduras, mas também danificam o DNA

e inibem a síntese de proteínas e RNA, a Figura 2 mostra as principais rotas de formação dos inibidores (45).

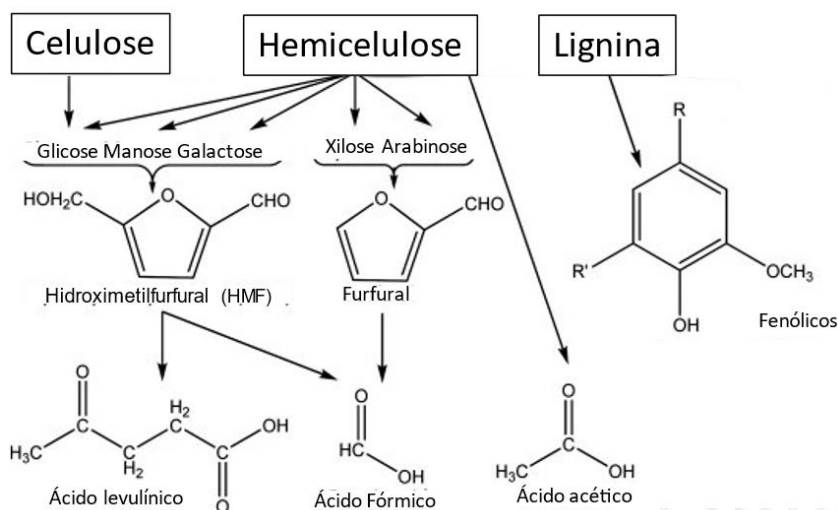


Figura 2. Esquema indicando as principais rotas de formação de inibidores.

Fonte: Adaptado de Jönsson *et al.* (46)

Os fenólicos são os principais inibidores resultantes da degradação da lignina, o que leva à perda de integridade das membranas biológicas. Geralmente, uma concentração de 0,1 g/L de compostos fenólicos afeta o consumo de D-xilose, o crescimento celular e a produção de xilitol. Entre os fenólicos estão o ácido vanílico, ácido sirínico, vanilina e siringaldeído. Os derivados fenólicos mais comumente observados no hidrolisado ácido lignocelulósico incluem ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico e guaiacol (45).

Ácidos alifáticos como ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico também são formados pela desacetilação da hemicelulose ou pela decomposição do 5-HMF. Uma concentração baixa, como 1,0 g/L no meio de fermentação, pode impedir a bioconversão de D-xilose em xilitol (47). O ácido acético entra na célula em sua forma não dissociada. Dentro da célula, ele se dissocia devido ao pH intracelular, o que aumenta a concentração de íons acetato e prótons, afetando assim o gradiente de prótons envolvido na produção de energia e no transporte de nutrientes (48). A presença de ácido acético na concentração de 2,6 g/L em comparação ao controle foi capaz de reduzir o consumo de D-xilose, a produção de xilitol e o crescimento celular em 13%, 18% e 30%, respectivamente (44). Por outro lado, um estudo realizado por Silva *et al.* (49) observou que a adição de ácido acético na concentração de 2,0 g/L

favoreceu o consumo de D-xilose e o crescimento celular da levedura *Candida guilliermondii* quando adicionado no início da fermentação. No entanto, a adição dessa mesma concentração após 12 horas de fermentação resultou em inibição significativa do metabolismo da levedura, reduzindo o consumo de D-xilose e o crescimento celular. O trabalho realizado por Casey *et al.* (50) reporta que concentrações de ácido acético a partir de 7,5 g /L já demonstraram ter um impacto negativo na produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* 424^a(LNH-ST), especialmente em condições de pH mais baixo (5).

2.5 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

Diversas estratégias de destoxificação, incluindo métodos biológicos, físicos e químicos, foram propostas para remover compostos tóxicos dos hidrolisados, pois até mesmo pequenas quantidades podem interferir e impedir o crescimento microbiano. A eficiência do processo de destoxificação depende da matéria-prima, do tipo de processo de hidrólise e do microrganismo empregado (51).

Os métodos biológicos de tratamento utilizam enzimas ou microrganismos específicos para agir sobre os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados, modificando sua composição (45).

A concentração de hidrolisado por evaporação a vácuo é um método físico de destoxificação utilizado para reduzir a quantidade de compostos voláteis, como ácido acético, furfural e vanilina, presentes no hidrolisado. No entanto, essa técnica também aumenta moderadamente a concentração de compostos tóxicos não voláteis (extrativos e derivados de lignina), o que, conseqüentemente, eleva o grau de inibição da fermentação (52).

Métodos químicos incluem a precipitação de compostos tóxicos e a ionização de alguns inibidores em determinados valores de pH, sendo que este último pode alterar o grau de toxicidade dos compostos (53). Compostos tóxicos também podem ser adsorvidos em carvão ativado, em terra diatomácea e em resinas de troca iônica (54,55,56). A adsorção em resinas de troca iônica também é uma técnica eficaz, mas seu custo é elevado em comparação com outros tratamentos(57).

Para purificar ou recuperar produtos químicos, o carvão ativado é um método de baixo custo e amplamente utilizado para remover compostos da fase líquida por meio de adsorção. No entanto, a eficácia desse tratamento depende de variáveis

como pH, temperatura, tempo de contato e concentração de carvão ativado utilizadas no processo de adsorção (45). Sarawan *et al.* (58) otimizaram a remoção de compostos inibitórios utilizando carvão ativado. As variáveis do estudo foram ajustadas da seguinte maneira: tempo de contato de 134,73 minutos, temperatura de 25 °C, concentração de carvão ativado de 5% (w/v) e pH de 3,76. Nessas condições, o estudo obteve 98% de remoção de furfural, 88% de remoção de HMF e 37% de remoção de ácido acético. A perda de açúcares redutores foi de apenas 7%, demonstrando que a otimização foi eficaz na redução de compostos inibidores, preservando uma baixa perda de açúcares.

O trabalho realizado por Marton *et al.* (59) avaliou diferentes condições de adsorção com carvões ativados no tratamento do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilitol. As condições otimizadas foram ajustadas do seguinte modo: o pH do hidrolisado foi inicialmente ajustado para 7 com o uso de CaO, e em seguida reduzido para 2,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4). Após esse ajuste, foi aplicado carvão ativado na concentração de 1%. O tratamento com carvão ativado foi conduzido a uma temperatura de 60°C, com tempo de contato de 30 minutos e agitação de 100 rpm. Por fim, o pH do hidrolisado foi ajustado para 5,5 utilizando NaOH. Essas condições foram otimizadas para melhorar a produtividade de xilitol e a conversão de D-xilose em xilitol durante o processo de fermentação com a levedura *Candida guilliermondii* FTI20037.

2.6 Leveduras fermentadoras de D-xilose: Gênero *Spathaspora*

Embora diversos microrganismos sejam conhecidos por sua capacidade de consumir hexoses, há uma necessidade significativa de identificar microrganismos capazes de consumir pentoses e produzir produtos químicos de valor agregado em altos rendimentos (60). Nos últimos anos, várias espécies de microrganismos isoladas de amostras de florestas, cupins e besouros perfuradores de madeira foram identificadas como consumidoras de D-xilose (61).

As leveduras do gênero *Spathaspora* apresentam várias espécies fermentadoras de D-xilose com potencial para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos, como o xilitol, através da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. Esse gênero foi descrito para classificar uma nova espécie de levedura que foi isolada do intestino do escaravelho *Odontotaenius disjunctus* (Coleoptera: *Passalidae*)

encontrado no leste dos EUA, sendo nomeada como *Spathaspora passalidarum* (62). Também foram encontradas espécies de *S. passalidarum* em território brasileiro (63). A levedura *S. passalidarum* possui características metabólicas favoráveis para a fermentação da D-xilose, entre essas características estão as maiores taxas de consumo de D-xilose, acima de 99% (64,65).

No Brasil também foram identificadas espécies de leveduras que pertencem ao gênero *Spathaspora*. A levedura *Spathaspora brasiliensis* foi isolada de amostras de madeira em decomposição coletadas na reserva ecológica de São João da Baliza. Esta região é uma área de Floresta Amazônica no estado de Roraima, no norte do Brasil. Os experimentos de caracterização dessa espécie demonstraram que essa levedura é capaz de produzir etanol a partir de D-xilose ou D-glicose (66).

A levedura *Spathaspora boniae* foi isolada de amostras de madeira em decomposição coletadas no Parque Estadual do Rio Doce. Este parque é uma reserva ecológica com 36.000 hectares de Mata Atlântica localizada no estado de Minas Gerais no Brasil. Quando caracterizada foi identificado que a *Sp. Boniae sp. nov.* em meio definido YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 30 g/L D-xilose) produziu mais xilitol (14,7 g/L) que etanol (6,2 g/L), como observado em outras leveduras, como *Scheffersomyces amazonenses*, *Cyberlindnera xylosilytica* e *Cyberlindnera galapagoensis* (67).

As pesquisas realizadas até o momento com essas leveduras do gênero *Spathaspora* se limitaram na descrição e caracterização morfofisiológica e filogenética dessas novas espécies (66,67). No entanto, essas leveduras apresentaram potencial para serem utilizadas em biorrefinarias uma vez que se mostram capazes de assimilar D-xilose e D-glicose e apresentaram resultados interessantes na produção de bioetanol e xilitol.

2.7 Metabolismo de D-xilose

As leveduras fermentadoras de D-xilose iniciam o processo de bioconversão da D-xilose em etanol mediante o transporte de D-xilose através da membrana celular. Uma vez internalizada a D-xilose é reduzida a xilitol, essa reação é catalisada pela enzima xilose redutase (XR) que é dependente da coenzima NADH e/ou NADPH. Posteriormente, ocorre a oxidação do xilitol a xilulose, essa reação é catalisada pela

enzima xilitol desidrogenase (XDH), ligada a NAD^+ . Dessa forma, a xilulose é fosforilado a xilulose 5-fosfato pela enzima xiluloquinase. A xilulose 5-fosfato pode, então, ser metabolizada pela via das pentoses em etanol. A Figura 3 ilustra a via de assimilação de D-xilose por leveduras (68).

O acúmulo e a excreção de xilitol estão relacionados à regeneração do NADPH. Além disso, o fluxo de xilitol aumenta de forma linear em função da limitação de oxigênio e do acúmulo de NADH. Isso ocorre porque, em baixas taxas de transferência de oxigênio, a cadeia respiratória não consegue oxidar o excesso de NADH, o que impede a conversão do xilitol em xilulose e resulta no acúmulo de xilitol (69).

Em algumas espécies de leveduras, a XR tem maior especificidade por NADPH, enquanto em outras ela pode aceitar tanto NADH quanto NADPH. A escolha do cofator influencia a direção da reação catalisada pela XR e, conseqüentemente, o produto final da via metabólica da D-xilose. Em leveduras onde a XR é mais específica para NADPH, a produção de xilitol pode ser favorecida em detrimento da produção de etanol. Por outro lado, em leveduras com XR mais ativa com NADH, a produção de etanol pode ser predominante (70).

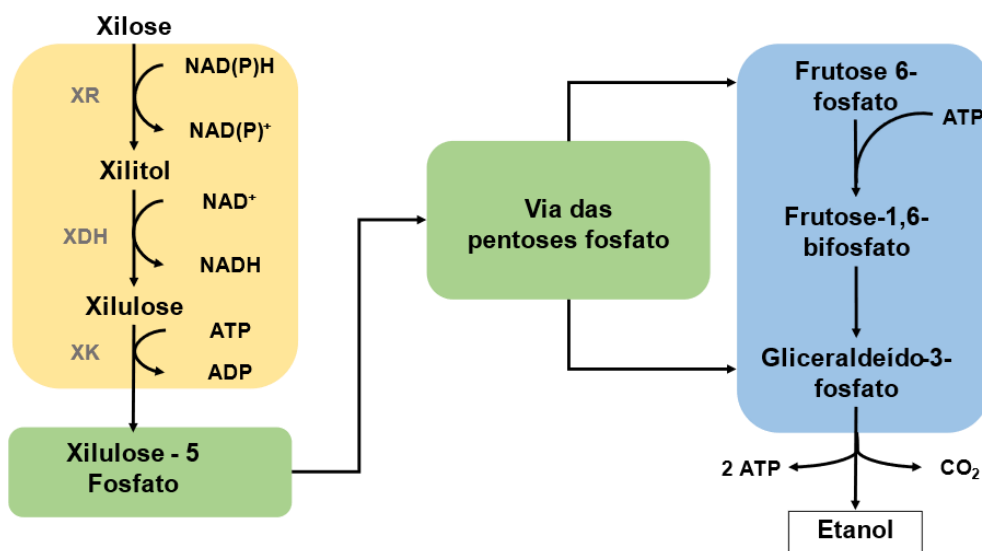


Figura 3. Via metabólicas de assimilação de D-xilose em leveduras.

Fonte: Adaptado de Kwak *et al.* (71)

Os principais fatores que influenciam as atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) nas culturas de *Scheffersomyces amazonensis* são a dependência estrita das atividades de XR e XDH em relação aos cofatores NADPH e NAD^+ , onde a atividade de XR em *Sc. amazonensis* é estritamente dependente de

NADPH. Isso resulta no acúmulo de xilitol em condições de baixa oxigenação, uma vez que o NADH não pode ser eficientemente oxidado através da respiração. A eficiência da bioconversão de D-xilose em xilitol é influenciada pela atividade das enzimas XR e XDH, bem como pelo uso dos cofatores NADPH e NADH.(72)

Por outro lado, a levedura *Spathaspora passalidarum* possui uma XR com preferência por NADH e uma XDH dependente de NAD^+ , permitindo que o NAD^+ exigido pela XDH seja fornecido pela reoxidação do NADH pela XR, sem a necessidade de oxigênio adicional. Esse equilíbrio de cofatores entre XR e XDH maximiza a eficiência da via de conversão de D-xilose em etanol. Além disso, a presença da via XR-XDH permite uma conversão eficiente de D-xilose em etanol, contribuindo para a alta produção de etanol observada em *S. passalidarum* sob condições anaeróbicas (73).

Além disso, é importante mencionar que a relação D-glicose e D-xilose no meio influencia na atividade das enzimas XR e XDH. O trabalho realizado por Silva e Felipe (74) indicaram que a atividade das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) de *Candida guilliermondii* é significativamente influenciada pela relação entre D-glicose e D-xilose no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Deste modo, à medida que a proporção de D-glicose aumentava em relação à D-xilose, a atividade das enzimas diminuía, com a relação de 1:5 D-glicose:D-xilose sendo identificada como a mais favorável para a produção de xilitol. Além disso, a presença de D-glicose no meio de fermentação não apenas inibiu a bioconversão de D-xilose em xilitol, mas também afetou a atividade da XDH, que foi maximizada em uma relação de 1:2,5. Esses resultados sugerem que a otimização da relação D-glicose:D-xilose é importante para melhorar a eficiência da produção de xilitol, destacando a importância de considerar tanto a composição do meio de fermentação quanto a fonte de carbono utilizada para o crescimento do inóculo.

2.8 Produção de bioetanol

Os combustíveis fósseis, fonte de energia predominante, emitem gases nocivos e material particulado, causando danos ambientais, o que incentivou a busca por alternativas mais limpas, como o bioetanol, que reduz a emissão de óxidos de enxofre (SO_x) e material particulado (75).

A fermentação de matérias-primas à base de açúcar, como cana-de-açúcar, ou biomassa rica em amido, como milho, batata, cereais e grão é chamada de bioetanol de “primeira geração”, enquanto o uso de matérias-primas lignocelulósicas como casca de arroz, palha de trigo, talos de milho, bagaço de azeitona, bagaço, casca de coco, resíduos da indústria de celulose e cascas de frutas estão entre os resíduos lignocelulósicos agrícolas e industriais não comestíveis utilizados na produção de bioetanol de 2ª geração (76,77).

As pentoses compõem 25 a 40% da biomassa lignocelulósica, com a D-xilose sendo a principal pentose encontrada nos hidrolisados lignocelulósicos (78). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* comumente usada para produção de etanol, não consegue metabolizar D-xilose. Além disso, as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para essa finalidade ainda enfrentam limitações, resultando em taxas de fermentação da D-xilose inferiores às alcançadas com a D-glicose (79). Assim, outras leveduras e bactérias estão sob investigação para fermentar D-xilose e outras pentoses em etanol (80).

Algumas espécies de leveduras são amplamente conhecidas por sua capacidade de metabolizar tanto açúcares C5 (pentoses) quanto C6 (hexoses), um aspecto importante para a produção de etanol em processos industriais. Entre elas, destacam-se *Schizosaccharomyces pombe*, *Scheffersomyces stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum* (81).

A produção de etanol nessas leveduras ocorre em várias etapas, conforme ilustrado na Figura 3. Inicialmente a D-xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR). Em seguida, o xilitol é oxidado pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), resultando na formação de D-xilulose, que é convertida em D-xilulose-5-fosfato. Essa molécula é posteriormente metabolizada pela via das pentoses fosfato (PPP), onde os rearranjos não oxidativos de α -xilulose-5-fosfato pelas enzimas ribulosefosfato-3-epimerase, transaldolase (TAL) e transcetolase (TK) geram gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Esses intermediários podem ser

convertidos em etanol pelas reações fermentativas da via glicolítica Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (82).

2.9 Xilitol

2.9.1 Características e aplicações

Com o aumento de casos de distúrbios metabólicos, que exigem a redução ou eliminação do consumo de açúcar, diversos centros de pesquisa estão em busca de um substituto que seja nutritivo e benéfico para a saúde. O xilitol, um poliálcool com a fórmula molecular $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano), é uma alternativa que atende a essas necessidades (53).

Além de ser um adoçante eficaz que pode substituir a sacarose, ele é seguro para diabéticos e possui várias aplicações clínicas. Sua estrutura (Figura 4), com cinco grupos hidroxila (OH) ligados a átomos de carbono, o classifica como um poliidroxiálcool acíclico ou pentitol (83).

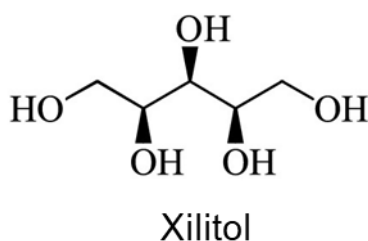


Figura 4. Estrutura química do xilitol.
Fonte: elaborado pelo Autor (2024)

O xilitol é um adoçante equivalente à sacarose em doçura, mas com menos calorias e menor índice glicêmico. Absorvido pelo fígado e pela microbiota intestinal de forma independente da insulina, é metabolizado lentamente, evitando picos de D-glicose no sangue. Isso o torna ideal para diabéticos e dietas de baixo carboidrato, oferecendo saciedade, baixa resposta glicêmica e um perfil nutricional melhorado (84).

Além de seus benefícios metabólicos, ele inibe o crescimento de bactérias cariogênicas, ajuda na remineralização do esmalte e, quando combinado com flúor, potencializa a prevenção de cáries. Além disso, seu consumo frequente, aliado a boas práticas de higiene bucal, reduz a incidência de novas cáries (35). Na indústria

farmacêutica e alimentícia, é utilizado como agente texturizante e umectante, além de estabilizador químico e microbiológico, sendo comum em alimentos como balas, geleias, chocolates, sorvetes e bebidas (85).

Seu efeito prebiótico também se destaca, pois reduz o pH das fezes e aumentar a quantidade de bactérias gram-positivas no intestino. No entanto, doses elevadas podem causar efeitos colaterais gastrointestinais temporários devido à digestão e absorção limitadas no intestino delgado, onde apenas 25–50% do xilitol ingerido é absorvido. Esses efeitos podem ser revertidos facilmente ao interromper o consumo (86).

Além disso, o xilitol tem sido estudado como agente terapêutico no tratamento de infecções respiratórias, inflamações, osteoporose, otite média aguda, anemia hemolítica, lesões renais e na nutrição parenteral. Além disso, ele pode inibir o crescimento de bactérias otopatogênicas, o que contribui para a redução da incidência de otite média aguda e doenças nasofaríngeas (86,53). O trabalho realizado por Soler *et al.* (87) investigou a eficácia do xilitol contra o coronavírus, indicando que um spray nasal contendo xilitol e extrato de semente de toranja pode ajudar a regular as vias de infecção e replicação, oferecendo uma opção de tratamento adjuvante para casos leves e moderados da doença.

2.9.2 Produção do xilitol

Atualmente, o xilitol comercial é produzido pela redução química da D-xilose via hidrogenação catalítica. Este processo envolve a hidrólise da biomassa lignocelulósica, seguida pela purificação da D-xilose a partir da fração hemicelulósica (84). Um dos grandes desafios dos hidrolisados hemicelulósicos é a sua complexidade, pois, além de serem compostos principalmente por D-xilose, também contêm outros monossacarídeos, ácidos orgânicos, produtos de degradação de açúcares e compostos fenólicos derivados da lignina (44). É necessário remover esses outros monossacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica, como D-glicose, galactose e L-arabinose, para evitar a formação de polióis e subprodutos indesejados que dificultam a purificação do xilitol em etapas subsequentes. Após um extenso processo de purificação, uma solução de D-xilose ultrapura é submetida à hidrogenação catalítica em alta temperatura e pressão, utilizando níquel de Raney

como catalisador, o que pode resultar em um rendimento de conversão de até 98% (88). A etapa final do processo químico de produção do xilitol envolve a recuperação, purificação (separação cromatográfica) e cristalização a baixas temperaturas, Figura 5 (89).

O alto consumo energético necessário para os processos de hidrogenação, combinado com o elevado custo do catalisador de níquel de Raney e a desativação do catalisador metálico, além da complexidade dos procedimentos de purificação, são alguns dos fatores que contribuem significativamente para os altos custos do processo químico de produção de xilitol (84)

Como alternativa para superar o alto custo do processo químico, a rota biotecnológica foi proposta, embora ainda existam obstáculos a serem superados antes que este se torne viável comercialmente.

As principais vantagens da rota biotecnológica incluem a operação em condições amenas de temperatura e pressão. Além disso, a conversão da D-xilose em xilitol é realizada por enzimas ou microrganismos, sendo a conversão microbiana a mais utilizada. Este processo é considerado mais ecologicamente correto em comparação à rota química e apresenta extensa literatura mundial, com diversos estudos utilizando diferentes matérias-primas, condições de fermentação e parâmetros operacionais (90).

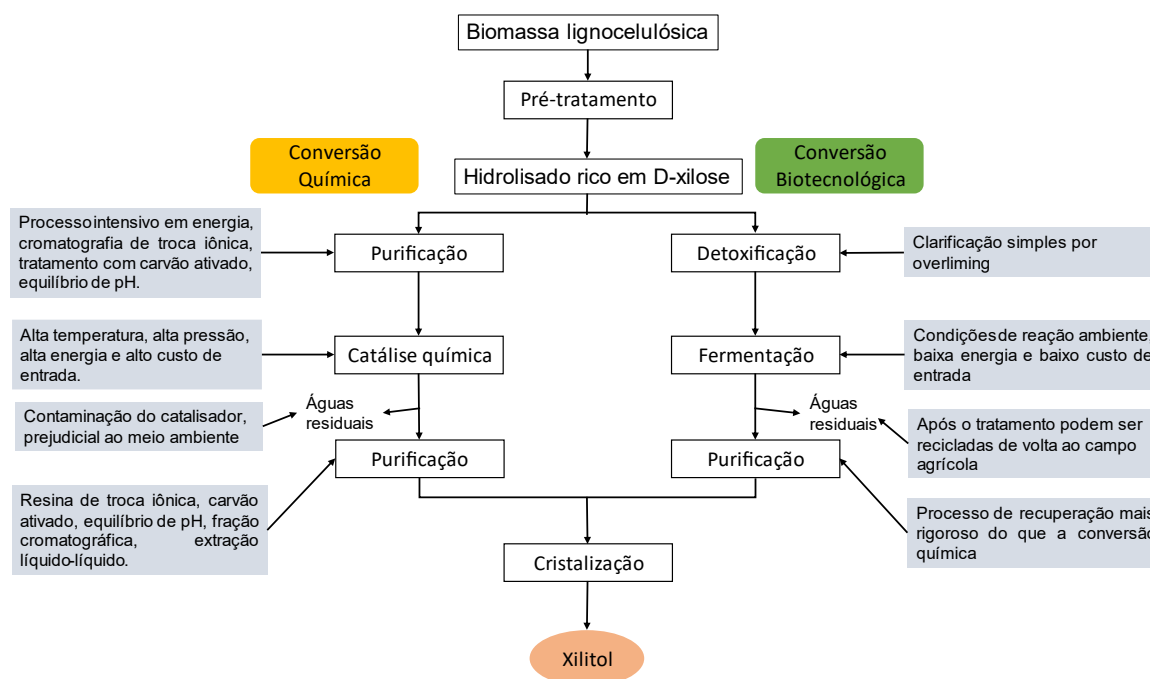


Figura 5. Produção de xilitol por rotas químicas e biotecnológicas.

Fonte: Adaptado de Dasgupta *et al.* (91)

A recuperação do xilitol do caldo de fermentação enfrenta desafios devido às impurezas presentes, incluindo células microbianas, detritos celulares, nutrientes complexos, produtos químicos derivados da biomassa e do seu processamento, restos de açúcares não reagidos (D-xilose, L-arabinose, D-glicose) e uma mistura de álcoois de açúcar como arabitol e sorbitol, que são difíceis de separar do xilitol. Essa mistura complexa demanda várias etapas de purificação antes da cristalização, elevando o custo do processo (88).

2.10 Fatores que favorecem o crescimento dos microrganismos

Há diversos fatores, como pH, temperatura, concentração de inóculo, taxa de aeração e nutrientes, influenciam o crescimento de microrganismos. Assim, ajustar essas condições específicas é essencial para otimizar o crescimento e obter um produto de alta qualidade. Há diversos estudos que focam nas condições ideais para a produção eficiente de xilitol e etanol.

2.10.1 Temperatura e pH

A temperatura é um parâmetro crítico, pois microrganismos têm uma faixa estreita de temperatura ideal para crescimento. Temperaturas abaixo do ideal resultam em crescimento lento e menor produção, enquanto temperaturas muito altas podem causar morte celular e prejudicar a síntese de produtos, afetando o rendimento e a qualidade (92). A maioria das leveduras produtoras de xilitol crescem na faixa de temperatura de 30 a 38°C, enquanto as leveduras produtoras de etanol estão na faixa de 20 e 35 °C e têm uma temperatura ótima próxima a 30 °C (38,93).

Diferentes sistemas biológicos possuem faixas ideais de pH variadas, com a maioria dos microrganismos crescendo melhor em pH entre 5 e 7. Durante a fermentação, o pH pode sofrer alterações, pois o crescimento celular libera metabólitos no meio e o consumo do substrato também provoca mudanças no pH (92). As leveduras geralmente possuem uma ampla faixa de tolerância ao pH, variando de 2,5 a 8,0 (94). O pH é crucial para o transporte de D-xilose e para manter o estado de protonação da XR, garantindo sua atividade catalítica eficiente (88).

A produção de etanol é influenciada pelo pH do meio, pois afeta a contaminação bacteriana, o crescimento da levedura, a taxa de fermentação e a formação de subprodutos. A permeabilidade de alguns nutrientes essenciais nas células é influenciada pela concentração de H^+ no meio de fermentação. A fermentação para a produção de etanol apresenta uma faixa ideal de pH entre 4,0 e 5,0. Quando o pH cai abaixo de 4,0, é necessário um tempo de incubação maior, mas a produção de etanol não sofre uma redução significativa. Por outro lado, pH acima de 5,0 pode resultar em uma queda na concentração de etanol (93).

O trabalho realizado por Silveira *et al.* (95) investigou a produção de xilitol pela cepa *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1 em diferentes valores de pH (3–10) e temperaturas (25–45 °C). Os autores descobriram que as condições ideais para o crescimento da cepa foram pH 8 e temperatura de 30 °C, embora a cepa também tenha mostrado crescimento em uma ampla faixa de pH e temperatura até 45 °C. Um estudo realizado por Moraes *et al.* (96) identificaram 7 novas cepas de *Candida*, destacando que a *C. tropicalis* JA2 foi a que produziu a maior quantidade de xilitol. Assim, os autores avaliaram o efeito do pH na produção de xilitol, ajustando o pH do meio para 4,6, 5,5, 6,0, 6,4 e 7,0. Foi constatado que a D-xilose foi totalmente consumida a pH 6,4 após 42 horas, enquanto 87,5% do açúcar foi utilizado a pH 5,5, 6 e 7. A uma condição de pH 4,6, houve uma redução de 22% no consumo de D-xilose. Após otimizar todos os fatores, o rendimento na produção de xilitol alcançou 0,86 e a concentração de xilitol foi de 109,5 g/L.

2.10.2 Fontes de carbono

A co-fermentação de D-glicose e D-xilose continua sendo um desafio para a maioria das leveduras que fermentam pentoses, uma vez que a D-glicose inibe a utilização de outros sacarídeos. Como resultado, a presença de hexoses, especialmente D-glicose e manose que geralmente estão presentes em grandes quantidades em hidrolisados lignocelulósicos, afeta o consumo de pentoses (97).

A pesquisa realizada por Nakanishi *et al.* (98) buscou implementar estratégias, como a reciclagem celular e a operação em modo de batelada alimentada, para minimizar a inibição causada pela D-glicose e permitir uma melhor utilização dos açúcares disponíveis, tanto hexoses quanto pentoses. A implementação da estratégia ajudou a melhorar a taxa de consumo de D-xilose, mesmo na presença de D-glicose.

Os resultados também mostraram que a levedura *Spathaspora passalidarum*, em particular, apresentou uma melhor produtividade e rendimento, consumindo tanto pentoses quanto hexoses em um tempo mais curto, o que sugere que a adaptação das células e as condições de fermentação contribuíram para superar a inibição causada pela D-glicose.

Além disso, é importante mencionar que o tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio, assim como a razão C/N do meio de cultivo para leveduras, influenciam o crescimento celular, a biossíntese de metabólitos e, conseqüentemente, o custo do bioprocessamento (99).

O estudo realizado por Abd-Aziz *et al.* (100) investigou o efeito da relação carbono nitrogênio (C/N) e da concentração de amido de sagu na produção de etanol utilizando a levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* YKU 131, que expressa glucoamilase. Foram avaliadas as condições ideais para maximizar a produção de etanol, avaliando como diferentes razões C/N e concentrações de amido influenciam a atividade enzimática e a eficiência da fermentação. O estudo determinou que a razão C/N ideal para a produção de etanol a partir de amido de sagu é 7,9, resultando nos maiores rendimentos de etanol, com 4,7 g/L e 10,1 g/L produzidos a partir de 20 g/L e 40 g/L de amido de sagu, respectivamente.

O trabalho realizado por Sokchea *et al.* (101) avaliou o efeito do tempo, da relação carbono/nitrogênio (C/N) e da concentração de melaço no meio de crescimento sobre a produção de biomassa pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O estudo indica que a relação C/N afeta significativamente o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Especificamente, foi observado que a biomassa da levedura foi mais alta em uma relação C/N de 10/1, enquanto a menor biomassa foi registrada em uma relação C/N de 15/1. Os resultados sugerem que tanto níveis muito baixos quanto muito altos de concentração de melaço, que influenciam a relação C/N, podem afetar negativamente o crescimento da levedura.

2.10.3 Aeração

A transferência de oxigênio é uma preocupação importante em sistemas biológicos aeróbicos, pois, apesar de a maioria dos nutrientes ser altamente solúvel em água, o oxigênio tem baixa solubilidade em soluções aquosas. Isso pode limitar o desempenho ideal, afetando o crescimento celular e a formação de produtos (92). A taxa de agitação regula tanto a entrada de nutrientes do meio de fermentação para dentro das células quanto a saída do etanol para o meio. Com o aumento da taxa de agitação, há um incremento na produção de etanol, maior consumo de açúcar e menor efeito inibitório do etanol nas células. Geralmente, a agitação ideal para fermentação com leveduras varia entre 150 e 200 rpm. No entanto, uma agitação excessiva pode prejudicar a produção eficiente de etanol, interferindo nas atividades metabólicas das células (102).

A aeração é crucial na produção de xilitol, pois a disponibilidade de oxigênio determina se a D-xilose seguirá a via metabólica da respiração ou da fermentação, influenciando o consumo de carbono tanto para o crescimento quanto para a bioconversão (103). O trabalho realizado por Raj e Krishnan (104) buscou otimizar o processo de aeração em duas etapas para a produção de xilitol, utilizando meio definido por *Candida tropicalis*. A taxa de aeração nas primeiras 12 horas de fermentação foi de 3,33 vvm, sendo posteriormente reduzida para 0,33 vvm, o que resultou em uma produtividade de xilitol de 0,85 g/L.h com um rendimento de 0,85 g/g. Misra, Raghuwanshi e Saxena (41) também estudaram a aeração em duas etapas no hidrolisado de sabugo de milho usando *Candida tropicalis*. Com uma taxa de aeração inicial de 0,7 vvm por 24 horas, seguida de 0,3 vvm por 36 horas, foi observado um rendimento de 0,58 g/g e uma produtividade de 0,283 g/L.h.

O estudo de Arruda *et al.*, (105) investigou o escalonamento da produção de xilitol utilizando a levedura *Candida guilliermondii*, com o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) como parâmetro chave. Foram testados biorreatores de 2,4 L, 18 L e um piloto de 125 L, sendo o primeiro relato sobre a produção de xilitol em escala piloto a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O k_La constante de 16 h^{-1} garantiu uma taxa de crescimento celular 44,6% maior nos biorreatores maiores, evidenciando a importância da oxigenação adequada. Além disso, a produtividade volumétrica manteve-se praticamente constante, variando

apenas 13% entre as diferentes escalas, o que confirma a eficácia da metodologia para escalonamento e sua viabilidade para aplicação industrial.

O trabalho realizado por Bellido *et al.* (106) analisou a influência da aeração limitada no processo de fermentação pela levedura *Pichia stipitis*, visando aumentar a taxa de consumo de açúcares e reduzir o tempo necessário para alcançar boas produtividades e rendimentos de etanol em hidrolisados de palha de trigo. Assim, a taxa de aeração mais eficaz foi de 0,10 L de ar/min em biorreator de 2L contendo 0,9 L de meio, correspondendo a um k_{La} de $3,3 \text{ h}^{-1}$. Essa taxa resultou em uma melhor utilização da D-xilose, alcançando um rendimento de etanol de 0,40 g/g e a completa depleção dos açúcares em 72 horas. Isso indica que a aeração controlada nessa taxa específica melhorou de forma ideal o processo de fermentação.

2.10.4 Fontes de nitrogênio

Na fermentação de produtos como etanol e xilitol, a escolha da fonte de nitrogênio desempenha um papel importante na eficiência do processo, influenciando diretamente o crescimento da levedura e a produção desses bioprodutos.

Durante a fermentação alcoólica, a levedura utiliza fontes de nitrogênio assimilável e outros nutrientes para crescer, produzir biomassa e compostos voláteis, assim, a ausência desses nutrientes pode causar uma fermentação lenta ou interrompida (107).

A levedura pode usar quase 30 compostos distintos contendo nitrogênio, incluindo aminoácidos, ureia, amônio, bases de nitrogênio e derivados de purina (108). Entre as fontes de nitrogênio disponíveis, amônio e ureia são duas fontes baratas de nitrogênio comumente usadas em processos de fermentação em larga escala. *Saccharomyces cerevisiae* pode utilizar ureia como única fonte de nitrogênio degradando-a em duas etapas para amônia e CO_2 na produção de etanol (109).

Não existe uma fonte específica de nitrogênio essencial para a produção de xilitol, assim, diversos estudos têm analisado diferentes fontes de nitrogênio, incluindo peptonas e extratos de levedura como fontes orgânicas, e sulfato de amônio e ureia como fontes inorgânicas (88).

Por isso, nem todas as fontes de nitrogênio promovem o crescimento de forma igualmente eficaz. Fontes boas de nitrogênio, como amônia, glutamina e asparagina, resultam em taxas de crescimento relativamente maiores comparadas às fontes

pobres, como prolina e ureia. Para utilizar uma molécula como fonte de nitrogênio, as células de levedura precisam convertê-la em glutamato e glutamina, que são os doadores de nitrogênio para todos os outros compostos nitrogenados na célula. Tanto o glutamato quanto a glutamina podem ser sintetizados diretamente usando amônia como doadora do grupo amino (110). Entre as fontes de nitrogênio, o extrato de levedura e peptona estão entre as fontes orgânicas de nitrogênio mais comuns, enquanto nitrato de amônio, cloreto de amônio ureia, e sulfato de amônio são as fontes inorgânicas mais utilizadas. Entre as duas, as fontes orgânicas são preferíveis, pois têm um impacto positivo no crescimento celular dos microrganismos produtores de xilitol (38).

A Tabela 1 mostra diferentes fontes de nitrogênio utilizadas pelos autores para melhorar o crescimento celular ao longo da fermentação por diferentes espécies de leveduras, assim como os rendimentos de xilitol e etanol.

O estudo realizado por Albuquerque *et al.* (111) investigou o impacto de várias fontes de nitrogênio na produção de xilitol via *Kluyveromyces marxianus* CCA510 a partir do bagaço de caju. Das três fontes de nitrogênio selecionadas, ou seja, sulfato de amônio, ureia e extrato de levedura, a adição de ureia resultou em maior produção de xilitol (12,27 g/L), que foi cerca de 18% maior do que a do controle, enquanto a maior produção de biomassa foi obtida com extrato de levedura (12,93 g/L) seguido por sulfato de amônio (10,58 g/L) e ureia (10,43 g/L).

Os resultados obtidos por Martiniano *et al.* (112) para a levedura *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A mostraram que, quando cultivada em meio contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, a levedura apresentou uma baixa eficiência de consumo de D-xilose, com apenas 60% de consumo observado. No entanto, no meio que continha 20 g/L de extrato de arroz, 2 g/L de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e 0,1 g/L de cloreto de cálcio (CaCl_2), a levedura produziu $5,38 \pm 0,35$ g/L de etanol após 96 horas de fermentação, indicando uma melhoria significativa na produção de etanol quando um meio mais nutritivo foi utilizado.

Tabela 1. Fontes de nitrogênio utilizadas na fermentação por diferentes espécies de leveduras.

Microrganismo	Substrato	Suplementação	Xilitol (g/L)	Xilitol (Y _{P/S})	Etanol (g/L)	Etanol (Y _{P/S})	Referencias
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCA510	Bagaço de caju	20 g/L de D-glicose; 0,4 g/L de ureia; 1,2 g/L de KH ₂ PO ₄ ; 0,18 g/L de Na ₂ HPO ₄ e 10 g/L de extrato de levedura.	12,27	--	--	--	(111)
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	Bagaço de Cana-de-açúcar	20 g/L Extrato de farelo de arroz, 2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,1 g/L CaCl ₂	0,87	--	17	0,33	(112)
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	Bagaço de Cana-de-açúcar	3 g/L extrato de levedura	0,28	--	9,27	0,20	(112)
<i>Spathaspora arborariae</i>	Bagaço de Cana-de-açúcar	20 g/L Extrato de farelo de arroz, 2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,1 g/L CaCl ₂	--	--	5,38	0,14	(112)
<i>Pichia stipites</i> NRRL Y-11543	Extratos de madeira	1,5 g/L de Extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 2 g/L de KH ₂ PO ₄ e 1 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄	--	---	13,51	--	(113)
<i>Candida shehatae</i> NRRL Y-12858	Extratos de madeira	1,5 g/L de Extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 2 g/L de KH ₂ PO ₄ e 1 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄	--	--	8,87	--	(113)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	grão usado de cervejaria	6 g/L extrato de levedura	--	--	24	0,57	(114)
<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i>	Bagaço da cana-de-açúcar	2,0 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5,0 g/L de peptona, 3,0 g/L de extrato de levedura e 0,1 g/L de CaCl ₂ .2H ₂ O	--	--	15,59	0,46	(115)
<i>Candida guilliermondii</i>	Bagaço da cana-de-açúcar	20,0 g/L de extrato de farelo de arroz, 2,0 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,1 g/L de CaCl ₂ .2H ₂ O	26,88	0,83	--	--	(115)
<i>Barnettozyma populi</i> NRRL Y-12728	Meio definido (10 g/L Extrato de levedura, 15 g/L KH ₂ PO ₄ , 3 g/L (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 1 g/L MgSO ₄	4,75 g/L Extrato de levedura, 3 g/L (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 5,1 g/L KH ₂ PO ₄ e 0,4 g/L MgSO ₄	31,2	--	--	--	(116)

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

2.11 Biorreatores

Atualmente, os biorreatores são equipamentos essenciais no avanço da biotecnologia, servindo como ponte entre experimentos em pequena escala e processos industriais de larga escala. Eles são projetados para cultivar células animais, vegetais ou microbianas, e incluem sistemas de controle para variáveis como agitação, aeração, temperatura, pH, fornecimento de nutrientes e remoção de produtos, otimizando as condições para o crescimento celular e a produção de biomoléculas. A escolha do biorreator adequado é essencial para que o processo seja realizado de forma eficiente. (117)

A maioria dos biorreatores pode ser dividida em dois grupos principais: sistemas de suspensão e sistemas de imobilização. Biorreatores de tanque agitado, *airlift* e coluna de bolhas são usados principalmente para culturas em suspensão, enquanto biorreatores de membrana, leito fixo e leito fluidizado são mais adequados para o cultivo de células aderidas ou para reações enzimáticas imobilizadas (92). A Tabela 2 mostra alguns exemplos de produção de xilitol e etanol em diferentes configurações e condições de operação.

Os biorreatores de tanque agitado (STR), são os mais utilizados na produção de xilitol, especialmente em fermentações com células livres (85). Eles facilitam o controle da temperatura através de trocadores de calor e também permitem o monitoramento e ajuste do pH com sondas apropriadas e a adição de soluções ácidas ou básicas (118). Eles possuem uma configuração cilíndrica e têm uma relação diâmetro-altura de 1:2 ou 1:3 e são preenchidos com meio líquido que corresponde a 70–80% do volume total. E são uma boa opção para escalar processos, com configurações de bancada semelhantes às industriais(119).

Biorreatores de coluna são dispositivos cilíndricos que promovem a oxigenação e agitação do meio de cultura sem agitadores mecânicos, disponíveis em várias configurações, como colunas de bolhas e reatores *airlift*. No reator de coluna de bolhas, o gás inserido na base cria bolhas que homogeneizam o sistema, enquanto os reatores *airlift* utilizam um tubo de circulação para direcionar o fluxo do meio (119). Os biorreatores de leito fluidizado, geralmente, são utilizados em culturas com células ou enzimas imobilizadas (120). Eles oferecem a vantagem de causar baixa lesão por cisalhamento às células, preservando a matriz de imobilização e promovendo uma boa homogeneização do meio devido aos sólidos em movimento no leito (119). Os

biorreatores de membrana possuem unidades de separação com membranas que permitem a separação, retenção e movimentação de líquidos e sólidos. Eles podem ser externos, com membranas conectadas ao biorreator e recirculação do líquido, ou internos, com membranas dentro do biorreator formando um único conjunto (120).

Para uma produção eficiente de xilitol e etanol, diversos modos de fermentação, como descontínuo, contínuo, descontínuo alimentado e reciclagem, têm sido utilizados. Nesses modos de fermentação os biorreatores controlam parâmetros como oxigênio dissolvido, temperatura e pH, regulando o crescimento da biomassa e aumentando a produção de xilitol - a configuração em descontínuo é amplamente utilizada na produção de xilitol devido à sua simplicidade e facilidade de controle da contaminação (38).

Além da operação clássica em modo descontínuo, há o processo descontínuo alimentado, que envolve a adição de substratos ou nutrientes em diferentes momentos durante o processo, resultando em um aumento no rendimento de produção ou na produtividade (121). Nos processos contínuos, ao contrário das operações descontínuo e descontínuo alimentado, as correntes de entrada e saída no biorreator fluem continuamente na mesma taxa. Iniciados em modo descontínuo ou descontínuo alimentado, esses processos atingem uma fase estacionária onde as propriedades permanecem constantes ao longo do tempo, permitindo a manutenção de altas taxas de produção por longos períodos (120).

Para melhorar o rendimento e a produtividade, a reciclagem de células é aplicada, operando biorreatores com uma maior concentração de células do que nas configurações tradicionais. Métodos como imobilização de células, reciclagem por centrifugação e sistemas de reciclagem baseados em membranas são usados para manter uma alta densidade celular nos biorreatores (38).

Tabela 2. Diferentes modos de operação em biorreatores para a produção de xilitol.

Modo de operação	Substrato	Microrganismo	Condições/ processo	Xilitol $Y_{P/S}$ (g/g)	Xilitol Q_P (g/L/h)	Xilitol g/L	Etanol g/L	Referências
Descontínuo	Hidrolisado de Palha de arroz	<i>Meyerozyma caribbica</i> CP02	0,6 L/min 150 rpm D-xilose: 60 g/L Células: 1.5% 32 °C e pH 3,5	0,63	0,52	--	--	(122)
Descontínuo	Hidrolisado de Palha de trigo	<i>Candida tropicalis</i>	0,2 vvm 400 rpm D-xilose: 30g/L Células: 10% 30 °C e pH 6	0,58	1,49	25,38	4.51	(123)
Descontínuo / Células imobilizadas	Meio definido	<i>Pichia fermentans</i> WC1507	0,5vvm 1.100 / 1.700 rpm D-xilose: 120 g/L Células: $3,4 \times 10^7$ /mL 28 °C	61,5%	0,52	63,0	--	(124)
Descontínuo	Hidrolisado de bagaço de Palmeira	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	0,1vvm 300 rpm D-xilose: 60 g/L Células: 0,5 g/L 30 °C e pH 6,0	0,38	0,19	12,82	--	(125)
Descontínuo	Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	<i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Kla: 21 h ⁻¹ D-xilose: 40g/L Células: 1g/L 30 °C e pH 5,5	0,56	0,12	19,56	--	(126)
Descontínuo	Hidrolisado de frondes de palma de óleo	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	0,1vvm 200 rpm 30 °C e pH 6,0	0,34	0,20	10,15	2.28	(127)
Descontínuo	Hidrolisado de bagaço de Cacho Vazio de fruto de palma de óleo	<i>Candida tropicalis</i>	30% oxigênio 100 rpm D-xilose: 21 g/L Células: 5 g/L 30 °C e pH 5,6	0,98	0,033	1,8	--	(128)
Descontínuo	Meio definido	<i>Candida tropicalis</i>	150 rpm D-xilose: 20g/L Células: 6×10^6 /mL 30 °C e pH 5,5	0,35	--	6,0	--	(129)
Descontínuo	Meio semi-definido	<i>Starmerella meliponinorum</i>	0,5vvm 200 rpm 28 °C e pH 4,0	0,6	--	--	1,0	(103)
Descontínuo	Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	<i>Yarrowia lipolytica</i>	1,0 L/min 250 rpm D-xilose: 30 g/L 30 °C e pH 6,8	0,54	--	50,5	--	(130)

Continuação

Modo de operação	Substrato	Microrganismo	Condições do processo	Xilitol Y _{P/S} (g/g)	Xilitol Q _P (g/L/h)	Xilitol g/L	Etanol g/L	Referências
Descontínuo	Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	<i>Candida tropicalis</i>	0,7 vvm 250 rpm D-xilose:75g/ 35 °C e pH 6,5	0,74		52,12	--	(131)
Contínuo	Meio definido	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,0 vvm 450 rpm D-xilose: 100g/L Células:10 ⁷ /mL 42 °C e pH 5		3,36	322,07	--	(132)
Descontínuo	Hidrolisado de cascas de soja e cascas de aveia	<i>Spathaspora hagerdaliae</i> <i>UFMG-CM-Y303</i>	1 vvm 300 rpm D-xilose:30g/L Células:10 ⁶ CFU/mL 28 °C e pH 5,5	0,31	0,07	6,8	6,1	(133)
Descontínuo	Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	<i>Candida tropicalis</i>	3,33-033 vvm 300 rpm Células:10% 30°C e pH 5,5	0,76	0,86		55.64	(104)

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a capacidade fermentativa das leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* visando a produção de etanol de segunda geração e/ou xilitol, a partir do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar (50% de palha e 50% de bagaço).

Objetivos específicos

- I. Avaliar a influência da suplementação de fontes de nitrogênio na obtenção de xilitol e/ou etanol pelas leveduras, *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.
- II. Analisar comparativamente os resultados obtidos pelas leveduras e identificar aquela com os melhores resultados de conversão e produtividade de xilitol e/ou etanol para ser utilizada em fermentação em biorreator de bancada.
- III. Avaliar a influência dos parâmetros operacionais aeração e agitação na produção de xilitol e/ou etanol em biorreator de bancada em modo descontínuo utilizando hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.
- IV. Determinar as atividades enzimáticas de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), principais enzimas no metabolismo de D-xilose nos experimentos em biorreator de bancada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma da metodologia

A Figura 6 apresenta o fluxograma da metodologia utilizada para avaliar a capacidade fermentativa das leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* em hidrolisado hemicelulósico derivado da biomassa de cana-de-açúcar. O fluxograma abrange desde a caracterização e pré-tratamento do bagaço e da palha, passando pela produção de hidrolisado com ou sem detoxificação, até a fermentação pelas leveduras. O fluxograma também destaca as etapas de otimização de fontes de nitrogênio e as análises subsequentes, incluindo fermentação em biorreator e análises enzimáticas.

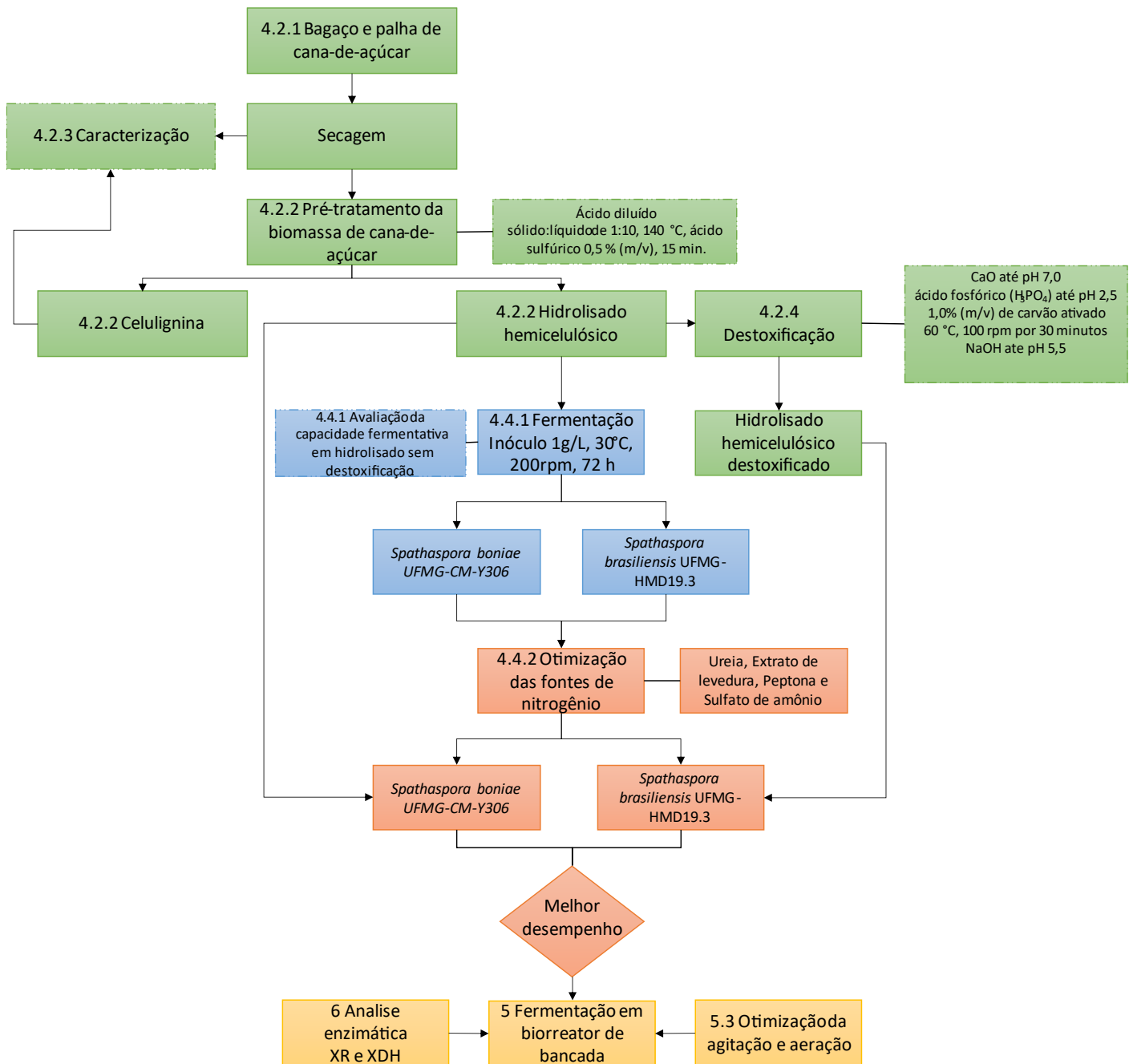


Figura 6. Fluxograma da metodologia utilizada no trabalho.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

4.2 Material e preparo do hidrolisado hemicelulósico da cana-de-açúcar

4.2.1 Biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar foram cedidos pela Usina de açúcar e álcool Santa Cruz, do grupo São Martinho, localizada na cidade de Américo Brasiliense – SP. O material foi seco ao sol até umidade em torno de 10 %, moído em moinho de facas e acondicionado até o momento da etapa de pré-tratamento para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico.

4.2.2 Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar

A biomassa da cana-de-açúcar (50% de palha e 50% de bagaço) foi submetida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído visando a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses. Esta etapa foi realizada no CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, no laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) na cidade de Campinas – SP no ano de 2019. O reator que foi utilizado tinha capacidade volumétrica útil de 250 litros. A etapa de pré-tratamento foi realizada utilizando uma relação sólido:líquido de 1:10, temperatura de 140 °C, concentração de ácido sulfúrico de 0,5 % (m/v) e um tempo de reação de 15 min (42). O hidrolisado hemicelulósico obtido, foi filtrado para separação da fração sólida (celulignina), foi armazenado sob refrigeração a 4 °C para posterior caracterização quanto aos teores de açúcares e compostos tóxicos. A celulignina resultante dessa etapa foi lavada com água para remoção do ácido residual, seca ao sol até umidade em torno de 10% e armazenada a temperatura ambiente para posterior processo de caracterização.

4.2.3 Caracterização química da biomassa de cana-de-açúcar

A biomassa de cana-de-açúcar e a celulignina (fração sólida obtida após etapa de pré-tratamento com ácido diluído) foram caracterizadas quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina, acetil, cinzas e extrativos. A metodologia padrão utilizada foi de caracterização de carboidratos e lignina estruturais de biomassa, do National Renewable Energy Laboratory – NREL(134).

Na primeira etapa, destinada às amostras "in natura", foi utilizada a extração de extrativos com o auxílio de um extrator Soxhlet. Foram preparadas triplicatas de amostras com aproximadamente 3,0 g cada, com umidade previamente determinada. O material foi empacotado em papel filtro e submetido a duas extrações sequenciais: uma com 200 mL de água destilada e outra com 200 mL de etanol, ambas com escoamento realizado três vezes. Após as extrações, o material foi seco em estufa a 105°C até atingir peso constante, permitindo o cálculo da umidade com base na diferença entre a massa seca inicial e final.

Na segunda etapa, foi realizada a hidrólise ácida do material previamente seco para análise da fração lignocelulósica. Para isso, foram pesados 0,3 g do material seco em triplicata, sendo cada amostra colocada em tubos de ensaio contendo 3 mL de H₂SO₄ a 72% (m/m). Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C por 60 minutos, com homogeneização a cada 10 minutos. Em seguida, o conteúdo foi transferido para frascos contendo 84 mL de água destilada, diluindo o ácido para 4% (m/m), e autoclavado a 121°C por 1 hora. Após o resfriamento, o conteúdo foi filtrado em cadinhos Gooch, separando-se as frações líquida (solubilizada) e sólida (insolúvel). O líquido foi recolhido em balões volumétricos e analisado por HPLC para determinar os teores de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, enquanto o resíduo sólido foi seco em estufa para quantificação da lignina insolúvel.

Adicionalmente, a lignina solúvel foi determinada por espectrofotometria a 205 nm, após diluição da fração líquida em balões de 50 mL. A quantificação das cinzas foi realizada pelo aquecimento do resíduo sólido em mufla, seguindo um aquecimento progressivo a 105°C, 250°C e 575°C.

4.2.4 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da biomassa da cana-de-açúcar

O tratamento do hidrolisado hemicelulósico da biomassa da cana-de-açúcar foi realizado de acordo com Marton *et al.* (2006). O pH foi ajustado com óxido de cálcio (CaO) até pH 7,0, depois com ácido fosfórico (H₃PO₄) até pH 2,5, seguido da adição de 1,0% (m/v) de carvão ativado e incubado em incubadora de agitação a 60 °C, 100 rpm por 30 minutos. A filtração a vácuo foi utilizada para remover todos os precipitados formados durante o processo. Finalmente, o pH do hidrolisado hemicelulósico foi ajustado para 5,5 com hidróxido de sódio (NaOH) antes da esterilização a 110 °C (0,5 atm) por 15 minutos para ser usado como meio de fermentação.

4.3 Leveduras e condições de crescimento

4.3.1 Micro-organismos

As leveduras *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306 e *Spathaspora brasiliensis* UFMG-HMD19.3 foram obtidas da Coleção de Micro-organismos da Universidade Federal de Minas Gerais. Para a manutenção das leveduras em estoque, estas foram preservadas em meio de cultivo ágar nutriente (adicionando 20 g/L D-glicose) a 4 °C com repiques realizados a cada 2 meses. Além disso, as leveduras foram preservadas em glicerol a -80 °C.

4.3.2 Curva padrão da produção de biomassa celular

O crescimento celular para elaborar a curva padrão das leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* foi realizada em meio YPX (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e D-xilose 30 g/L). Para isso, as leveduras foram previamente inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar nutriente inclinado, por 24h e incubadas em estufa a 30°C. Posteriormente, essas células foram inoculadas em 500 mL (distribuído em 10 frascos de 125 mL contendo 50 mL) de meio YPX, por 24h a 30°C com agitação de 200 rpm em incubadora agitadora. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 2057 xg por 5 minutos. As células foram lavadas com

água destilada (2057 xg por 5 minutos) e ressuspendidas em água para obter uma solução de células (solução mãe). Com essa solução, foi retirada uma alíquota e feita leitura no espectrofotômetro a 600nm. Dessa forma, a partir dessa solução, foram feitas diluições sucessivas e realizada a leitura em espectrofotômetro para obter os demais pontos da curva. Para determinar o peso seco da solução mãe e, assim, inferir os valores dos demais pontos da curva, 10 mL da solução mãe foram colocados em cadinhos previamente secos por 24h a 100°C (realizado em triplicata). Esses cadinhos foram colocados em estufa a 100°C por 24h para posteriormente serem pesados e terem os valores da massa de células residual em cada cadinho determinadas. A partir da concentração celular da solução mãe foi determinado a concentração celular nas demais diluições utilizando os valores de absorbância de cada diluição e, assim, elaboradas curvas padrões para cada uma das espécies de leveduras (Apêndice 1).

4.3.3 Preparo do inóculo

O inóculo da fermentação foi preparado em frascos do tipo Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400mL de meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 30 g/L de D-xilose) inoculadas com células previamente crescidas em tubo de ensaio (ágar nutriente inclinado). Os frascos foram submetidos a agitação de 200 rpm em incubadora agitadora, à temperatura de 30°C por 24 horas. Após esse período, as células foram recuperadas por centrifugação 2057 xg por 5 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Para estimar o volume necessário do inóculo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 600nm, e os valores determinados com auxílio da curva padrão previamente estabelecida para obter uma concentração inicial de células de 1,0 g/L.

4.4 Efeito das fontes de nitrogênio na fermentação de hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar para produção de xilitol e/ou etanol

4.4.1 Fermentação em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação

Os ensaios em hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação foram realizados para avaliar a tolerância e capacidade das leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* em metabolizar açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico, mesmo na presença de inibidores naturais da etapa de pré-tratamento. A destoxificação normalmente remove compostos como furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e ácidos orgânicos, que podem prejudicar o crescimento microbiano e a fermentação. No entanto, ao utilizar o hidrolisado sem esse processo, busca-se verificar a resistência natural dessas cepas de leveduras aos inibidores, o que pode reduzir os custos e complexidade dos processos industriais.

Os ensaios em hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação foram realizados para as leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. Foram adicionadas fontes de nitrogênio ao hidrolisado, sendo 0,05 g/L de ureia, 6,1g/L de extrato de levedura, 4,8 g/L de peptona e 0,11 g/L de sulfato de amônio para a levedura *Spathaspora boniae* e 1,3 g/L de ureia, 6,1g/L de extrato de levedura, 0,19 g/L de peptona e 0,11 g/L de sulfato de amônio para levedura *Spathaspora brasiliensis*. Os frascos foram mantidos em uma incubadora agitadora a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 72 horas. Amostras foram coletadas a cada 24 horas para determinar as concentrações de células, açúcares (L-arabinose, D-glicose e D-xilose), ácido acético, etanol e xilitol, além de monitorar o pH.

4.4.2 Planejamento experimental fracionado 2⁴⁻¹ para estudo das fontes de nitrogênio pelas leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* para produção de xilitol e/ou etanol

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico da biomassa da cana-de-açúcar para avaliar o efeito das fontes de nitrogênio na produção de etanol e/ou xilitol foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Para a levedura que demonstrou resistência a compostos inibitórios na etapa anterior (item 4.3.1), o hidrolisado foi utilizado sem passar pelo processo de destoxificação. Já para a levedura que não apresentou resistência, o hidrolisado foi destoxificado antes da fermentação, a fim de garantir condições mais adequadas para seu crescimento e eficiência fermentativa. O volume de meio foi de 100 mL de hidrolisado, previamente esterilizado em autoclave (110 °C e 0,5 atm), pH ajustado para 5,5 com pHmetro de bancada e concentração inicial de células de 1 g/L. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 30°C em incubadora agitadora, por um período de 72h com amostras coletadas a cada 24 horas para determinação das concentrações de células, açúcares (L-arabinose, D-glicose e D-xilose), ácido acético, etanol e xilitol e monitoramento do pH.

A suplementação do hidrolisado hemicelulósico, com as fontes de nitrogênio ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, foi realizada de acordo com planejamento experimental fracionado 2⁴⁻¹ com três repetições no ponto central e como variável resposta foi escolhida a concentração final de xilitol ou etanol (g/L) (Tabela 3). O sinal (+) representa o nível superior, o sinal (-) representa o nível inferior e o número (0) o ponto central. Os valores dos níveis (+1 e -1) foram estabelecidos com base em dados da literatura científica, considerando concentrações utilizadas em estudos anteriores que otimizaram a produção de xilitol e etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos (112,113). A Tabela 4 mostra a matriz de planejamento experimental com as concentrações das fontes de nitrogênio em cada experimento, assim como a razão C:N. A razão C:N foi calculada de acordo com a quantidade de nitrogênio presente em cada fonte de nitrogênio (ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio) em relação a concentração de D-xilose presente no hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar.

Tabela 3. Codificação dos níveis para as variáveis ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio para produção de etanol e/ou xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de *biomassa* de cana-de-açúcar pelas leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis*.

Parâmetros (g/L)	Níveis		
	Inferior (-1)	Central 0	Superior (+1)
Ureia - CO(NH ₂) ₂	0,05	0,7	1,3
Extrato de levedura	0,23	3,1	6,1
Peptona	0,19	2,5	4,8
Sulfato de amônio - (NH ₄) ₂ SO ₄	0,11	1,5	2,9

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

Tabela 4. Matriz de Planejamento fatorial fracionado 2⁴⁻¹ com três repetições no ponto central para o estudo das variáveis: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio na produção de etanol e/ou xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.

Experimentos	Níveis Codificados				C:N**	Níveis Reais (g/L)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		Ureia (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Peptona (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	104,67	0,05	0,23	0,19	0,11
2	1	-1	-1	1	7,75	1,3	0,23	0,19	2,9
3	-1	1	-1	1	7,75	0,05	6,1	0,19	2,9
4	1	1	-1	-1	7,75	1,3	6,1	0,19	0,11
5	-1	-1	1	1	7,75	0,05	0,23	4,8	2,9
6	1	-1	1	-1	7,75	1,3	0,23	4,8	0,11
7	-1	1	1	-1	7,75	0,05	6,1	4,8	0,11
8	1	1	1	1	4,03	1,3	6,1	4,8	2,9
9*	0	0	0	0	7,75	0,7	3,1	2,5	1,5
10*	0	0	0	0	7,75	0,7	3,1	2,5	1,5
11*	0	0	0	0	7,75	0,7	3,1	2,5	1,5

*pontos centrais

** (*) A razão C:N não faz parte do planejamento experimental como variável independente.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

4.4.3 Planejamento composto central para otimização das fontes de nitrogênio para produção de xilitol e/ou etanol

Um planejamento composto central tipo face centrada foi proposto para otimização das variáveis independentes (ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio) para as leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* que apresentaram teste de curvatura significativo ($p < 0,05$). Foram adicionados 8 pontos tipo face centrada ao planejamento fracionado e mais um ponto central resultando em um total de 20 experimentos, como apresentado na Tabela 5. A concentração final de produto (g/L), foi escolhida como variável resposta para as análises. A significância de cada termo do modelo foi determinada com análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta foram realizados com base na equação do modelo para demonstrar os efeitos das variáveis independentes na resposta.

Tabela 5. Matriz de pontos tipo face centrada com uma repetição no ponto central adicionada ao Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} (Tabela 2) para formação do Planejamento Composto Central tipo Face Centrada para o estudo das variáveis: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio na produção de etanol e/ou xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.

Experimentos	Níveis codificados				C:N**	Níveis Reais			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		Ureia (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Peptona (g/L)	Sulfato de Amônio (g/L)
12	-1	0	0	0	10,09	0,05	3,1	2,5	1,5
13	1	0	0	0	6,30	1,3	3,1	2,5	1,5
14	0	-1	0	0	10,09	0,7	0,23	2,5	1,5
15	0	1	0	0	6,30	0,7	6,1	2,5	1,5
16	0	0	-1	0	10,09	0,7	3,1	0,19	1,5
17	0	0	1	0	6,30	0,7	3,1	4,8	1,5
18	0	0	0	-1	10,09	0,7	3,1	2,5	0,11
19	0	0	0	1	6,30	0,7	3,1	2,5	2,9
20*	0	0	0	0	7,75	0,7	3,1	2,5	1,5

*ponto central

** (*) A razão C:N não faz parte do planejamento experimental como variável independente.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

5 Avaliação em biorreator de bancada do desempenho fermentativo da levedura *Spathaspora boniae* em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar

5.1 Microrganismo e preparo do inóculo

O preparo do inóculo para fermentação foi realizado de acordo com o item 4.2.3 da metodologia. A levedura *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306 foi selecionada para fermentação em biorreator de bancada devido sua capacidade de fermentar em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação.

5.2 Características do biorreator agitado

O processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar pela levedura *S. boniae* foi realizado em um fermentador agitado (STR), modelo BioFlo 2000 da New Brunswick Scientific, com capacidade nominal de 5 litros (Figura 8). O fermentador foi equipado com sensores de pH (Mettler Toledo), temperatura, oxigênio dissolvido (DO) (Mettler Toledo) e CO₂ (SCD41), uma chicana removível, um eixo agitador e um condensador de inox.

No presente trabalho, foi desenvolvido um sistema para o monitoramento de CO₂ em processos de fermentação. O sistema consistiu em um sensor de CO₂ (SCD41) conectado à placa Arduino (ESP32), acoplado à parte interna da tampa de um frasco Schott de 250 mL. A tampa foi adaptada com duas aberturas: uma para a entrada de ar, conectada à saída de ar do reator, e outra para a saída de ar, garantindo o fluxo de gás. O monitoramento do CO₂ foi realizado em tempo real durante todo o experimento, permitindo registrar as concentrações de gás ao longo do processo. A Figura 7 ilustra o sistema de detecção de CO₂. A Figura 7a mostra o sistema montado e a Figura 7b mostra a parte interna da tampa contendo o sensor de CO₂. A operação foi conduzida em modo descontínuo, com ar comprimido sendo adicionado continuamente durante o processo de fermentação.

a)



b)

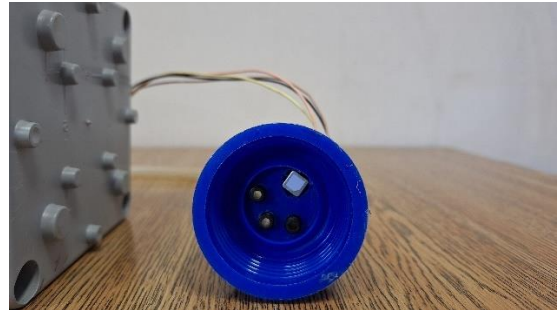


Figura 7. Sensor de CO₂ utilizado no biorreator de bancada.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).



Figura 8. Biorreator Bioflo 2000, New Brunswick Scientific.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

5.3 Otimização da agitação e vazão de ar para produção xilitol e/ou etanol

5.3.1 Condições de fermentação

As fermentações foram realizadas em um reator de bancada modelo BioFlo 2000, utilizando 1,5 L de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação. O meio foi suplementado com fontes otimizadas de nitrogênio, incluindo 0,58 g/L de ureia, 5,26 g/L de extrato de levedura, 2,82 g/L de peptona e 1,3 g/L de sulfato de amônio. Durante o processo, a temperatura foi mantida constante a 30 °C, com monitoramento contínuo de pH, oxigênio dissolvido e CO₂.

5.3.2 Planejamento experimental

O efeito da agitação e da vazão de ar na bioconversão de D-xilose em xilitol e/ou etanol foi avaliado por meio de um planejamento composto central rotacional (DCCR). Esse planejamento incluiu duas repetições no ponto central e quatro pontos axiais. Os níveis das variáveis testadas estão apresentados na Tabela 6, enquanto os níveis codificados e reais utilizados no planejamento estão detalhados na Tabela 7.

5.3.3 Coleta e análise de amostras

Para o acompanhamento da fermentação, amostras de 5 mL foram retiradas a cada 12 horas. Essas amostras foram analisadas quanto ao crescimento celular, concentração de açúcares (L-arabinose, D-glicose e D-xilose), produção de ácido acético, etanol e xilitol, além de verificação de possíveis contaminantes.

5.3.4 Análise de contaminação

As amostras coletadas foram submetidas à coloração com Safranina para verificar a presença de contaminantes. Uma pequena alíquota foi espalhada em lâminas de microscopia e fixada ao calor, passando brevemente pela chama de um bico de Bunsen para aderir as células à superfície. Após isso, a solução de Safranina foi aplicada à amostra por 60 segundos, e o excesso foi removido com água destilada.

As células coradas foram observadas em um microscópio Olympus Optical (CX40RF100).

Tabela 6. Codificação dos níveis para as variáveis agitação e vazão de ar para produção de xilitol e/ou etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae*.

Parâmetros	Níveis				
	Axial	Inferior	Central	Superior	Axial
	-1,41	-1	0	1	1,41
rpm	97	140	245	350	393
vvm	0,3	0,5	1	1,5	1,7

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

Tabela 7. Matriz de Planejamento composto central rotacional com duas repetições no ponto central e quatro pontos axiais para o estudo das variáveis agitação e vazão de ar, na produção de xilitol e/ou etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae*.

Experimentos	Níveis codificados		Níveis Reais	
	X ₁	X ₂	rpm	vvm
1	-1	-1	140	0,5
2	1	-1	350	0,5
3	-1	1	140	1,5
4	1	1	350	1,5
5	0	0	245	1,0
6	0	0	245	1,0
7	-1,41	0	97	1,0
8	1,41	0	393	1,0
9	0	-1,41	245	0,3
10	0	1,41	245	1,7

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

6 Atividade enzimática das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)

6.1 Rompimento celular

As células obtidas nos experimentos foram coletadas por centrifugação a 2057 xg por 5 minutos, e ressuspensas em tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 7,2). A suspensão final foi armazenada em um freezer a -20°C. O método de rompimento celular foi

realizado de acordo a metodologia proposta por Gurpilhares *et al.* (135). As células congeladas em tampão fosfato, foram descongeladas e misturadas com pérolas de vidro na proporção de 3 ml de suspensão celular para 3 ml de pérolas de vidro. A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos, com pausas de 30 segundos em banho de gelo a cada minuto. Em seguida, foram centrifugadas a 6.725 xg por 15 minutos a 5°C e recuperado o sobrenadante, que foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas XR e XDH.

6.2 Atividade enzimática

As atividades de XR e XDH foram avaliadas de acordo com o método descrito por Alexander (136), com modificações introduzidas por Sene *et al.* (137). A atividade da xilose redutase (XR) foi medida pelo decréscimo da absorbância a 340 nm devido à oxidação do NADPH, usando D-xilose como substrato, enquanto a atividade da XDH foi avaliada pelo aumento da absorbância a 340 nm decorrente da redução do NAD⁺, utilizando xilitol como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a redução ou oxidação de 1 µmol de cofator por minuto a temperatura ambiente, utilizando o coeficiente de extinção molar de 6220 M⁻¹.cm⁻¹ para os cofatores NADPH e NAD⁺. As atividades específicas foram expressas em U/mg de proteína.

O meio padrão de reação para a XR consistiu em 200 µL de extrato livre de células, 570 µL de água destilada, 150 µL de β-mercaptoetanol (0,1 M), 80 µL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,2), 100 µL de NADPH (1,2 mM) e 200 µL de D-xilose (0,5 M), totalizando 1,3 mL. Para a XDH, o meio padrão de reação incluiu 100 µL de extrato livre de células, 550 µL de água destilada, 150 µL de β-mercaptoetanol (0,1 M), 200 µL de TRIS (0,5 M, pH 8,6), 150 µL de NAD⁺ (1,26 mM) e 150 µL de xilitol (0,5 M), também totalizando 1,3 mL.

6.3 Determinação da proteína solúvel

A concentração de proteína no extrato livre de células foi determinada pelo método de Bradford (138) utilizando albumina bovina cristalizada (BSA) como padrão e o reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G-250) como corante. As leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro a 595 nm.

7 Métodos analíticos

7.1 Determinação da concentração celular

A concentração de células do meio fermentativo foi determinada através da leitura em espectrofotômetro a 600nm para ser correlacionada com a massa seca de células em g/L com auxílio de uma curva padrão previamente definida para cada levedura (Apêndice 1).

7.2 Determinação de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado de acordo com a metodologia sugerida por Gouveia *et al.*, (2009). Alíquotas de 2 mL das amostras de hidrolisado foram colocadas em tubos de ensaio de vidro e alcalinizadas com uma solução de hidróxido de sódio 6 M até atingir pH 12. Em seguida, essas amostras alcalinizadas foram diluídas, e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 280 nm. A concentração (g L^{-1}) de fenóis totais foi determinada utilizando as Equações. 1 e 2.

$$\text{Fenóis totais} = 0.04187 \times (A - A_{pd}) - 0.0003279 \quad (1)$$

$$A_{pd} = C_F \times \varepsilon_F - C_{\text{HMF}} \times \varepsilon_{\text{HMF}} \quad (2)$$

Onde A é a absorbância da solução a 280 nm, A_{pd} é a absorbância dos produtos de decomposição do açúcar (furfural e 5-hidroximetilfurfural) a 280 nm, C_F e C_{HMF} são as concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural (g/L) determinadas por

cromatografia líquida de alta eficiência, ϵ_F e ϵ_{HMF} são as absorvidades do furfural e do 5-hidroximetilfurfural (146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹, respectivamente).

7.3 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, etanol e xilitol

As concentrações de L-arabinose, D-glicose, D-xilose, xilitol, etanol, ácido acético, ácido fórmico para a caracterização da biomassa, antes e após pré-tratamento, e acompanhamento dos experimentos fermentativos, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras, foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18, injetadas (volume de injeção de 20 µL) em um Cromatógrafo Líquido Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração RID. Durante a cromatografia, foi utilizada uma coluna analítica BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 60°C, com a fase móvel H₂SO₄ 0,005 M a vazão de 0,6 mL/min.

7.4 Determinação de compostos fenólicos

Foi utilizado o mesmo HPLC para a análise de furfural, 5-HMF, ácido gálico, ácido 2,4-diidroxibenzóico, ácido cafeico, siringaldeído e ácido benzóico, com volume de injeção de 10 µL. O equipamento estava equipado com um detector ultravioleta UV-VIS (SPD-20A) ajustado para 276 nm, uma coluna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) mantida a 30°C, e uma fase móvel composta por acetonitrila e água na proporção de 1:8, contendo 1% de ácido acético, com uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min.

7.5 Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) foi determinado utilizando o método de "gassing-out", conforme descrito por Pirt, (1975). Primeiramente, o meio de cultivo, sem a presença de células, foi desgaseificado com nitrogênio para eliminar o oxigênio dissolvido. Em seguida, o meio foi agitado e aerado

conforme a vazão estabelecida, enquanto se monitorava o aumento da concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo. A partir da integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (equação 3), chegou-se à relação expressa na equação 4.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (3)$$

$$\ln \left(1 - \frac{C}{C^*} \right) = -k_L a \times t \quad (4)$$

Onde C/C^* representa a leitura do eletrodo, que é a fração da concentração de oxigênio dissolvido em relação à concentração de saturação. O valor de $k_L a$ em h^{-1} pode ser determinado a partir do gráfico do logaritmo de $(1 - C/C^*)$ em função do tempo.

7.6 Determinação dos parâmetros fermentativos para processos descontínuos de fermentação

7.6.1 Fator de conversão de açúcares em etanol ou xilitol

O fator de conversão $Y_{p/s}$ expressa a massa de etanol ou xilitol produzida por massa de açúcares consumidos (D-xilose + D-glicose), em gramas, sendo calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (5)$$

Onde o P_f e P_i correspondem a concentração final e inicial de etanol ou xilitol (g/L) e S_i e S_f correspondem a concentração inicial e final de açúcares em g/L. Para o caso do xilitol foi considera só a D-xilose.

7.6.2 Produtividade volumétrica em etanol ou xilitol (g/L.h)

A produtividade volumétrica Q_P expressa em gramas de produto por litro por hora, sendo calculada como a seguinte equação:

$$Q_p = \frac{P_f - P_i}{t} \quad (6)$$

Onde P_i corresponde a concentração inicial de etanol ou xilitol e P_f é a concentração final de etanol ou xilitol, sendo o t referente ao tempo de fermentação.

7.6.3 Fator de conversão de açúcares em biomassa celular

O fator de conversão de $Y_{X/S}$ expressa a massa de células produzida por massa de açúcares consumidos em gramas, é determinado pela seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad (7)$$

Onde X_f e X_i correspondem a concentração final e inicial de células livres e S_f e S_i correspondem a concentração final e inicial de açúcares consumidos.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Caracterização química da biomassa da cana-de-açúcar

A Tabela 8 mostra os resultados obtidos da caracterização da biomassa (bagaço/palha) da cana-de açúcar “in natura” e após o pré-tratamento (celulignina). Os resultados obtidos da amostra “in natura” foram de 36,56% de celulose, 28,38% de hemicelulose, 22,02% de lignina e 2,31% de cinzas. Esses resultados estão de acordo com os dados que são encontrados na literatura, como pode se observar na Tabela 9. As diferenças observadas entre os dados obtidos (Tabela 9) da biomassa e os encontrados na literatura ocorrem por conta de alguns fatores como, a genética da planta, as condições de cultivo, estocagem e processamento, bem como métodos empregados para a análise físico-química (141). Especificamente, as concentrações de celulose e hemicelulose obtidas neste trabalho estão dentro da faixa reportada por outros autores, ainda que ligeiras variações sejam evidentes. Por exemplo, a celulose variou de 32,92% a 45,02%, enquanto a hemicelulose variou de 26,63% a 29,53% entre os diferentes estudos. A lignina e as cinzas também apresentaram ampla variação, o que reflete as influências mencionadas. Além disso, o valor de cinzas encontrado no presente estudo (2,31%) está abaixo de algumas referências, como a reportada por Pérez *et al.* (142) com 10,46%. Isso pode indicar diferenças nos métodos de processamento ou na composição inicial do material analisado.

As porcentagens de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas obtidas da biomassa pós-tratamento (celulignina) foram de 50,37, 5,78, 33,55 e 3,08 %, respectivamente. E ao comparar a porcentagem de hemicelulose da biomassa “in natura” com a celulignina observa-se uma remoção de 80% da hemicelulose, isso mostra que o processo de hidrólise ácida foi eficiente na solubilização dessa fração polimérica.

Tabela 8. Caracterização química da biomassa de cana-de-açúcar e após pré-tratamento

Componentes lignocelulósicos (%)	Biomassa “in natura”	Biomassa após pré-tratamento
Celulose	36,56 $\pm$ 0,25	50,37 $\pm$ 0,22
Hemicelulose	28,38 $\pm$ 0,34	5,78 $\pm$ 0,04
Lignina	22,02 $\pm$ 0,62	33,55 $\pm$ 0,38
Cinzas	2,31 $\pm$ 0,21	3,08 $\pm$ 0,02
Extrativos	11,37 $\pm$ 1,58	--

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

Tabela 9. Composição química percentual do bagaço da cana-de-açúcar e comparação com os dados da literatura.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referências
Mistura bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)	36,56	28,38	22,02	2,31	Presente trabalho (143)
Mistura bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)	37,00	27,58	22,02	5,59	(142)
Mistura bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)	35,99	29,53	19,85	10,46	(144)
Mistura bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)	45,02	26,63	23,08	3,50	(145)
Mistura bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1)	32,92	26,65	28,62	4,78	

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

8.1.1 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar

A Tabela 10 lista os componentes do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar obtido após pré-tratamento. Com concentração final de 29,29 g/L, verifica-se que a D-xilose foi o açúcar produzido em maior quantidade após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, o que favorece sua utilização em experimentos de fermentação utilizando microrganismos que assimilam naturalmente a D-xilose. A solubilização da hemicelulósica é favorecida neste processo de pré-tratamento porque ocorre em altas temperaturas com o auxílio do ácido sulfúrico, que, ao entrar em contato com a biomassa, estimula a solubilização da fração hemicelulósica em D-

xilose e outros açúcares (146). A proporção de açúcares obtida foi de aproximadamente 1:7:1 de D-glicose, D-xilose e L-arabinose, com concentração total de açúcares de 33 g/L. O balanço do processo inclui dados de entrada (20 kg de biomassa de cana, 198,4 kg de água e 1,8 kg de ácido sulfúrico) e saídas, que foram de aproximadamente 8,3 kg de celulignina e 187,21 kg de hidrolisado hemicelulósico. Ao final do processo, a mistura foi cuidadosamente filtrada para separar os componentes líquido e sólido. A perda média do processo foi de 24,70 kg, o que equivale a 11,23%.

Além disso, foram determinados produtos químicos tóxicos para microrganismos, incluindo ácido acético (3,77 g/L) produzido pela clivagem de grupos acetil em hemicelulósicos, 5-hidroxi metilfurfural (346,96 mg/L) produzido pela clivagem de hexoses, furfural (612,33 mg/L) produzidos pela desidratação das pentoses, e fenóis totais (1,67 g/L) produzidos pela degradação da lignina. O efeito dos inibidores nos processos metabólicos microbianos é influenciado por uma variedade de fatores. Em particular, quando o hidrolisado serve como fonte de carbono, a sua composição química - incluindo aspectos como concentração inicial de açúcares, pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio - tem um impacto significativo na atividade microbiana. No entanto, o fator dominante nesta dinâmica é a natureza única do próprio microrganismo, caracterizada pelas suas características inerentes e adaptabilidade. Isto ressalta a importância de uma compreensão profunda das características biológicas e fisiológicas únicas do microrganismo para uma avaliação completa do impacto dos inibidores nas atividades metabólicas (147).

A Tabela 10 mostra que após a etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar, as concentrações de ácido acético, 5-hidroxi metilfurfural, furfural e fenóis totais foram reduzidas em 9,81%, 86,26%, 91,92% e 80,82%, respectivamente. Diferentemente do que foi observado no presente estudo, outros pesquisadores observaram diferentes quantidades de 5-hidroxi metilfurfural (110 mg/L) e furfural (250 mg/L) no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, com concentrações diminuídas em 63 e 20 %, respectivamente, após destoxificação por processo de evaporação (148). Nouri *et al.* (149) obtiveram maior concentração de furfural (830 mg/L) e fenólicos (1017 mg/L) no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar do que no presente estudo, com reduções de 66 e 49%, respectivamente, após a etapa de destoxificação. pelo processo de *overliming*. Outros produtos químicos inibitórios encontrados no

hidrolisado hemicelulósico, como ácido gálico, ácido 2,4-dihidroxibenzóico, ácido cafeico, siringaldeído e ácido benzóico, também foram reduzidos após a etapa de destoxificação, conforme indicado na Tabela 10. Furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) são os aldeídos furânicos mais comuns encontrados em hidrolisados de lignocelulose, com toxicidade resultante da inibição de enzimas glicolíticas e fermentativas (incluindo piruvato, acetaldeído e álcool desidrogenases) de maneira dose-dependente e a formação de quebras de fita simples de dupla- fita de DNA (150). Compostos fenólicos, como ácidos (ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido serínico), álcoois (guaiacol, catecol e álcool vanílico) e aldeídos (vanilina, aldeído serínico e 4-hidroxilbenzaldeído), foram principalmente formado durante a degradação da lignina no pré-tratamento de biomassa usando métodos à base de ácido, hidrotérmico, alcalino e oxidativo (151). Esses compostos fenólicos têm o potencial de prolongar consideravelmente a fase lag enquanto diminuem a síntese de etanol, ácido láctico, xilitol e hidrogênio por meio da fermentação (152).

As concentrações de ácido acético e furfural encontradas no hidrolisado indicam que as condições de pré-tratamento utilizadas foram favoráveis para solubilizar os açúcares contidos na fração hemicelulósica, causando pouca degradação. Visto que, em condições ácidas típicas de processos como o pré-tratamento ácido, as pentoses resultantes da hidrólise dos hemicelulósicos sofrem desidratação, formando furfural, enquanto as hexoses são desidratadas a 5-hidroximetilfurfural (HMF).O ácido acético, que não é produto da degradação de açúcares, mas sim resultado da hidrólise dos grupos acetila dos hemicelulósicos, é outro ácido encontrado nos licores dos tratamentos ácidos da biomassa (151).

Tabela 10. Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar obtido pelo pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e detoxificado.

Componentes (g L⁻¹)	Hidrolisado	Hidrolisado Destoxificado
D-xilose	26,29	23,5
D-glicose	3,79	3,2
L-arabinose	3,58	3,23
Ácido acético	3,77	3,4
Fenóis totais	1,67	0,32
5-hidroximetilfurfural	346,96*	47,68*
Furfural	612,33*	49,47*
Ácido gálico	22,60*	6,97*
Ácido 2,4-di-hidroxibenzóico	40,16*	4,29*
Ácido cafeico	6,86*	1,28*
Siringaldeído	51,29*	1,33*
Ácido benzóico	2,81*	0,74*

(*) mg/L

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

8.2 Avaliação da capacidade fermentativa das leveduras do gênero *Spathaspora* em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar

8.2.1 Fermentação em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação

O objetivo desta etapa do projeto foi avaliar o perfil fermentativo em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar para a produção de xilitol e/ou etanol pelas leveduras *Spathaspora boniae*, *Spathaspora brasiliensis*.

Na Tabela 11 pode-se observar que apenas a levedura *Spathaspora boniae* foi capaz de apresentar uma boa capacidade fermentativa no hidrolisado sem destoxificar. A concentração de xilitol obtida 8,37 g/L ($Y_{P/S} = 0,348$ g/g, $Q_P = 0,116$ g/L.h) foi observada com 0,05 g/L de ureia, 6,1g/L de extrato de levedura, 4,8 g/L de peptona e 0,11 g/L de sulfato de amônio), sendo a produção de etanol de 4,15 g/L ($Y_{P/S} = 0,173$ g/g, $Q_P = 0,058$ g/L.h), isso mostra que a levedura foi capaz de resistir aos compostos inibitórios presentes no hidrolisado. Na condição de 1,3 g/L de ureia, 6,1g/L de extrato de levedura, 0,19 g/L de peptona e 0,11 g/L de sulfato de amônio a levedura

Spathaspora brasiliensis, também, não foi capaz de produzir etanol e xilitol e teve um crescimento de 2,05 g/L (Tabela 11). Assim, para essa levedura os experimentos foram realizados usando o hidrolisado hemicelulósico destoxificado, uma abordagem que pode contribuir para a redução de custos ao exigir menos reagentes e equipamentos para o processo de destoxificação.

Tabela 11. Teste de produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificar pelas leveduras *Spathaspora boniae*, *Spathaspora brasiliensis*.

Leveduras	Etanol			Xilitol			Massa celular (g/L)
	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/Lh)	Concentração Final (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/Lh)	Concentração Final (g/L)	
<i>Spathaspora boniae</i>	0,173	0,058	4,15	0,348	0,116	8,37	6,11
<i>Spathaspora brasiliensis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,05

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

8.2.2 Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na fermentação pela levedura *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para os 20 experimentos de fermentação realizados com a levedura *Spathaspora boniae* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação. Inicialmente, foram realizados 11 experimentos de fermentação que correspondem ao planejamento experimental fracionado 2⁴⁻¹, sendo verificada curvatura (p<0,05) significativa no modelo. Deste modo, foram adicionados ao planejamento mais 8 pontos tipo face centrada e um ponto central para que, assim, fosse obtido um planejamento composto central tipo face centrada com 20 experimentos, como mostra a Tabela 8.

Na Tabela 12 pode-se observar que a levedura *Spathaspora boniae* foi capaz de produzir etanol e xilitol na maioria dos experimentos, com maior destaque para a produção de xilitol.

Tabela 12. Matriz do planejamento composto central 2^{4-1} para o estudo variáveis independentes: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, para a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar usando a levedura *Spathaspora boniae*.

Experimentos	Variáveis independentes					Variáveis Respostas					
	Ureia	E. L.	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	C:N*	Etanol		Xilitol			
	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)		Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/Lh)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/Lh)	Xilitol (g/L)
1	0,05	0,23	0,19	0,11	104,67	0,123	0,010	0,74	0,00	0,00	0,00
2	1,3	0,23	0,19	2,9	7,75	0,158	0,018	1,27	0,00	0,00	0,00
3	0,05	6,1	0,19	2,9	7,75	0,173	0,055	3,99	0,330	0,106	7,63
4	1,3	6,1	0,19	0,11	7,75	0,182	0,053	3,82	0,356	0,103	7,44
5	0,05	0,23	4,8	2,9	7,75	0,202	0,032	2,28	0,030	0,005	0,33
6	1,3	0,23	4,8	0,11	7,75	0,211	0,028	2,03	0,033	0,004	0,32
7	0,05	6,1	4,8	0,11	7,75	0,173	0,058	4,15	0,348	0,116	8,37
8	1,3	6,1	4,8	2,9	4,03	0,186	0,059	4,25	0,239	0,076	5,47
9	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,184	0,061	4,39	0,275	0,092	6,59
10	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,187	0,063	4,51	0,269	0,090	6,47
11	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,190	0,065	4,68	0,262	0,090	6,45
12	0,05	3,1	2,5	1,5	10,09	0,152	0,039	2,83	0,386	0,100	7,20
13	1,3	3,1	2,5	1,5	6,30	0,130	0,046	3,34	0,367	0,131	9,40
14	0,7	0,23	2,5	1,5	10,09	0,200	0,037	2,67	0,078	0,015	1,05
15	0,7	6,1	2,5	1,5	6,30	0,157	0,054	3,86	0,437	0,149	10,74
16	0,7	3,1	0,19	1,5	10,09	0,101	0,049	3,49	0,180	0,086	6,23
17	0,7	3,1	4,8	1,5	6,30	0,154	0,057	4,10	0,328	0,121	8,71
18	0,7	3,1	2,5	0,11	10,09	0,161	0,053	3,79	0,338	0,111	7,96
19	0,7	3,1	2,5	2,9	6,30	0,171	0,062	4,44	0,301	0,108	7,81
20	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,180	0,065	4,66	0,295	0,106	7,66

(*) A razão C:N não faz parte do planejamento experimental como variável independente.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

A produção de xilitol pela *Spathaspora boniae* foi positivamente influenciada pelo aumento da concentração de extrato de levedura no hidrolisado hemicelulósico da biomassa da cana-de-açúcar. No experimento 15 (Tabela 12), em que a levedura apresentou a maior produção de xilitol de 10,74 g/L ($Y_{P/S} = 0,437$ g/g, $Q_P = 0,149$ g/Lh) com 97,05% de consumo de açúcar e produção de etanol de 3,86 g/L ($Y_{P/S} = 0,157$ g/g, $Q_P = 0,054$ g/Lh), o hidrolisado foi suplementado com extrato de levedura no nível mais alto e os outros fatores foram ajustados ao nível 0 (6,1 g/L de extrato de levedura, 0,7 g/L de ureia, 2,5 g/L de peptona e 1,5 g/L de sulfato de amônio, [C:N = 6]). Comparando o experimento 14 (1,05 g/L de xilitol, [C:N = 10]) com o experimento 15, pode-se confirmar que aumentar o extrato de levedura de 0,23 para 6,1 g/L, enquanto as outras fontes de nitrogênio permanecem fixas no nível 0, aumenta a produção de xilitol em dez vezes (Tabela 12). Esses resultados indicam que o extrato de levedura tem um efeito significativo na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa

de cana-de-açúcar pela *S. boniae*. O efeito positivo da adição de extrato de levedura ao hidrolisado também foi relatado por Carvalho *et al.* (114), que obtiveram um aumento no rendimento de xilitol ($Y_{P/S} = 0,57 \text{ g/g}$) e produtividade ($Q_P = 0,51 \text{ g/Lh}$) pela levedura *Debaryomyces hansenii* ao suplementar o hidrolisado hemicelulósico de grão de cerveja sem destoxificação com 6 g/L de extrato de levedura, em fermentação realizada em um frasco Erlenmeyer com volume final de 50 mL a 30°C e 150 rpm. Outro estudo encontrou que o extrato de levedura teve um efeito positivo ao cultivar *Candida tropicalis* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar sem destoxificação com extrato de levedura (1,7 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,4 g/L) em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio a 30°C, com concentração de xilitol e bioconversão de D-xilose em xilitol de 6,8 g/L e 0,36 g/g, respectivamente (153). É importante notar que não há relato sobre a capacidade fermentativa da levedura *Spathaspora boniae* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação. Em fermentações realizadas em meio sintético (1% extrato de levedura, 2% peptona) contendo D-xilose (30-40 g/L), D-D-glicose (30-40 g/L), a conversão de D-xilose em xilitol foi de 0,46 g/g, com um acúmulo de 12,6 g/L para a levedura *S. boniae* (67). O valor de conversão obtido neste estudo foi semelhante ao valor obtido no trabalho atual com a levedura em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação, indicando que a levedura é capaz de manter características de bioconversão em xilitol mesmo na presença de compostos inibitórios presentes no hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar. Soares *et al.* (154) investigaram os efeitos sinérgicos de inibidores em *Spathaspora passalidarum* e relataram que ácido acético (1,5 g/L), furfural (0,5 g/L) e 5-HMF (0,5 g/L) inibiram significativamente o crescimento celular, consumo de D-xilose e produção de etanol.

Como mostrado na Tabela 12, todas as fontes de nitrogênio estavam nos níveis mais altos no experimento 8 (1,3 g/L de ureia, 6,1 g/L de extrato de levedura, 4,8 g/L de peptona e 2,9 g/L de sulfato de amônio). Assim, a levedura consumiu 99,3% dos açúcares neste experimento, produzindo 5,47 g/L de xilitol e 4,25 g/L de etanol, indicando que, quando o nitrogênio está mais disponível ($\text{C:N} = 4$) no hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar, xilitol e etanol são produzidos como coprodutos, uma vez que as concentrações de ambos possuem valores próximos.

Nos experimentos realizados com as menores concentrações de extrato de levedura (0,23 g/L; Experimentos 1, 2, 5, 6 e 14 – Tabela 12) observou-se o menor

consumo de açúcares (abaixo de 50 %), bem como menor formação de xilitol (0 – 1,05 g/L) e etanol (0,64 – 2,67 g/L).

O menor consumo dos açúcares D-glicose e D-xilose (22,66%) pela *S. boniae* foi observado no experimento 1, quando todas as fontes de nitrogênio estavam nas suas concentrações mais baixas (0,05 g/L de ureia, 0,23 g/L de extrato de levedura, 0,19 g/L de peptona, 0,11 g/L de sulfato de amônio, [C:N = 104]), resultando em baixo crescimento celular (3,21 g/L) e nenhuma produção de xilitol ou etanol pela levedura. O experimento 2, com as maiores concentrações de ureia e sulfato de amônio e as menores concentrações de extrato de levedura e peptona (C:N = 8), não favoreceu a produção de xilitol e etanol, mas o crescimento celular (4,86 g/L) foi aumentado, indicando que ureia e sulfato de amônio foram insuficientes para *S. boniae* produzir etanol e xilitol. Outras pesquisas mostraram que a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar com apenas uma fonte de nitrogênio inorgânico, como sulfato de amônio (2 g/L), não foi suficiente para aumentar a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* (155).

O desempenho fermentativo da *S. boniae* no hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar (experimento 15) também pode ser observado na Figura 10. O consumo de D-glicose foi favorecido durante as primeiras 48 horas de fermentação, enquanto a maior quantidade de D-xilose foi consumida após 48 horas, o que resultou em um aumento na produção de xilitol. Este resultado sugere que a presença de D-glicose pode inibir ou atrasar o consumo de D-xilose por *S. boniae*. Este efeito foi estudado na espécie *Spathaspora passalidarum*, e a presença de D-glicose inibiu o consumo de D-xilose (156). Outro estudo indicou que a presença de D-glicose pode afetar o metabolismo de D-xilose em *S. passalidarum* ocupando transportadores e prevenindo a difusão facilitada de D-xilose, que provavelmente é o único tipo de transporte de D-xilose sob condições anaeróbicas (73).

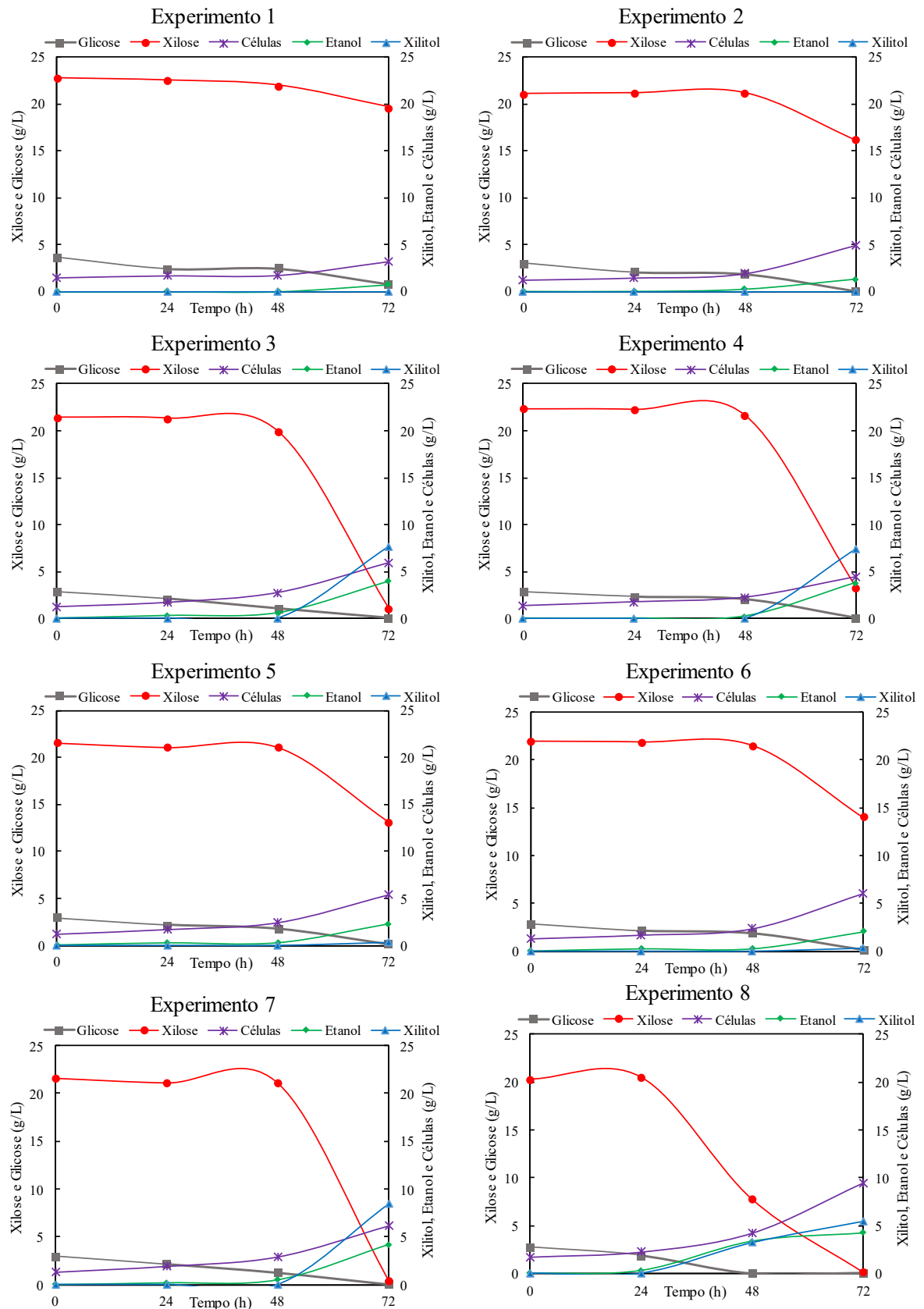


Figura 9. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central (Tabela 12) para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 1 ao 8.

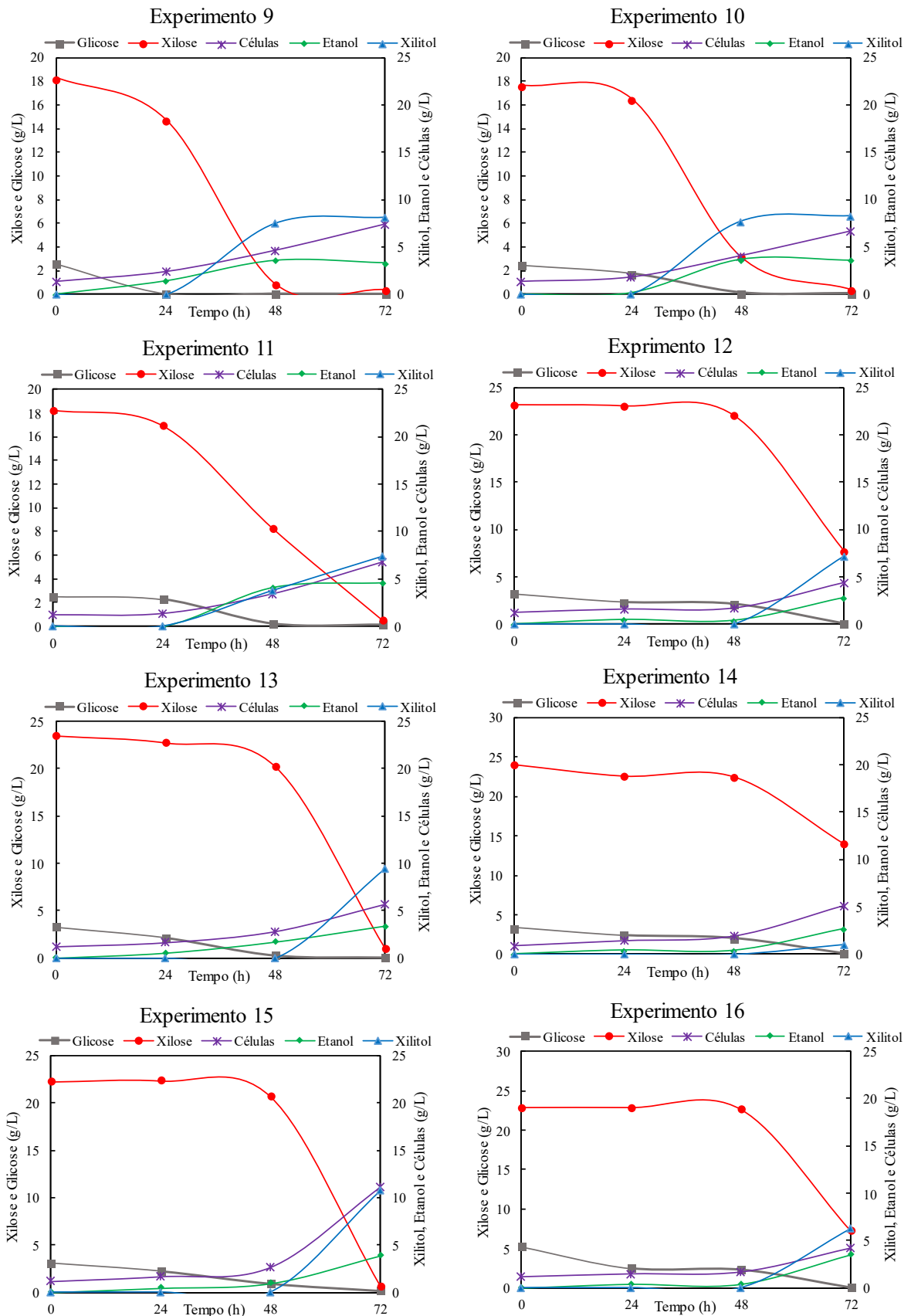


Figura 10. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central (Tabela 12) para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 9 ao 16.

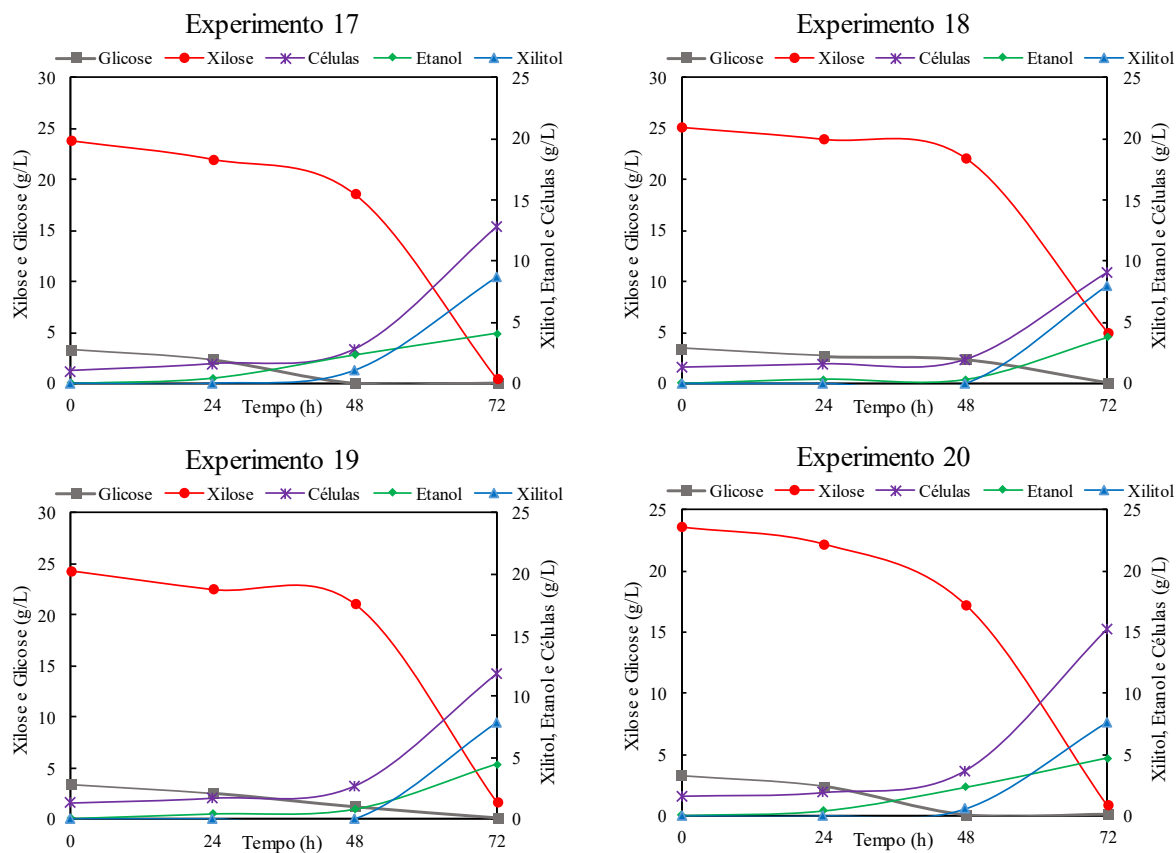


Figura 11. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central (Tabela 12) para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 17 ao 20.

Em relação aos demais açúcares presentes no hidrolisado é importante destacar que a *Spathaspora boniae* pode assimilar a L-arabinose. O máximo consumo de L-arabinose observado foi de 60% obtido no experimento 8. O uso da L-arabinose poderia estar associado à enzima D-xilose redutase, que pode converter a L-arabinose em arabitól (XR) (157). No entanto, o arabitól não foi quantificado no presente trabalho. Além disso, não foi observado o consumo de celobiose pela levedura, as concentrações permaneceram constantes ao longo dos experimentos de fermentação (dados não apresentados). Também foi verificado que a *Spathaspora boniae* foi capaz de assimilar ácido acético presente no hidrolisado, resultando em um aumento do pH do meio de fermentação, como mostra a Figura 12. Possivelmente, a quantidade de ácido acético presente no meio não interferiu na formação de xilitol pela levedura *Spathaspora boniae*. A levedura *Candida guilliermondii* em hidrolisado

hemicelulósico contendo D-xilose (30 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L) e extrato de farelo de arroz (20 g/L) com 4 g/L de ácido acético (pH 5,0) não teve seu metabolismo afetado significativamente havendo a assimilação de D-xilose e a formação de xilitol (48).

Como pode ser observado na Tabela 12, a razão C/N, também, foi um parâmetro avaliado na produção de etanol e xilitol pela levedura *Spathaspora boniae*. Na Tabela apresentada, foram utilizadas 5 razões C/N distintas que variam de valores elevados, como 104,67, até proporções mais moderadas, 7,75. Estas variações refletem diferentes níveis de disponibilidade de nitrogênio para o microrganismo.

No experimento 1 foi utilizada a maior razão C/N de 104,67, ou seja, possui a menor quantidade de nitrogênio. Esse experimento resultou no menor crescimento celular, não foi obtida a produção de xilitol e apresentou uma baixa produção de etanol. Isso mostra que para a levedura *Spathaspora boniae* em baixa quantidade de nitrogênio (C/N = 104,67) não favorece o crescimento e, conseqüentemente, a produção de etanol e xilitol. O mesmo comportamento foi observado por Júnior *et al.* (158), que ao aumentar a razão C/N levou a uma diminuição na taxa de crescimento específica da levedura *Rhodotorula toruloides*.

A razão C/N que favoreceu a máxima produção de etanol foi observada nos experimentos que correspondem ao ponto central do planejamento experimental (Experimentos 9,10, 11 e 20). Nesses experimentos foi utilizada a razão C/N de 7,75 e observa-se um rendimento em termos de $Y_{P/S}$ de etanol (0,180–0,190) e uma produtividade (QP) maior de etanol (0,061-0,065). Diminuir a razão C/N para valor mais equilibrado entre as fontes de nitrogênio favoreceu a produção de etanol pela levedura *Spathaspora boniae*.

Embora a razão C/N de 7,75 tenha sido utilizada em outros experimentos, as concentrações das fontes de nitrogênio variaram. Isso evidencia que tanto o tipo quanto a quantidade de nitrogênio são fatores determinantes para a produção de etanol por *S. boniae*. Como pode ser observado no experimento 2 que utilizou a razão de 7,75 com maiores quantidades de ureia e sulfato de amônio e menores quantidades de extrato de levedura e peptona, foi obtido uma menor produção de etanol 1,27 g/L.

A produção de xilitol é favorecida em condição com uma razão C/N diferente daquela ideal para o etanol. Nos experimentos 13 e 15, observa-se que uma proporção mais alta de nitrogênio (C/N em torno de 6,30) resultou em uma maior produção de xilitol ($Y_{P/S}$ de 0,367 e 0,437 g/g), indicando que a suplementação de nitrogênio em

quantidades moderadas pode aumentar significativamente a produção de xilitol. Assim como a produção de etanol, para o xilitol o tipo de nitrogênio e a quantidade influenciam na produção. Como pode ser observado no experimento 17 foi obtido 8,71 g/L de xilitol ($Y_{P/S}$ de 0,328 g/g) e também foi utilizado uma razão de 6,30. O trabalho realizado por Silva *et al.* (159) investigou a formação de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio. As fontes de nitrogênio utilizadas no estudo para manter a razão C/N em 25,6 foram sulfato de amônio $((NH_4)_2SO_4)$, cloreto de amônio (NH_4Cl) e ureia. O artigo relata que, independentemente do tipo de fonte de nitrogênio empregada, a produção de xilitol foi eficiente ($Y_{P/S} = 0,71 - 0,74$ g/g). Além disso, os autores concluem que a adequação da fonte de nitrogênio para a produção de xilitol varia conforme a espécie de microrganismo utilizada.

A partir desses resultados, pode-se destacar que *S. boniae* foi capaz de assimilar açúcares do hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar não destoxificado e converter açúcares em xilitol como produto principal e etanol como subproduto, mostrando que *S. boniae* é resistente aos compostos inibitórios encontrados no hidrolisado, como furfural e ácido acético. Ácidos orgânicos, furfuraldeído e compostos fenólicos liberados durante o pré-tratamento de biomassa hemicelulósica podem inibir o metabolismo microbiano dependendo da concentração, danificando membranas celulares, diminuindo o pH intracelular e inibindo enzimas metabólicas centrais, resultando em uma fase lag prolongada, taxas de fermentação reduzidas (consumo de açúcar e formação de produtos) e tolerância reduzida à concentração de etanol, entre outros efeitos (160).

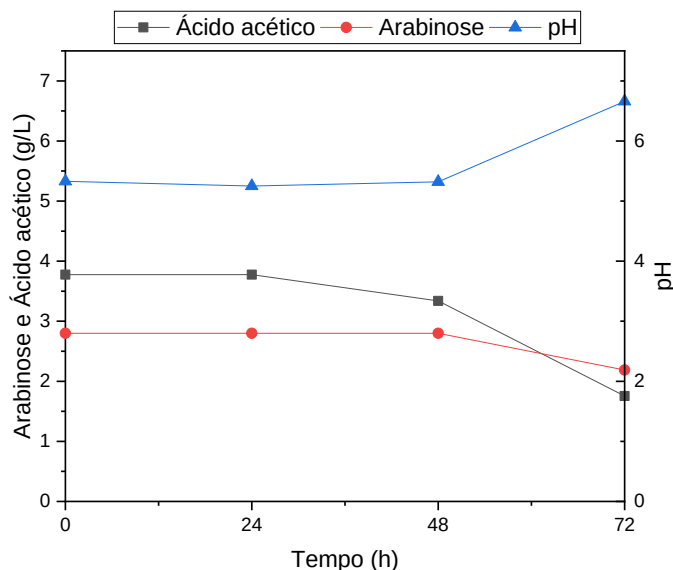


Figura 12. Consumo de L-arabinose e ácido acético e pH para a levedura *Spathaspora boniae* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar - Experimento 15 (6,1 g/L de extrato de levedura, 0,7 g/L de ureia, 2,5 g/L de peptona e 1,5 g/L de sulfato de amônio).

8.2.3 Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio na fermentação pela levedura *Spathaspora brasiliensis* UFMG-HMD19.3

Os níveis de ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, assim como as respostas avaliadas estão apresentados na Tabela 13. Ao todo foram realizados 20 experimentos de fermentação com a levedura *Spathaspora brasiliensis* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar destoxificado. Inicialmente, foram realizados 11 experimentos de fermentação que correspondem ao planejamento experimental fracionado 2^{4-1} , sendo verificada curvatura ($p < 0,05$) significativa no modelo. Deste modo, foram adicionados ao planejamento mais 8 pontos tipo face centrada e um ponto central para que, assim, fosse obtido um planejamento composto central tipo face centrada com 20 experimentos, como mostra a Tabela 13.

A levedura *Spathaspora brasiliensis* apresentou maior capacidade para a produção de xilitol, em todas as condições avaliadas, com o etanol sendo produzido como um subproduto do metabolismo, em função das diferenças nas concentrações das fontes de nitrogênio. De modo geral, a formação de etanol foi baixa, com a maior concentração de etanol de 3,29 g/L (Experimento 10 – Tabela 13). Além disso, é importante destacar que a levedura *Spathaspora brasiliensis* necessitou da etapa de

destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, uma vez que esta levedura não foi capaz de crescer em hidrolisado não destoxificado ao longo de 72 horas de fermentação.

No experimento 3 (Tabela 13), *S. brasiliensis* apresentou produção máxima de xilitol 10,62 g/L ($Y_{P/S} = 0,475$ g/g, $Q_P = 0,147$ g/Lh) quando o hidrolisado foi suplementado com ureia 0,05 g/L e extrato de levedura 6,1 g/L, peptona 0,19 g/L e sulfato de amônio 2,9 g/L (relação C:N = 8), resultando em produção de etanol de 2,92 g/L ($Y_{P/S} = 0,115$ g/g, $Q_P = 0,040$ g/Lh). Este resultado sugere que concentrações aumentadas de extrato de levedura (6,1 g/L) e sulfato de amônio (2,9 g/L) têm efeito positivo na produção de xilitol por *Spathaspora brasiliensis*.

Tabela 13. Matriz de planejamento composto central 2^{4-1} para o estudo variáveis independentes: ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio para a produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora brasiliensis*.

Experimentos	Variáveis independentes					Variáveis Respostas					
	Ureia (g/L)	E. L (g/L)	Peptona (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	C:N*	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/Lh)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/Lh)	Xilitol (g/L)
1	0,05	0,23	0,19	0,11	104,67	0,077	0,023	1,65	0,135	0,034	2,44
2	1,3	0,23	0,19	2,9	7,75	0,109	0,034	2,48	0,421	0,115	8,25
3	0,05	6,1	0,19	2,9	7,75	0,115	0,040	2,92	0,475	0,147	10,62
4	1,3	6,1	0,19	0,11	7,75	0,054	0,019	1,40	0,387	0,122	8,81
5	0,05	0,23	4,8	2,9	7,75	0,062	0,021	1,55	0,399	0,120	8,65
6	1,3	0,23	4,8	0,11	7,75	0,063	0,024	1,70	0,342	0,112	8,09
7	0,05	6,1	4,8	0,11	7,75	0,053	0,020	1,41	0,451	0,147	10,58
8	1,3	6,1	4,8	2,9	4,03	0,096	0,029	2,09	0,494	0,029	9,34
9	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,092	0,029	2,11	0,393	0,102	7,31
10	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,153	0,046	3,29	0,416	0,105	7,53
11	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,055	0,017	1,22	0,368	0,098	7,04
12	0,05	3,1	2,5	1,5	10,09	0,101	0,035	2,51	0,339	0,103	7,43
13	1,3	3,1	2,5	1,5	6,30	0,093	0,037	2,68	0,328	0,114	8,18
14	0,7	0,23	2,5	1,5	10,09	0,104	0,036	2,63	0,204	0,057	4,12
15	0,7	6,1	2,5	1,5	6,30	0,120	0,042	3,04	0,354	0,111	7,96
16	0,7	3,1	0,19	1,5	10,09	0,129	0,044	3,16	0,327	0,098	7,05
17	0,7	3,1	4,8	1,5	6,30	0,096	0,034	2,42	0,437	0,135	9,69
18	0,7	3,1	2,5	0,11	10,09	0,119	0,041	2,94	0,363	0,105	7,59
19	0,7	3,1	2,5	2,9	6,30	0,121	0,039	2,81	0,407	0,111	7,99
20	0,7	3,1	2,5	1,5	7,75	0,122	0,036	2,57	0,405	0,102	7,35

(*) A razão C:N não faz parte do planejamento experimental como variável independente.

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

No experimento 1, realizado com a menor quantidade de nitrogênio (0,05 g/L de ureia, 0,23 g/L de extrato de levedura, 0,19 g/L de peptona, 0,11 g/L de sulfato de amônio), observou-se o menor consumo de açúcares (79,60 %), baixa formação de

xilitol 2,44 g/L ($Y_{P/S} = 0,135$ g/g, $Q_P = 0,034$ g/Lh), sendo a formação de células 7,04 g/L. Este comportamento mostra que mesmo em baixa quantidade de nitrogênio (C:N = 104) a levedura foi capaz de assimilar os açúcares (acima de 50%), favorecendo o crescimento celular com uma baixa produção de xilitol.

Além disso, no experimento 8 quando todas as fontes de nitrogênio estavam no nível superior (1,3 g/L de ureia, 6,1 de extrato de levedura, 4,8 g/L peptona e 2,9 g/L sulfato de amônio) foram obtidos 9,34 g/L de xilitol ($Y_{P/S} = 0.494$ g/g, $Q_P = 0.029$ g/Lh), o que representa um aumento de aproximadamente 4 vezes em relação ao experimento 1, porém, menor que a produção máxima (experimento 3). Esses resultados sugerem que uma maior disponibilidade de fontes de nitrogênio no meio favorece a produção de xilitol. No entanto, esse aumento não necessariamente resulta em uma produção máxima de xilitol, indicando que há um ponto de equilíbrio entre a concentração de nitrogênio e as condições ideais para a produção de xilitol.

Além disso, nos experimentos 12 ao 19 que correspondem aos pontos de face centrada do planejamento composto central é possível analisar o efeito de cada variável quando muda do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), Tabela 9. Nesse sentido, verifica-se que todas as variáveis apresentam influência positiva para a formação de xilitol quando passam para o nível superior. Isto significa que todas as fontes de nitrogênio são capazes de favorecer a formação de xilitol pela levedura *Spathaspora brasiliensis*.

É importante enfatizar que não foram encontrados dados na literatura sobre o crescimento de *Spathaspora brasiliensis* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar, há apenas um estudo inicial em meio sintético para avaliação da capacidade dessa levedura em consumir D-glicose e D-xilose em meio sintético $Y_{P/X}$ (1% de extrato de levedura e 2% de peptona e 2% de D-xilose) que indicou que a *S. brasiliensis* não era capaz de consumir D-xilose em condições anaeróbica apenas em condições aeróbica, com um consumo de D-xilose próximo de 100% (66). A cepa *Spathaspora brasiliensis* UFMG CMY353T, cultivada em meio sintético (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona) com D-xilose (40-50 g/L), alcançou uma conversão de D-xilose de 0,47 g/g e um acúmulo de xilitol de 11,9 g/L (65). A taxa de conversão de D-xilose para xilitol relatada por esses autores foi semelhante à encontrada no hidrolisado hemicelulósico no presente trabalho, utilizando a cepa *Spathaspora brasiliensis* UFMG-HMD19.3, demonstrando que diferentes cepas têm propriedades comparáveis de conversão para xilitol.

Estudos com diferentes leveduras fermentadoras de D-xilose em frascos agitados sob condições comparáveis produziram resultados semelhantes e superiores aos obtidos no estudo atual com *S. brasiliensis*; no entanto, tais estudos não avaliaram a influência das fontes de nitrogênio, embora as utilizassem. Trichez *et al.* (161) avaliaram a produção de xilitol pela *Spathaspora sp.* JA1 em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar contendo 40 g/L D-xilose, 2 g/L YNB (Nitrogênio Levedura Base), ureia (4 g/L), D-glicose (8 g/L) e reportaram produção e bioconversão de D-xilose em xilitol de 22,62 g/L e $Y_{P/S}$ 0,58 g/g, respectivamente. A levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico da palha de cana-de-açúcar suplementado com extrato de farelo de arroz (20,0 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (2,0 g/L) e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1 g/L) resultou em uma concentração de xilitol de 16,20 g/L e o rendimento de 0,47 g/g (155), embora a concentração final obtida foi maior que a máxima concentração do presente trabalho o rendimento obtido pelos autores foram muito semelhante ao resultado obtido pela *S. brasiliensis*. Em outro estudo, o extrato de levedura foi utilizado no meio fermentativo com *Candida tropicalis* cultivada em hidrolisado hemicelulósico desintoxicado de bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de KH_2PO_4 e 0,4 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, resultando em uma concentração de xilitol de 19,3 g/L e um rendimento de 0,55 g/g, superior ao alcançado no presente trabalho (162). As leveduras do gênero *Spathaspora* em meio YPX (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 20 g/L; D-D-xilose, 40–50 g/L) têm diferentes habilidades para converter D-xilose em xilitol, apresentando resultados inferiores e superiores aos obtidos no estudo atual utilizando a levedura *Spathaspora brasiliensis*. *Sp. xylofermentans* UFMGCMY478T produziu 24,4 g/L de xilitol e um rendimento de 0,51 g/g, enquanto *Sp. arborariae* UFMGCMY352T produziu 9,0 g/L e um rendimento de 0,18 g/g (65).

A Figura 13 mostra o perfil fermentativo da *S. brasiliensis* no hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar nas condições do experimento 3. A levedura consumiu D-glicose e D-xilose ao mesmo tempo, sendo a D-glicose totalmente consumida em 24 horas e a D-xilose consumida ao final de 72 horas, o que aparentemente pode indicar que a concentração de D-glicose não resultou em crescimento diauxico ou supressão catabólica de carbono em *S. brasiliensis*. Porém, após 48 horas de fermentação, observou-se que 10% do xilitol foi consumido devido ao esgotamento dos açúcares.

A *Spathaspora brasiliensis* também foi capaz de assimilar a L-arabinose presente no hidrolisado. No experimento 3, a levedura consumiu toda a L-arabinose presente no meio, como mostra a Figura 15. Como já observado para *S. boniae*, a celobiose também não foi consumida pela *S. brasiliensis*. O ácido acético presente no meio foi totalmente assimilado, como pode ser observado na Figura 15, resultando em um aumento do pH do meio.

A relação C/N é um fator importante na produção de etanol e xilitol, pois influencia diretamente o metabolismo da levedura, afetando a via fermentativa. Observando os dados da Tabela 13, é possível verificar que valor mais elevado da razão C/N, como no experimento 1 (C/N = 104,67), favoreceu a produção de xilitol (2,44 g/L), enquanto a produção de etanol foi menor (1,65 g/L). No entanto, esse experimento foi o que apresentou as menores produções de xilitol e etanol, assim como a menor taxa de crescimento, como pode ser observado na Figura 12. Isso ocorre porque uma alta relação C/N implica em uma limitação de nitrogênio, o que geralmente desfavorece o crescimento da levedura e consequentemente a produção de etanol e xilitol. Por outro lado, experimentos com uma relação C/N mais baixa (6,30 e 10,09), como os experimentos 15 e 16, resultaram em uma maior produção de etanol, variando de 3,04 g/L (experimento 15) a 3,16 g/L (experimento 16). Nestes experimentos, a produção de xilitol também foi significativa, sugerindo que uma relação mais balanceada entre carbono e nitrogênio favorece a coprodução de ambos os metabólitos, com maior ênfase no xilitol.

Em relação à produção de xilitol, a razão C/N de 7,75 mostrou-se a mais adequada para a levedura *Spathaspora brasiliensis*. O experimento 3 destacou-se com a maior produção de xilitol, atingindo 10,62 g/L nessa condição ($Y_{P/S} = 0,475$ g/g, $Q_P = 0,147$ g/Lh). As concentrações de nitrogênio utilizadas foram 0,05 g/L de ureia, 6,1 g/L de extrato de levedura, 2,9 g/L de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e 0,19 g/L de peptona. O equilíbrio entre essas fontes sugere ter criado uma condição propícia para o redirecionamento da produção de xilitol. Além disso, a razão C/N de 7,75 parece ter evitado o acúmulo excessivo de nitrogênio, o que poderia desviar os fluxos metabólicos para o crescimento celular e a produção de etanol.

Esse efeito é evidente quando comparado ao experimento 8, que apresentou a menor razão C/N (4,03), com todas as fontes de nitrogênio em níveis elevados. Nesse caso, houve uma menor produção de xilitol e um aumento significativo na biomassa celular (~10 g/L) em relação ao experimento 3, indicando um desvio metabólico mais

voltado para o crescimento. Portanto, o balanço entre as diferentes fontes de nitrogênio e a razão C/N de 7,75 foram fundamentais para favorecer a rota metabólica de produção de xilitol.

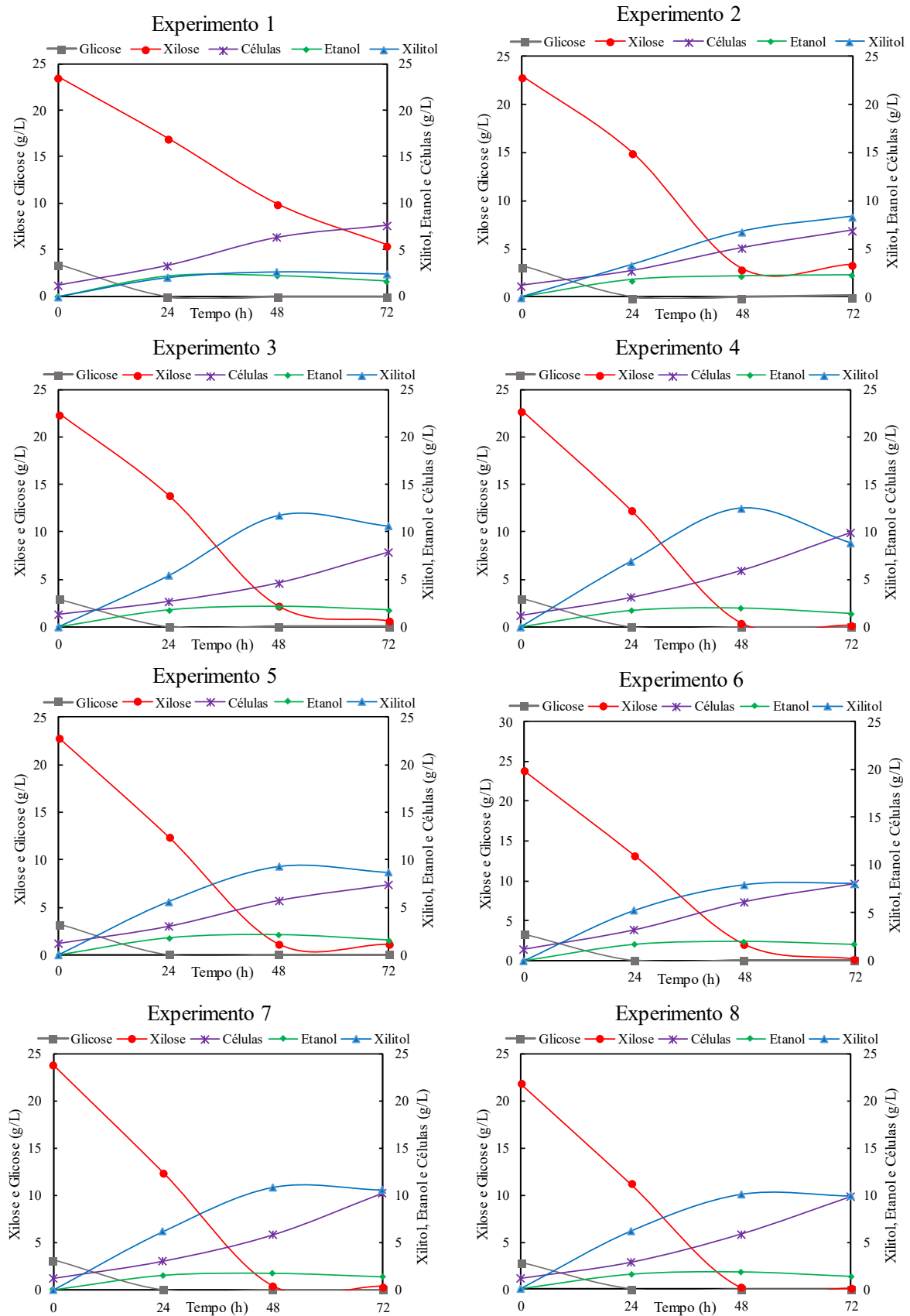


Figura 13. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora brasiliensis* de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 1 a 8.

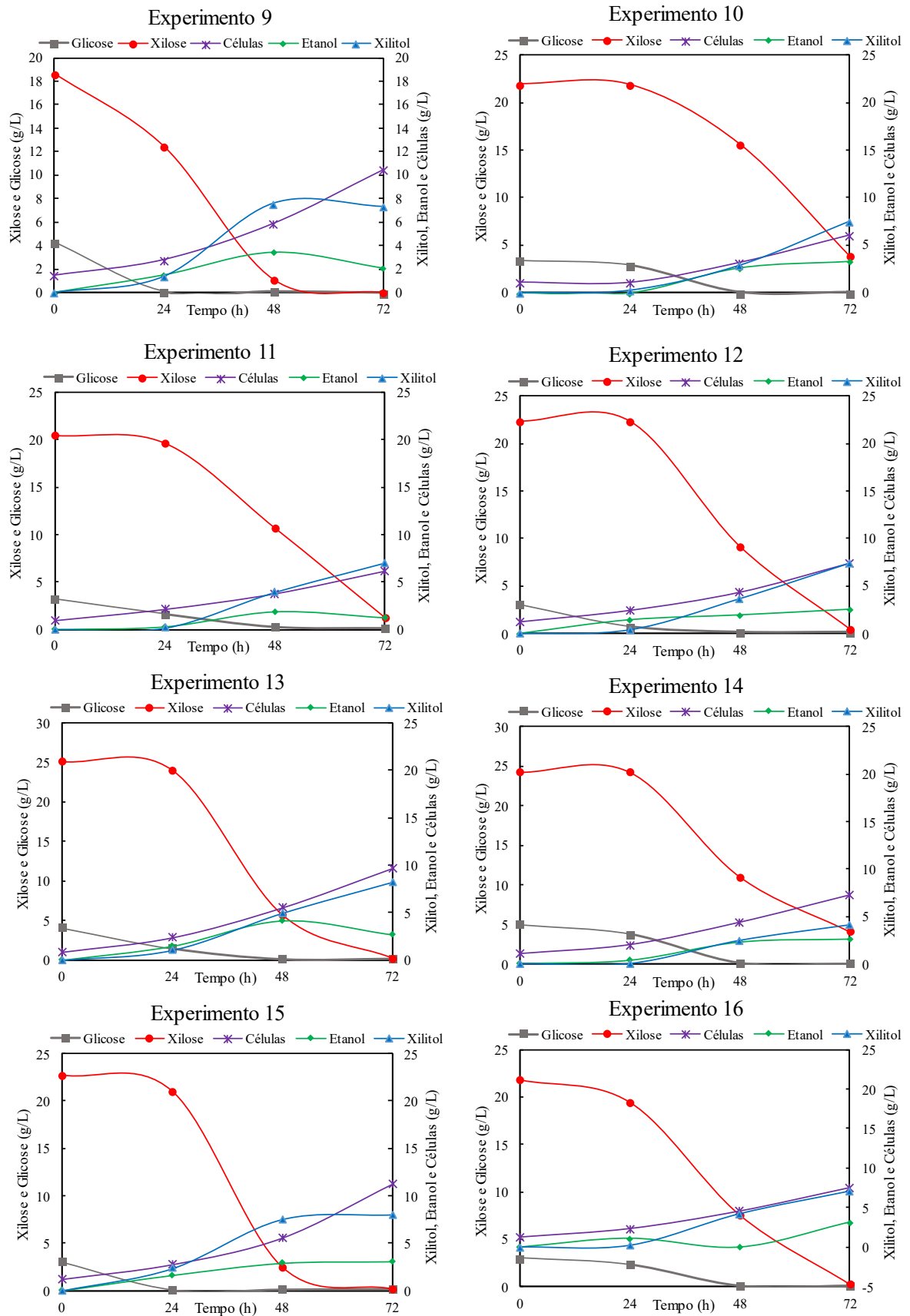


Figura 14. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora brasiliensis* de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 9 ao 16.

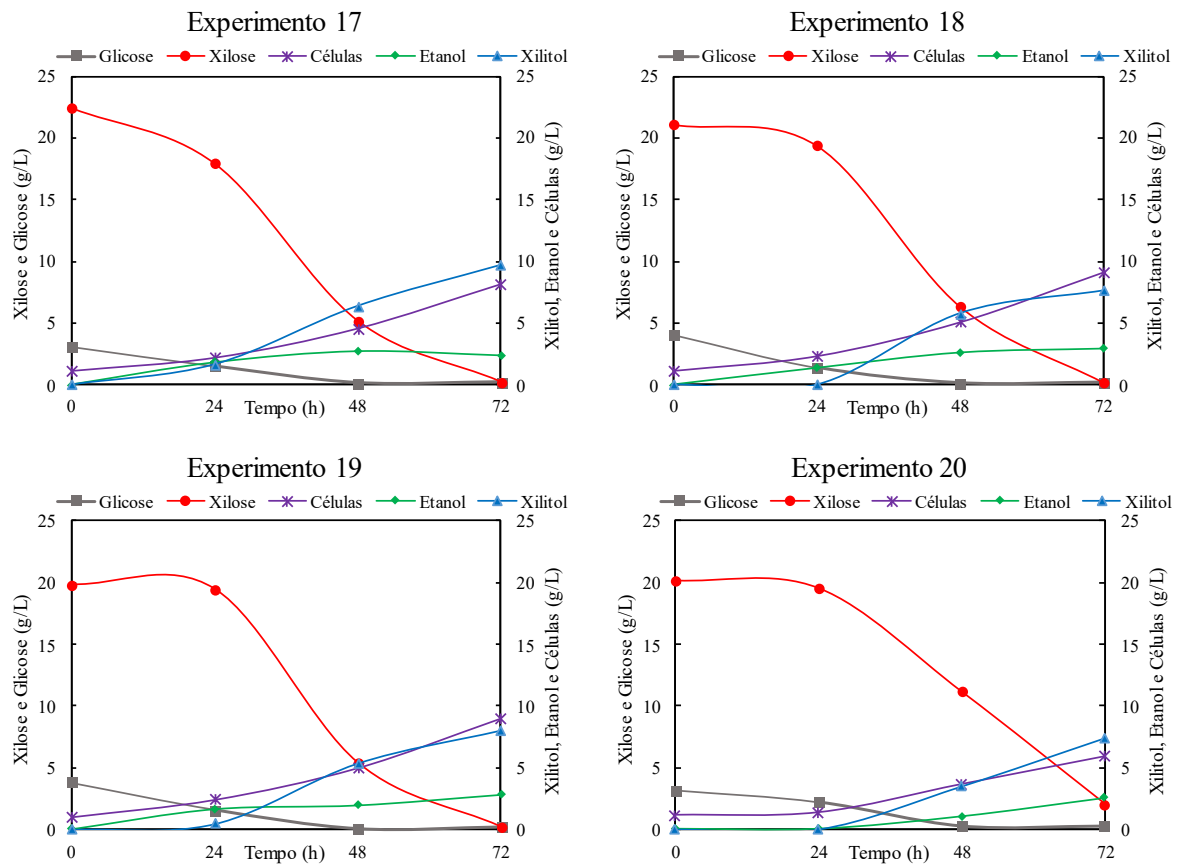


Figura 15. Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora brasiliensis* de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio, experimentos 17 ao 20.

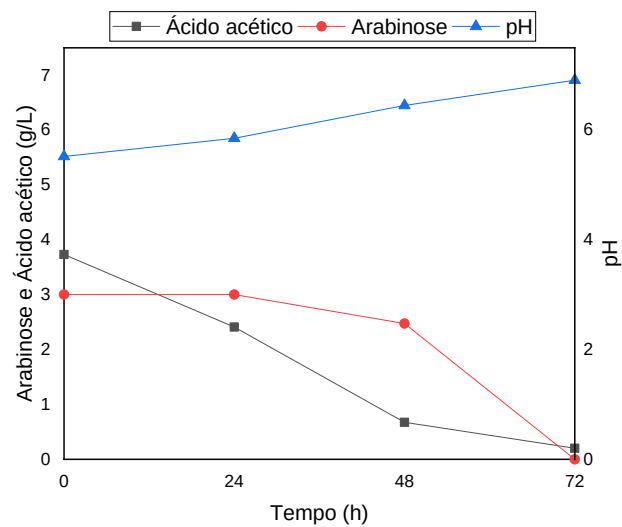


Figura 16. Consumo de L-arabinose e ácido acético e pH para a levedura *Spathaspora brasiliensis* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana de açúcar - Experimento 3 (Tabela 13).

8.3 Otimização das fontes de nitrogênio para maximização da produção de xilitol pelas leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis*.

8.3.1 Análise dos resultados para a variável resposta produção de xilitol

Para entender melhor a influência de cada variável e determinar o modelo matemático e as condições ótimas para *S. boniae* e *S. brasiliensis*, a variável resposta de produção de xilitol (g/L) foi considerada como variável resposta no planejamento composto central tipo face centrada.

Para *S. boniae*, o gráfico de Pareto (Figura 17) mostra que o extrato de levedura e a peptona apresentaram efeito significativo sobre resposta de produção de xilitol (g/L). Assim como na análise da Tabela 12 que mostra a matriz de planejamento com os resultados obtidos de cada experimento, a análise estatística da significância dos efeitos verificou que o extrato de levedura tem maior influência seguido da peptona para a produção de xilitol por esta levedura.

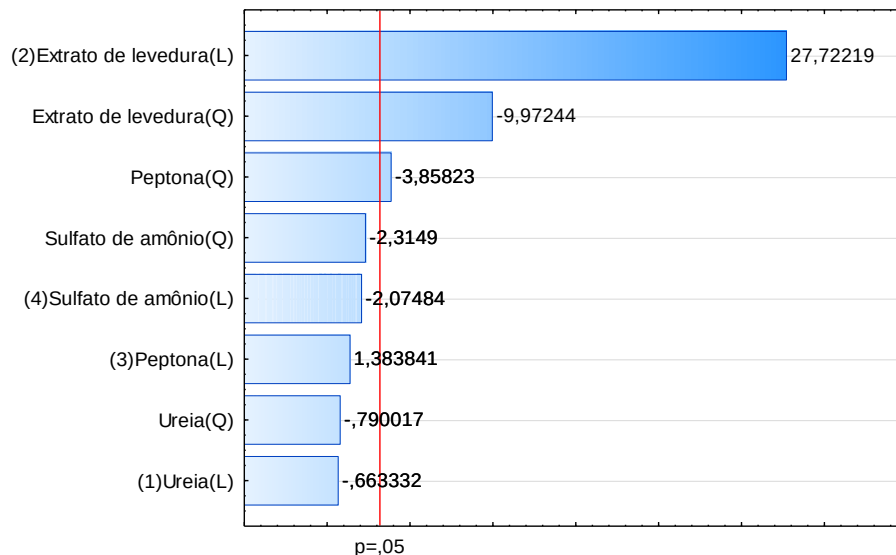


Figura 17. Gráfico de Pareto, estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) da variável resposta concentração de xilitol (g/L) de acordo com o Planejamento composto central 2^{4-1} , *Spathaspora boniae*.

Para *S. brasiliensis* a análise do gráfico de Pareto (Figura 18) indicou que todas as variáveis tiveram influência significativa para a produção de xilitol. As variáveis apresentaram a seguinte ordem de importância: extrato de levedura, sulfato de

amônio, ureia e peptona e as interações entre extrato de levedura e sulfato de amônio, ureia e peptona, ureia e sulfato de amônio e extrato de levedura e peptona.

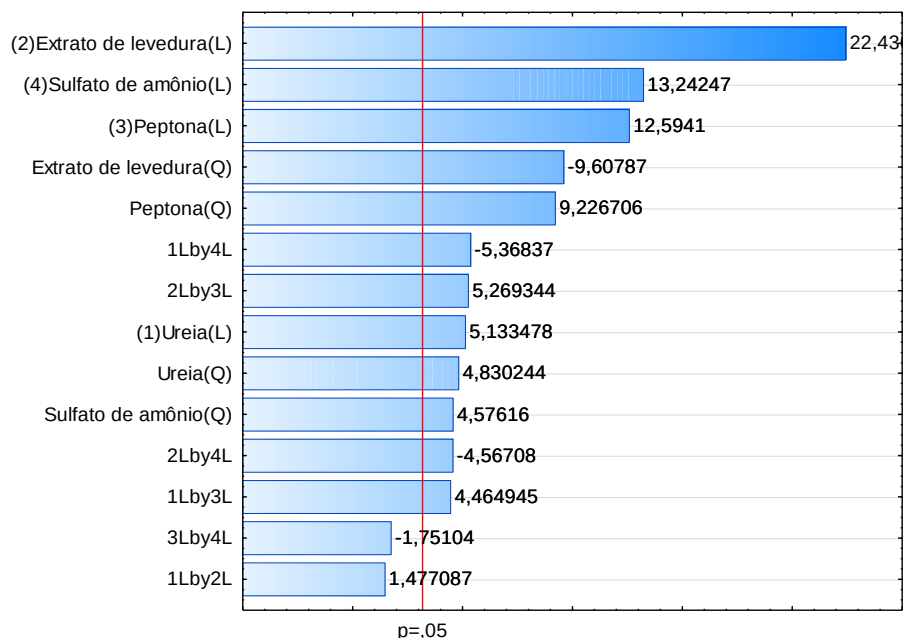


Figura 18. Gráfico de Pareto, estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) da variável resposta concentração de xilitol (g/L) de acordo com o Planejamento composto central 2^{4-1} , *Spathaspora brasiliensis*.

As Tabelas 14 e 15 apresentam os resultados da análise de variância do modelo de regressão (ANOVA) para a resposta de produção de xilitol (g/L) com o coeficiente de correlação para *S. boniae* ($R^2 = 0,9432$, $R^2_{adj} = 0,9022$) e *S. brasiliensis* ($R^2 = 0,9978$, $R^2_{adj} = 0,9917$), indicando que cada modelo pode explicar 94,32 e 99,45% da variabilidade da resposta, respectivamente. Além disso, os modelos propostos foram significativos, e o teste de falta de ajuste não foi estatisticamente significativo (p-valor $>0,05$), indicando a capacidade do modelo ajustado em prever a resposta.

Tabela 14. Análise de variância da regressão para o modelo da produção de xilitol (g/L), *Spathaspora boniae*.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F Calculado	p-Valor	Teste
Regressão	222,9985	8	27,8748	22,9275	0,0000082222	Significativo
Resíduos	13,3736	11	1,2158			
Falta de ajuste	12,8116	8	1,6014	8,5491	0,0524	Não Significativo
Erro Puro	0,5620	3	0,1873			
Total	236,3720	19				

$$R^2 = 0,9432, R^2_{adj} = 0,9022$$

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

Tabela 15. Análise de variância da regressão para o modelo da produção de xilitol (g/L), *Spathaspora brasiliensis*.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F Calculado	p-Valor	Teste
Regressão	69,84850	14	4,9892	164,0518	0,0000108630	Significativo
Resíduos	0,15206	5	0,0304			
Falta de ajuste	0,03081	2	0,0154	0,3811	0,7121	Não Significativo
Erro Puro	0,12126	3	0,0404			
Total	70,00056	19				

$$R^2 = 0,9978, R^2_{\text{adj}} = 0,9917$$

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

A análise de regressão foi utilizada para ajustar a função resposta de produção de xilitol (g/L) com os dados experimentais, que são representados por equações polinomiais de segunda ordem para *S. boniae* (Eq. 8) e *S. brasiliensis* (Eq. 9). As Figuras 19 e 20 mostram os valores preditos pelo modelo em função dos observados, indicando uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo pelas leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis*, respectivamente.

$$\text{Xilitol (g L}^{-1}\text{)} = -0.89 + 0.60 \times x_1 - 0.55 \times x_1^2 + 3,28 \times x_2 - 0.31 \times x_2^2 + 1.07 \times x_3 - 0.20 \times x_3^2 + 0.77 \times x_4 - 0.32 \times x_4^2 \quad (8)$$

$$\text{Xilitol (g L}^{-1}\text{)} = 2.19 - 1.01 \times x_1 + 1.56 \times x_1^2 - 2.12 \times x_2 - 0.14 \times x_2^2 - 26.73 \times x_3 + 0.22 \times x_3^2 + 53.31 \times x_4 + 0.30 \times x_4^2 + 2.83 \times x_1 \times x_2 + 19.70 \times x_1 \times x_3 - 38.97 \times x_1 \times x_4 + 4.93 \times x_2 \times x_3 - 7.09 \times x_2 \times x_4 - 1.91 \times x_3 \times x_4 \quad (9)$$

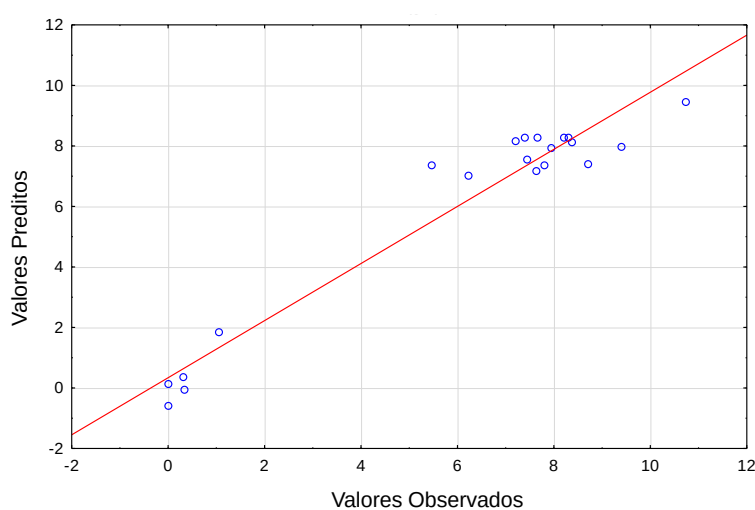


Figura 19. Valores preditos em função dos observados em relação a produção de xilitol pela levedura *Spathaspora boniae*.

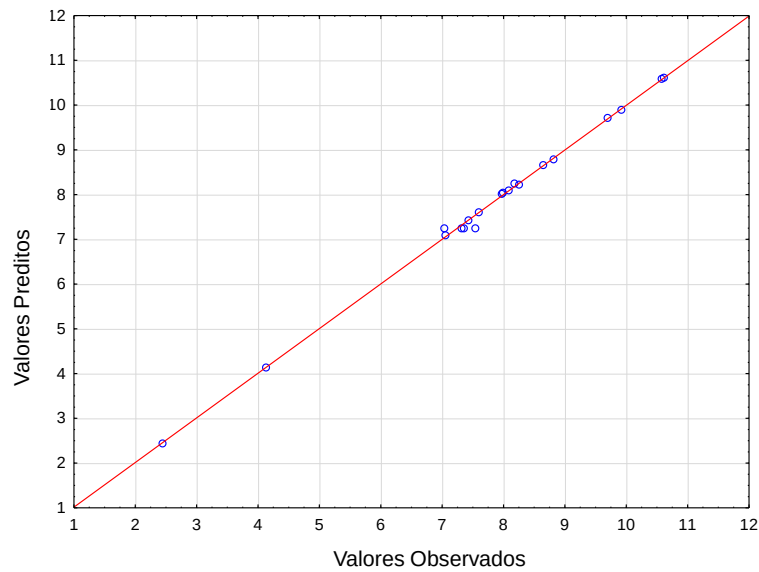


Figura 20 Valores preditos em função dos observados em relação a produção de xilitol pela levedura *Spathaspora brasiliensis*.

Os gráficos de superfície de resposta mostram que para *S. boniae* (Figura 21a) o aumento da concentração do extrato de levedura até valores próximos a 6 g/L favorece a produção de xilitol (g/L) quando a peptona está próxima do nível zero (valores entre 2 e 3 g/L) e não estimula a produção de xilitol quando a peptona está no nível superior (+1) ou no nível inferior (-1).

No entanto, para *S. brasiliensis* (Figura 22a), o aumento da concentração do extrato de levedura até valores próximos a 6 g/L apresenta influência positiva sobre a produção de xilitol (g/L) quando a ureia está no nível superior (1,3 g/L) e negativa quando a ureia está no nível inferior.

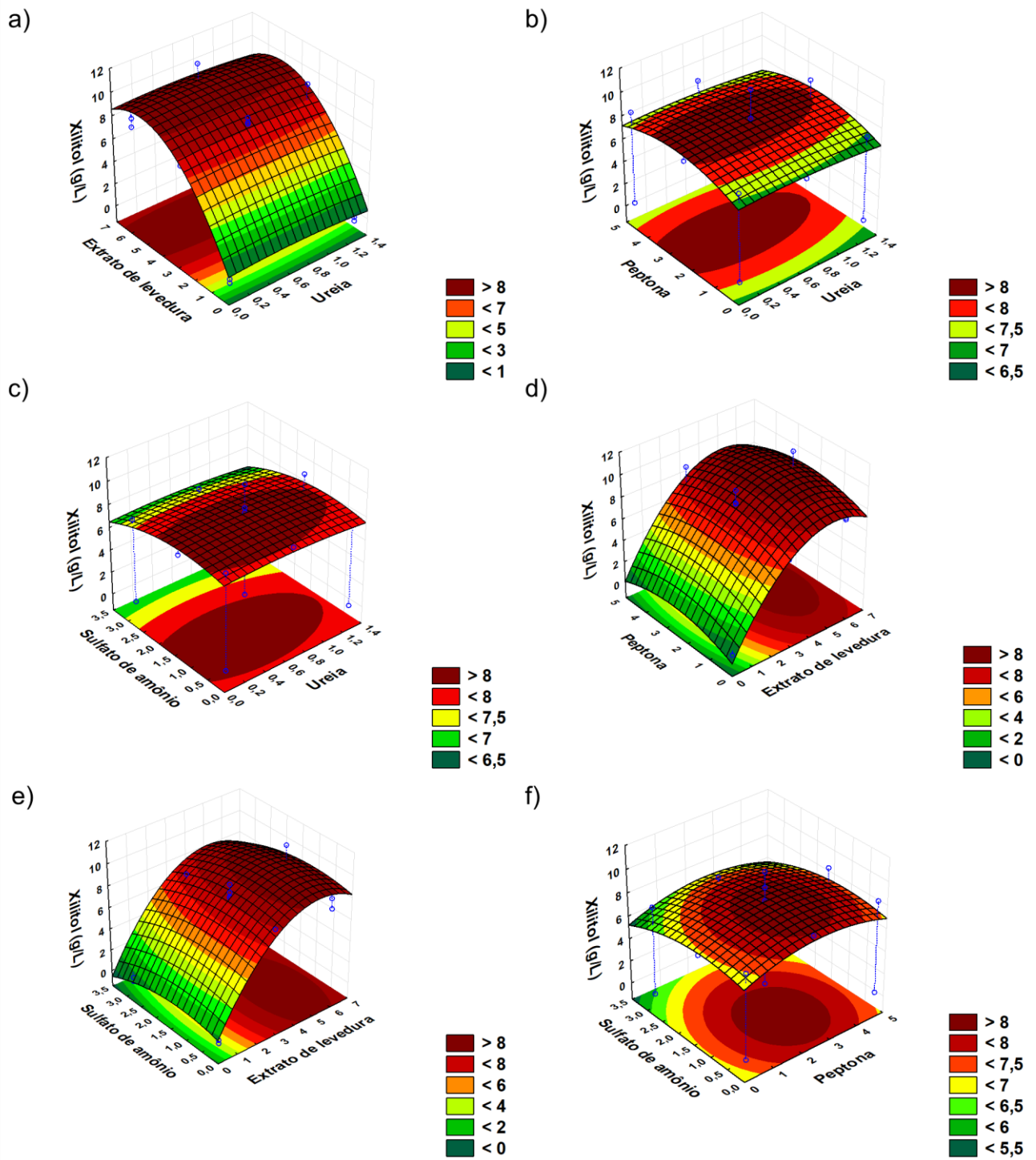


Figura 21 Superfície de resposta para a produção de xitol em função das variáveis independentes ureia, extrato de levedura e peptona e sulfato de amônio para a levedura *S. boniae*.

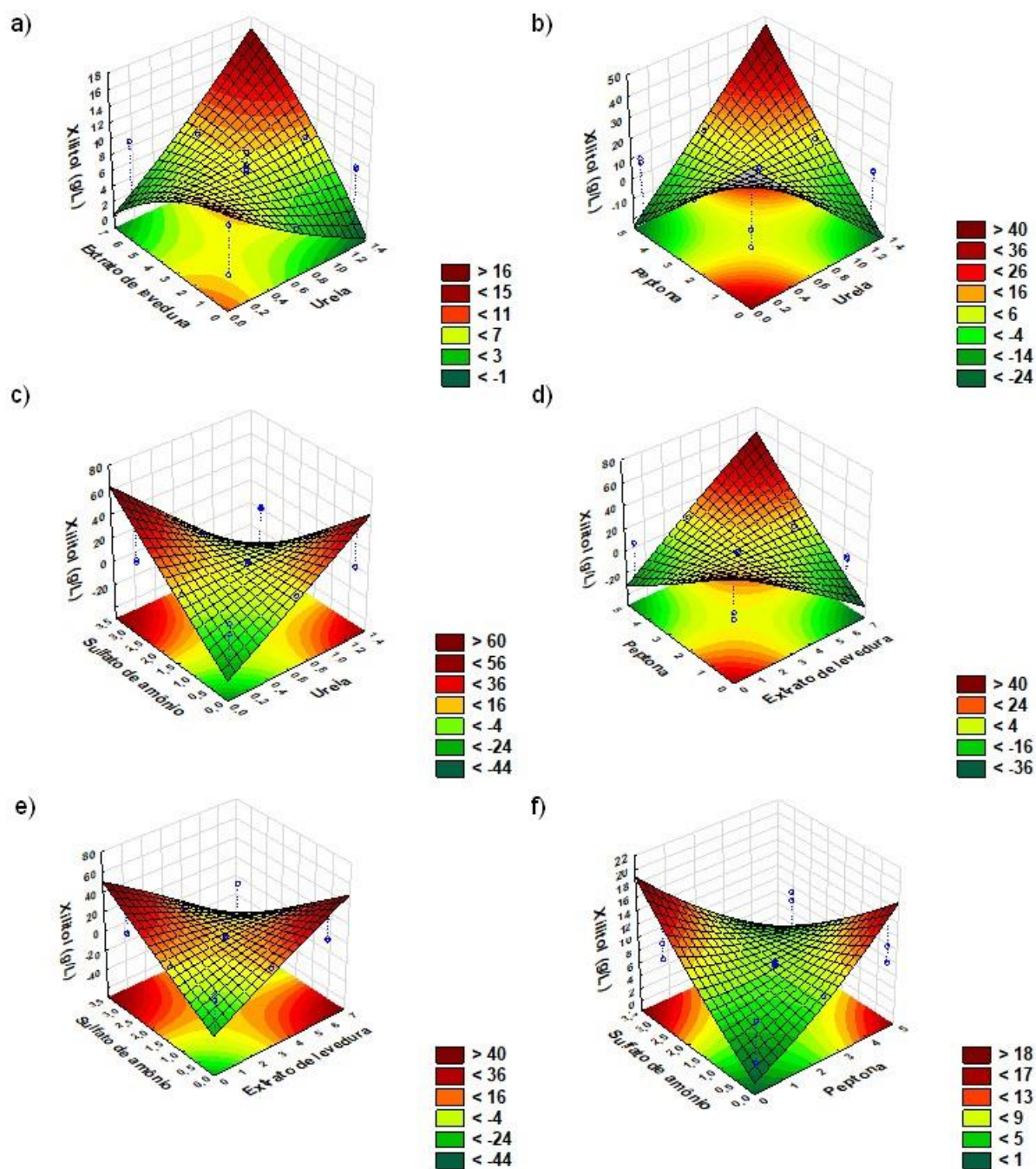


Figura 22 Gráfico de Superfície de resposta para a produção de xilitol em função das variáveis independentes extrato de levedura e peptona para a levedura *S. brasiliensis*.

A função desejabilidade, que estima a melhor combinação de fatores que resulte na melhor resposta possível dentro da região estudada previu que as maiores produções de xilitol para as leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* são 9,72 g/L e 10,63 g/L, respectivamente, como pode ser observado nas Figuras 23 e 24. Como resultado, as concentrações ótimas das variáveis para *Spathaspora boniae* foram estimadas em 0,58 g/L de ureia, 5,26 g/L de extrato de levedura, 2,82 g/L de peptona e 1,3 g/L de sulfato de amônio, sendo a relação C/N = 6,85. Já a levedura *S. brasiliensis* requer 1,3 g/L de ureia, 4,42 g/L de extrato de levedura, 4,8 g/L de peptona e 2,9 g/L de sulfato de amônio, com razão C/N = 4,31. Esses resultados mostram que é possível reduzir o extrato de levedura para ambas as espécies, mantendo as maiores taxas de produção de xilitol.

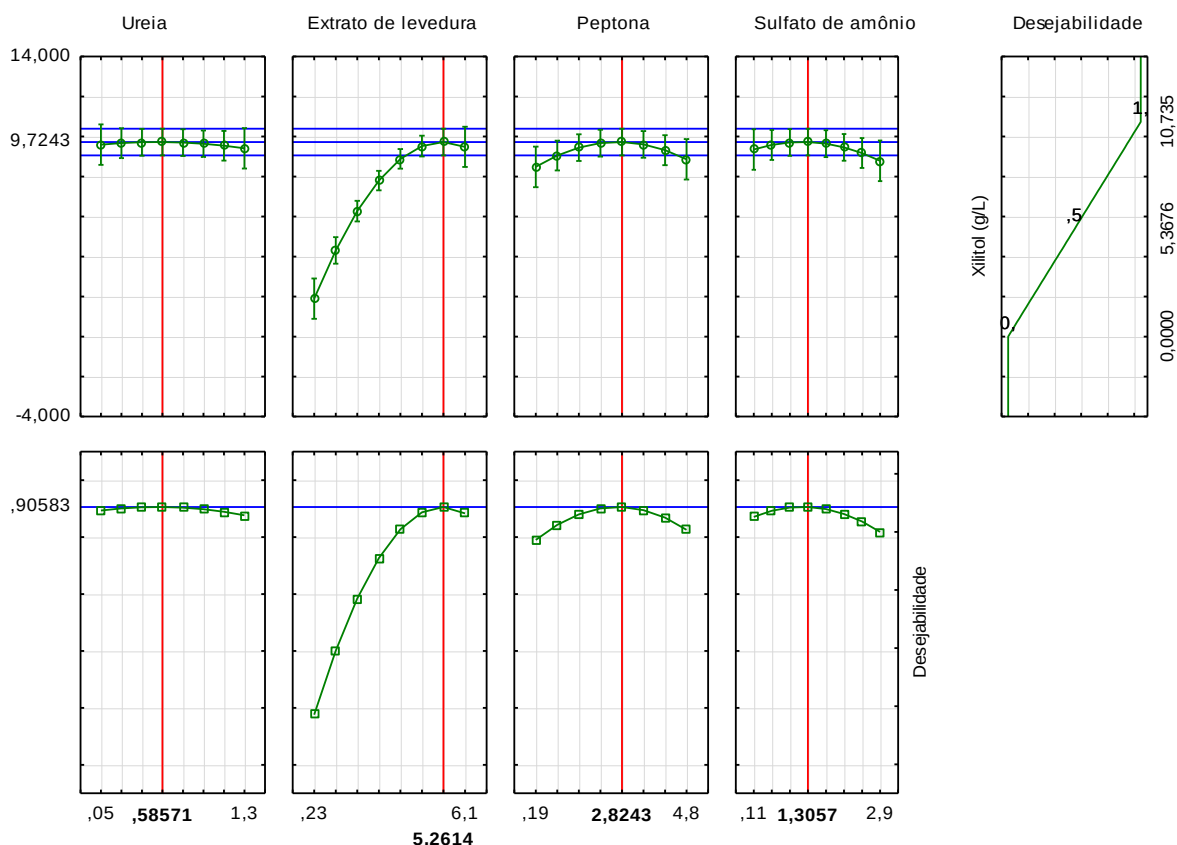


Figura 23 Perfis para valores previstos e desejabilidade para a produção de xilitol pela levedura *Spathaspora boniae*.

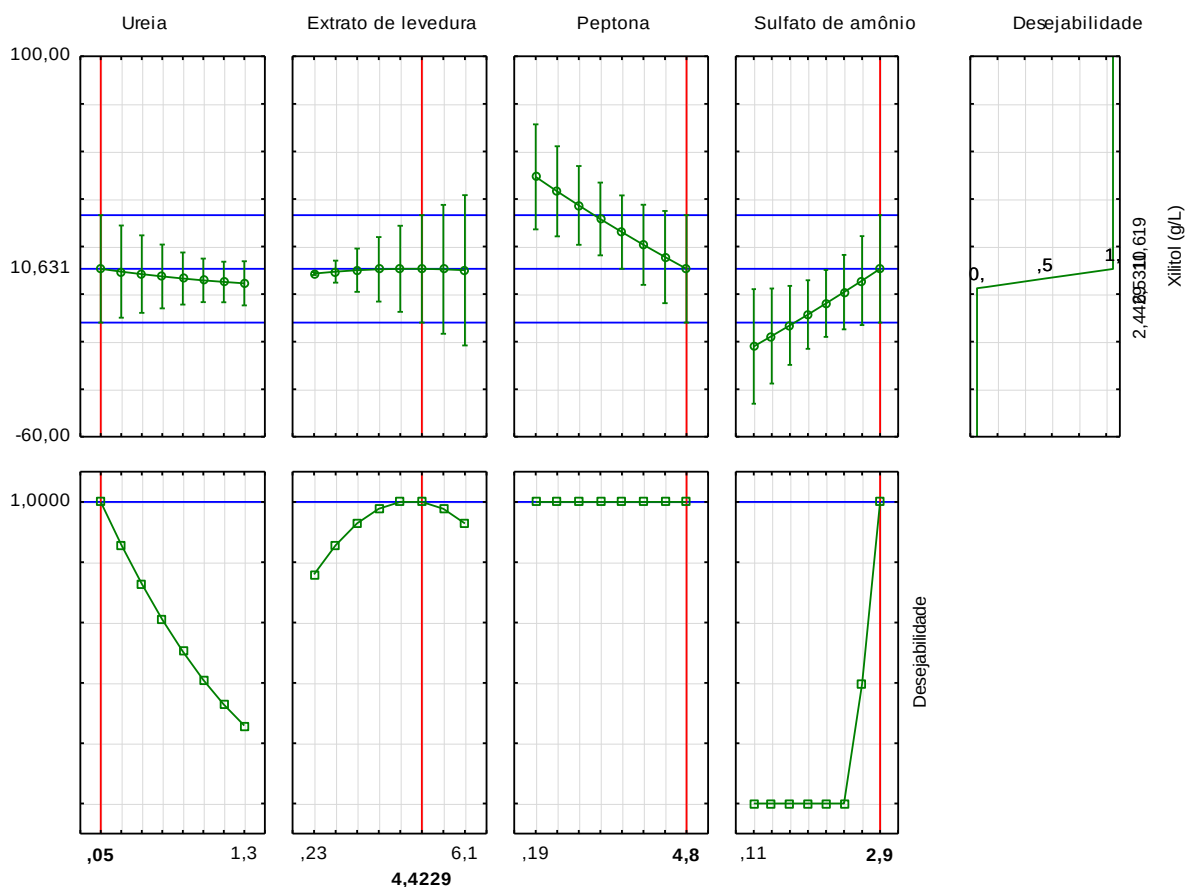


Figura 24 Perfis para valores previstos e desejabilidade para a produção de xilitol pela levedura *Spathaspora brasiliensis*.

8.3.2 Validação do modelo

Dessa forma, a fim de validar o modelo, foi realizado um experimento de fermentação em triplicata com as variáveis independentes propostas pela função de desejabilidade de 0,58 g/L de ureia, 5,26 g/L de extrato de levedura, 2,82 g/L de peptona e 1,3 g/L de sulfato de amônio, que estimou através do modelo um valor máximo de produção de xilitol de 9,72 g/L para a levedura *Spathaspora boniae* e para a levedura *Spathaspora brasiliensis* requer 1,3 g/L de ureia, 4,42 g/L de extrato de levedura, 4,8 g/L de peptona e 2,9 g/L de sulfato de amônio estimando uma produção de 10,63 g/L de xilitol. Na Tabela 16 estão apresentados os valores de $Y_{P/S}$, Q_P e concentração final de xilitol e etanol para as duas leveduras. A produção de xilitol obtida experimentalmente correspondeu a 100 e 95% do valor estimado pelo modelo, sendo este então validado, respectivamente para *Sapthaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis*. Dessa forma, o modelo proposto consegue representar a variável

resposta produção de xilitol (g/L) em função das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio.

Tabela 16 . Resultados obtidos utilizando as condições definidas pela função de desejabilidade do planejamento composto central durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar pela *Spathaspora boniae*.

Leveduras	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	(g/L)
Xilitol			
<i>Spathaspora boniae</i>	$0,455 \pm 0,070$	$0,135 \pm 0,012$	$9,74 \pm 0,829$
<i>Spathaspora brasiliensis</i>	$0,473 \pm 0,016$	$0,140 \pm 0,013$	$10,11 \pm 0,909$
Etanol			
<i>Spathaspora boniae</i>	$0,191 \pm 0,008$	$0,065 \pm 0,007$	$4,71 \pm 0,512$
<i>Spathaspora brasiliensis</i>	$0,121 \pm 0,012$	$0,036 \pm 0,006$	$2,60 \pm 0,400$

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

A Figura 25 mostra um comparativo entre o perfil fermentativo da levedura *S. boniae* no experimento com máxima produção de xilitol (experimento 15) e após a otimização das fontes de nitrogênio. Como pode ser observado (Figura 25a) ocorreu um alto consumo de açúcares (96,72%), a D-glicose foi totalmente consumida em 48 horas de fermentação e a D-xilose foi consumida ao final das 72h de fermentação. A levedura apresentou um comportamento diferente do que foi observado no experimento 15, Figura 25b. Assim, no experimento otimizado a levedura produziu a maior parte do xilitol entre 24 e 48 horas de fermentação, período que houve o maior consumo de D-xilose. É possível observar que nas primeiras 24 horas de fermentação houve apenas o consumo de D-glicose, ou seja, o consumo de D-xilose foi reprimido pela presença da D-glicose no meio. Observa-se também que parte do etanol foi consumido nas últimas 24 horas de fermentação acompanhado de um aumento na produção de xilitol. A levedura apresentou crescimento celular gradual ao longo de todo o experimento.

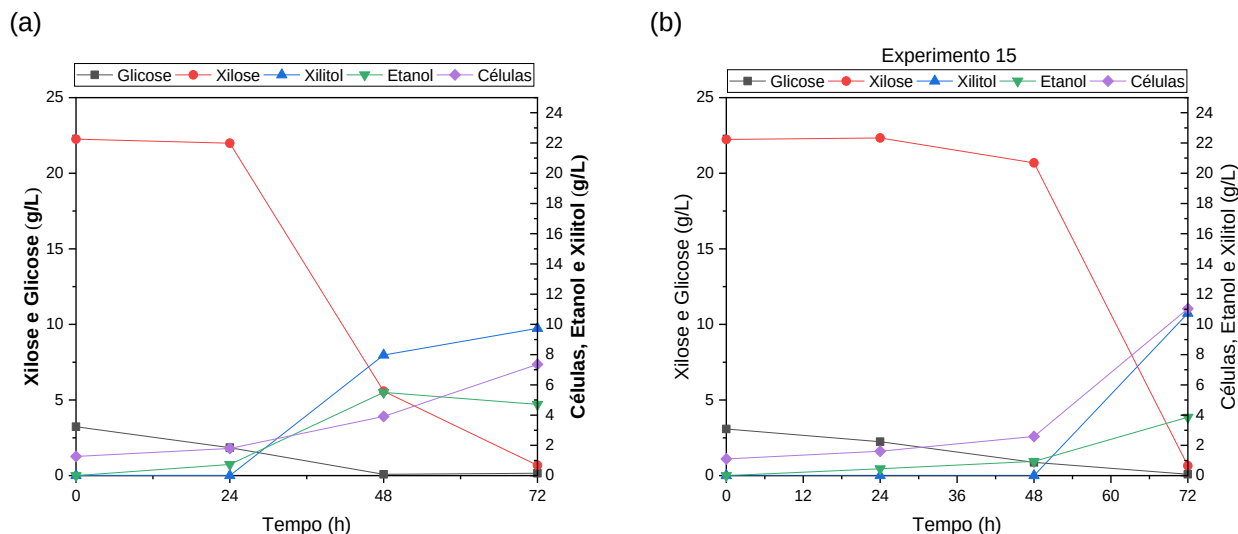


Figura 25. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* (a) no experimento de validação de otimização e (b) de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio.

A Figura 26 mostra um comparativo do perfil fermentativo da levedura *Spathaspora brasiliensis* após a otimização das fontes de nitrogênio (Figura 26a) com a máxima produção de xilitol obtida no Experimento 3 (Figura 26b). Como pode ser observado a levedura apresentou um comportamento similar em ambas as fermentações. Sendo a D-glicose consumida nas primeiras 24 horas de fermentação, parte da D-xilose consumida já nas primeiras 24 horas, sugerindo não haver uma inibição do consumo de D-xilose pela D-glicose. Além disso, foi observado que o xilitol foi produzido já nas primeiras 24 horas de fermentação e a máxima produção sendo obtida com 48 horas de fermentação e parte do xilitol sendo consumido nas últimas 24 horas de fermentação pela levedura. Vale ressaltar que no experimento de otimização (Figura 26a) foi observado uma maior produção de células em relação ao experimento 3 (Figura 26b).

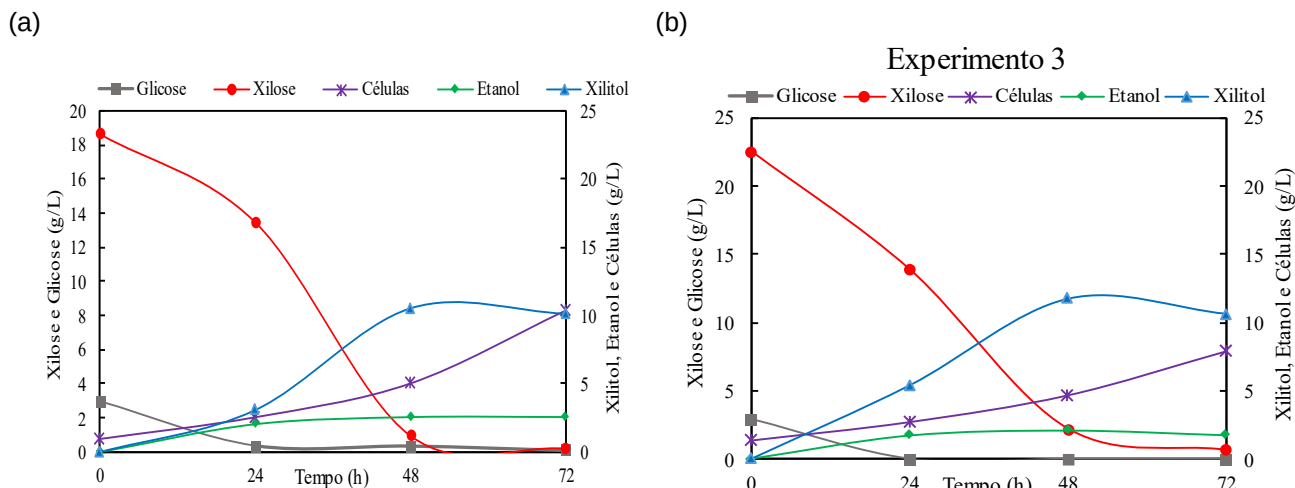


Figura 26. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora brasiliensis* (a) no experimento de validação de otimização e (b) de acordo com planejamento composto central para o estudo das variáveis independentes ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio.

8.4 Avaliação do desempenho fermentativo em biorreator de bancada da levedura *Spathaspora boniae* em hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar

A escolha da levedura *Spathaspora boniae* para os experimentos subsequentes de produção de xilitol e/ou etanol em biorreator de bancada se baseia em diversos fatores. Primeiramente, nos experimentos de validação do modelo proposto, *S. boniae* apresentou uma produção de xilitol equivalente a 100% do valor estimado pelo modelo (9,72 g/L), utilizando quantidades menores de fontes de nitrogênio quando comparada à *Spathaspora brasiliensis*. Especificamente, *S. boniae* requer 0,58 g/L de ureia, 5,26 g/L de extrato de levedura, 2,82 g/L de peptona e 1,3 g/L de sulfato de amônio, enquanto *S. brasiliensis* demanda concentrações mais elevadas de ureia (1,3 g/L), peptona (4,8 g/L) e sulfato de amônio (2,9 g/L) para atingir uma produção moderadamente superior de 10,63 g/L de xilitol. Assim, a melhor razão C/N para produção de xilitol foi de 6,85 para a levedura *S. boniae*.

Outro ponto relevante é que os experimentos com *S. boniae* foram realizados utilizando hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar sem a necessidade de destoxificação. Isso demonstra uma importante vantagem dessa levedura, pois ela é capaz de tolerar os inibidores presentes no hidrolisado, o que simplifica o processo de fermentação e reduz os custos operacionais. A combinação

desses fatores — menor exigência de fontes de nitrogênio, produção consistente e a capacidade de fermentar hidrolisados não destoxificados — fez da *Spathaspora boniae* uma candidata ideal para os experimentos subsequentes de produção de xilitol em biorreator de bancada.

8.4.1 Estudo da influência das variáveis agitação e aeração na fermentação em biorreator de bancada pela levedura *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306

A fermentação pela levedura *Spathaspora boniae* foi estudada utilizando um planejamento composto central rotacional (DCCR) de modo a analisar a contribuição de cada variável independente agitação (rpm) e aeração (vvm) no processo fermentativo do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação, suplementado com as fontes de nitrogênio otimizadas na etapa anterior (item 8.3) para a levedura *Spathaspora boniae*. Inicialmente, foram realizados 6 experimentos de fermentação que correspondem ao planejamento experimental completo 2^2 com dois pontos centrais, sendo verificada curvatura ($p < 0,1$) significativa no modelo, utilizando como variável resposta a produção de xilitol em (g/L). Deste modo, foram adicionados ao planejamento mais 4 pontos axiais para que assim, fosse obtido um planejamento composto central rotacional com 10 experimentos, como mostra a Tabela 17.

Também são apresentados na Tabela 17 os valores dos parâmetros fermentativos como fator de rendimento em xilitol e etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica do processo em xilitol e etanol (Q_P) e as concentrações de xilitol e etanol (g/L) para as diferentes condições de fermentação avaliadas. Nas Figuras 26 e 27 são apresentados os perfis de consumo de açúcares, produção de xilitol e etanol e o crescimento celular para os experimentos realizados sob diferentes condições de aeração (0,3 a 1,7 vvm) e agitação (97 a 393 rpm). Observa-se que a levedura *Spathaspora boniae* foi capaz de produzir tanto xilitol quanto etanol na maioria das condições avaliadas, com maior destaque para a produção de xilitol, sendo o etanol um subproduto do processo.

Tabela 17. Matriz de planejamento composto central rotacional 2^2 para o estudo variáveis independentes: agitação e aeração para a produção de xilitol e etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae*.

Experimentos	Variáveis Independentes			Variáveis Resposta						
	rpm	vvm	k_{La} inicial (h^{-1})	Etanol		Xilitol				
				$Y_{P/S\ et}$ (g/g)	$Q_{P\ et}$	Etanol (g/L)	$Y_{P/S\ xil}$ (g/g)	$Q_{P\ xil}$ (g/L.h)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)
1	140	0,5	0,56	0,068	0,024	1,76	0,459	0,145	10,47	10,79
2	350	0,5	1,12	0,000	0,000	0,00	0,041	0,013	0,97	26,06
3	140	1,5	1,30	0,000	0,000	0,00	0,596	0,189	13,58	9,56
4	350	1,5	2,30	0,071	0,027	1,92	0,000	0,000	0,00	32,36
5	245	1	1,81	0,064	0,023	1,64	0,450	0,141	10,18	12,48
6	245	1	1,81	0,086	0,032	2,28	0,475	0,151	10,85	13,15
7	97	1	0,82	0,047	0,018	1,27	0,631	0,198	14,23	4,57
8	393	1	1,63	0,000	0,000	0,00	0,000	0,000	0,00	25,24
9	245	0,3	0,63	0,105	0,038	2,77	0,546	0,173	12,46	10,94
10	245	1,7	1,98	0,000	0,000	0,00	0,400	0,127	9,14	13,76

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

De acordo com a Tabela 17, observa-se uma variação significativa na produção de xilitol e nos valores de $Y_{P/S}$ obtidos nos 10 experimentos do planejamento composto central. Os experimentos 3, 7 e 9 apresentaram as maiores produções de xilitol e conversões de D-xilose em xilitol ($Y_{P/S}$), apesar de terem sido conduzidos em diferentes condições de fermentação, uma vez que a taxa de transferência de oxigênio variou entre 0,63 a 1,30 h^{-1} nesses experimentos.

O experimento 7 apresentou a máxima produção de xilitol (14,23 g/L), assim como a maior conversão de D-xilose em xilitol ($Y_{P/S} = 0,631$ g/g) e produtividade volumétrica (0,198 g/L.h), com uma produção de etanol de 1,27 g/L ($Y_{P/S} = 0,047$ g/g, $Q_P = 0,018$ g/L.h). Nesse experimento, foi empregada uma agitação de 97 rpm e aeração de 1 vvm, sendo o k_{La} inicial de 0,82 h^{-1} . Ao analisar o perfil fermentativo do experimento 7 (Figura 28), verifica-se a menor produção de biomassa celular (4,57 g/L) e um consumo total de D-xilose ao final de 60 horas de fermentação. Após esse período, parte do etanol produzido foi assimilado devido ao esgotamento dos açúcares presentes no meio. Desse modo, esses resultados indicam que a baixa agitação e a

aeração moderada proporcionaram uma taxa de transferência de oxigênio adequada para favorecer o metabolismo da levedura *Spathaspora boniae* na conversão da D-xilose em xilitol.

Diferente do que foi observado no experimento 7, o trabalho de Singh *et al.* (123), utilizou um biorreator de 1 L para fermentar hidrolisado rico em D-xilose (30 g/L) derivado da hemicelulose de palha de trigo, com a levedura *Candida tropicalis*. As condições otimizadas incluíram um inóculo inicial de 10%, fluxo de ar de 0,2 vvm e agitação a 400 rpm, resultando em um k_{La} de $0,77 \text{ min}^{-1}$. Sob essas condições, a produção de xilitol atingiu 25,38 g/L ($Y_{P/S} = 0,58 \text{ g/g}$, $Q_P = 1,49 \text{ g/L.h}$), com uma eficiência de fermentação de cerca de 64% após 16 horas. Embora a *Spathaspora boniae* no experimento 7 tenha uma produtividade volumétrica menor ($0,198 \text{ g/L.h}$) e um tempo de fermentação maior (72 horas), ela apresenta uma conversão de D-xilose superior ($Y_{P/S} = 0,631 \text{ g/g}$ contra $0,58 \text{ g/g}$). Além disso, *C. tropicalis* requer maior aeração e agitação, enquanto *S. boniae* utiliza condições mais moderadas, como menor rpm e menor concentração de D-xilose, o que pode representar uma vantagem em termos de economia de energia e simplicidade operacional.

No estudo conduzido por Singh *et al.* (122), a produção máxima de xilitol foi obtida em um biorreator de 3 L com hidrolisado de palha de arroz (D-xilose a 60 g/L) usando a levedura *Meyerozyma caribbica* CP02 em condições de agitação mais baixa. As condições otimizadas foram 1,5% de inóculo, pH 3,5, 32 °C, agitação de 200 rpm (reduzida para 150 rpm após 24 horas) e fluxo de ar de 1,2 L/min (reduzido para 0,6 L/min após 24 horas). A taxa de conversão de D-xilose em xilitol foi de 0,63 g/g, com produtividade de 0,52 g/L.h após 96 horas. Comparativamente, a levedura *Spathaspora boniae* no experimento 7 apresentou uma conversão de D-xilose semelhante ($Y_{P/S} = 0,631 \text{ g/g}$), porém, com uma concentração inicial de D-xilose significativamente menor (~24 g/L). Apesar da *M. caribbica* ter uma produtividade volumétrica maior, a *S. boniae* alcançou resultados competitivos com menos D-xilose e em menos tempo (72 horas contra 96 horas), o que demonstra eficiência de substrato e economia de tempo.

Dall Cortivo *et al.* (133) investigaram a conversão de açúcares fermentáveis de hidrolisados de cascas de soja e aveia em etanol e xilitol utilizando a levedura *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303. Com 28,2 g/L de D-xilose, 0,5 g/L de células e uma agitação de 300 rpm a 1 vvm, a produção máxima alcançada foi de 6,8 g/L de xilitol ($Y_{P/S} = 0,31 \text{ g/g}$, $Q_P = 0,07 \text{ g/L.h}$) e 6,1 g/L de etanol ($Y_{P/S} = 0,28 \text{ g/g}$, Q_P

= 0,13 g/L.h) após 96 horas de fermentação. O desempenho da levedura *Spathaspora boniae* no experimento 7 foi superior em comparação com o estudo da *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303. No experimento 7, a *S. boniae* demonstrou uma produção significativamente maior de xilitol e uma eficiência de conversão superior, além de operar com uma concentração inicial de D-xilose mais baixa e um volume de células maior. Embora *S. hagerdaliae* tenha mostrado um desempenho melhor na produção de etanol, *S. boniae* destacou-se pela sua alta produtividade de xilitol, trabalhando com menor intensidade de agitação e em um tempo de fermentação reduzido, o que a torna uma opção mais eficiente em termos de conversão de D-xilose em xilitol.

No caso do experimento 3 (Tabela 17) foi obtida a segunda maior produção de xilitol (13,58 g/L) com um fator de conversão de D-xilose em xilitol (0,596 g/g) e produtividade (0,189 g/L.h) ao final de 72 horas de fermentação. Nesse experimento foi empregado uma rotação de 140 rpm e aeração de 1,5 vvm, sendo observado um acúmulo de células de 9,56 g/L e 0,00 g/L de etanol. Não houve acúmulo de etanol, pois ele foi continuamente assimilado pela levedura como fonte de carbono a partir de 36 horas de fermentação, sendo completamente esgotado até 72 horas. Esse comportamento ocorreu devido ao consumo total da D-xilose nas primeiras 36 horas de processo fermentativo. Ao comparar esses resultados com o experimento 7, que obteve a máxima produção de xilitol, verifica-se que nessas condições (k_{La} de $1,3 \text{ h}^{-1}$) também há um favorecimento na produção de xilitol, no entanto, há um maior direcionamento do metabolismo para produção de células o que pode explicar o menor acúmulo de xilitol em relação ao experimento 7.

Manaf *et al.* (125) investigaram o impacto da concentração inicial de D-xilose e da agitação na produção de xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36,907. Com 32,93 g/L de D-xilose e 0,5 g/L de células, e uma agitação de 300 rpm ($k_{La} = 29,6 \text{ h}^{-1}$), a produção máxima de xilitol foi de 15,10 g/L ($Y_{P/S} = 0,43 \text{ g/g}$, $QP = 0,21 \text{ g/L.h}$) após 72 horas de fermentação com uma produção de células de 2,32 g/L. Em contraste, o experimento 3, com uma agitação mais baixa e um k_{La} menor ($1,3 \text{ h}^{-1}$), obteve um fator de conversão superior (0,596 g/g). A menor agitação pode ter favorecido um balanço metabólico mais eficiente para a conversão de D-xilose em xilitol, resultando em uma maior eficiência de conversão, embora a produção de xilitol tenha sido moderadamente inferior (1,52 g/L) à observada por Manaf *et al.* (125) e, também, tenha apresentado uma maior produção de biomassa celular.

O mesmo comportamento foi observado no experimento 9, onde, utilizando as condições de 245 rpm e 0,3 vvm a levedura produziu 12,46 g/L de xilitol ($Y_{P/S} = 0,546$ g/g, $Q_P = 0,173$ g/L.h), sendo a produção de biomassa de 10,94 g/L, ou seja, a condição de k_{La} inicial de $0,63\text{ h}^{-1}$ também favoreceu a produção de xilitol pela levedura *S. boniae*, assim como a produção de biomassa celular. Bevilaqua *et al.* (131) investigaram a produção de xilitol e arabitol usando *Candida tropicalis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado. Sob condições de 32 °C, 250 rpm, 0,7 vvm, e 75 g/L de D-xilose, a levedura produziu 52,12 g/L de xilitol ($Y_{P/S} = 0,74$) após 216 horas de fermentação.

A rotação de 245 rpm no experimento 9 com *Spathaspora boniae* favoreceu a produção eficiente de xilitol (12,46 g/L) em um período relativamente curto de 72 horas. Comparando com o estudo de Bevilaqua et al., onde a rotação de 250 rpm foi usada com *Candida tropicalis*, observa-se que, apesar de condições semelhantes de agitação, *S. boniae* apresentou uma produção de xilitol mais rápida, enquanto *C. tropicalis* levou 216 horas para alcançar uma maior concentração (52,12 g/L), sugerindo que a *S. boniae* é mais eficiente em transformar o carbono em xilitol sob agitação moderada, sem exigir longos períodos de fermentação ou grandes quantidades de substrato.

Além disso, ao analisar o efeito de cada variável na Tabela 17, verifica-se que a influência da agitação é maior que a aeração na resposta avaliada de formação de xilitol. Nos experimentos de 1 a 4; 7 e 8, onde há a mudança do menor nível para o maior nível da variável agitação (rpm), porém, mantendo-se constante o nível da variável aeração (vvm), não foi obtido o acúmulo de xilitol no meio e houve aumento da biomassa celular. Ou seja, quando ocorre um aumento da agitação, independentemente da quantidade de aeração (vvm), há um aumento importante de biomassa celular em detrimento da formação de xilitol. Assim, os experimentos 2, 4 e 8 que possuem as maiores agitações de 350 e 393 rpm resultaram nos maiores acúmulos de biomassa celular com baixa formação de xilitol e etanol. A agitação mais intensa aumenta a transferência de oxigênio no meio, o que estimula vias metabólicas oxidativas, como a respiração aeróbia, ao invés de vias fermentativas. Isso resulta em um maior crescimento celular, em detrimento da produção de metabólitos como o xilitol e o etanol (163).

O experimento 4 (350 rpm, 1,5 vvm), com maior k_{La} ($2,30\text{ h}^{-1}$), foi o que obteve a maior produção de células de 32,36 g/L, sem a formação de xilitol e com uma

produção de etanol de 1,92 g/L ($Y_{P/S} = 0,071 \text{ g/g}$, $Q_P = 0,027 \text{ g/L.h}$). No entanto, quando a agitação de 393 rpm e aeração de 1 vvm foi empregado no experimento 8, não foi observado a formação de xilitol e etanol ao final de 72h de fermentação, indicando um efeito negativo da rotação para a produção de xilitol quando esta é aumentada. O mesmo efeito foi observado nos experimentos 2 (350 rpm e 0,5 vvm), onde não houve formação de xilitol e etanol ao final de 72 horas de fermentação. Este comportamento foi observado em um estudo realizado por Branco *et al.* (164) em que em condições de maior transferência de oxigênio ($k_{La} = 100 \text{ h}^{-1}$) resultou em um desvio do metabolismo da levedura, passando da produção de xilitol para a produção de biomassa, sendo evidenciado pela diminuição do rendimento de xilitol por D-xilose consumida e pela concentração final de xilitol, enquanto houve um aumento no rendimento de biomassa por D-xilose consumida e na concentração final de biomassa.

O trabalho realizado por Castañón-Rodríguez *et al.* (165) mostra que a taxa de transferência de oxigênio (OTR) tem uma influência significativa na produção de xilitol durante a fermentação. Nesse estudo identificou-se que a melhor condição para a produção de xilitol pela levedura *Candida tropicalis* foi em uma taxa de transferência de oxigênio de 56,05 mg de $\text{O}_2/\text{L.h}$, onde a produtividade de xilitol foi de 0.18 g/L/h. Os autores sugerem que, em vez de maximizar a OTR, um nível moderado pode ser mais benéfico para a produção de xilitol, permitindo que a fermentação ocorra de maneira eficiente sem favorecer excessivamente a formação de biomassa. Aguiar *et al.* (166) estudaram a influência do valor inicial de k_{La} e da quantidade de inóculo na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Para a condição de inóculo inicial de 1 g/L e k_{La} de 100 h^{-1} , observaram diminuições da conversão de D-xilose em xilitol (0,04 g/g) e da produtividade (0,06 g/L/h); por outro lado, o fator de rendimento de crescimento (0,48 g/g) foi aumentado e o tempo para o consumo total do substrato foi diminuído. Sendo assim, um aumento na disponibilidade de oxigênio levou ao crescimento celular e foi prejudicial ao acúmulo de xilitol.

Assim como os dados encontrados na literatura, dentre as condições avaliadas, os dados sugerem que a otimização da produção de xilitol pela *Spathaspora boniae* requer um equilíbrio entre a agitação e a aeração. Condições de baixa rotação combinadas com uma aeração moderada demonstraram ser as mais favoráveis para maximizar a produção de xilitol, também para a levedura *Spathaspora boniae*, enquanto rotações e aerações excessivas devem ser evitadas para produção de xilitol no processo fermentativo. A levedura *Spathaspora boniae* se destaca na produção de

xilitol por várias razões. Apesar de utilizar uma concentração inicial de D-xilose menor (24 g/L) e um k_{LA} mais baixo ($0,82 \text{ h}^{-1}$), atinge uma alta conversão de D-xilose ($Y_{P/S} = 0,631 \text{ g/g}$), o que demonstra sua eficiência na utilização de substrato. Além disso, seu tempo de fermentação de 72 horas é inferior ao de outras leveduras, como *Meyerozyma caribbica* e *Kluyveromyces marxianus*, que requerem até 96 horas. A combinação de menor necessidade de oxigênio, uso eficiente do substrato e tempo de fermentação reduzido faz de *S. boniae* uma excelente candidata para processos industriais de produção de xilitol, especialmente onde economia de energia e menor custo de operação são importantes. Um fator importante que diferencia *S. boniae* das outras leveduras é que ela não necessitou de uma etapa de destoxificação do meio antes da fermentação, enquanto outros estudos, como o de Palladino *et al.* (126), destacam a necessidade de remover inibidores, como o ácido acético, para maximizar a produção de xilitol.

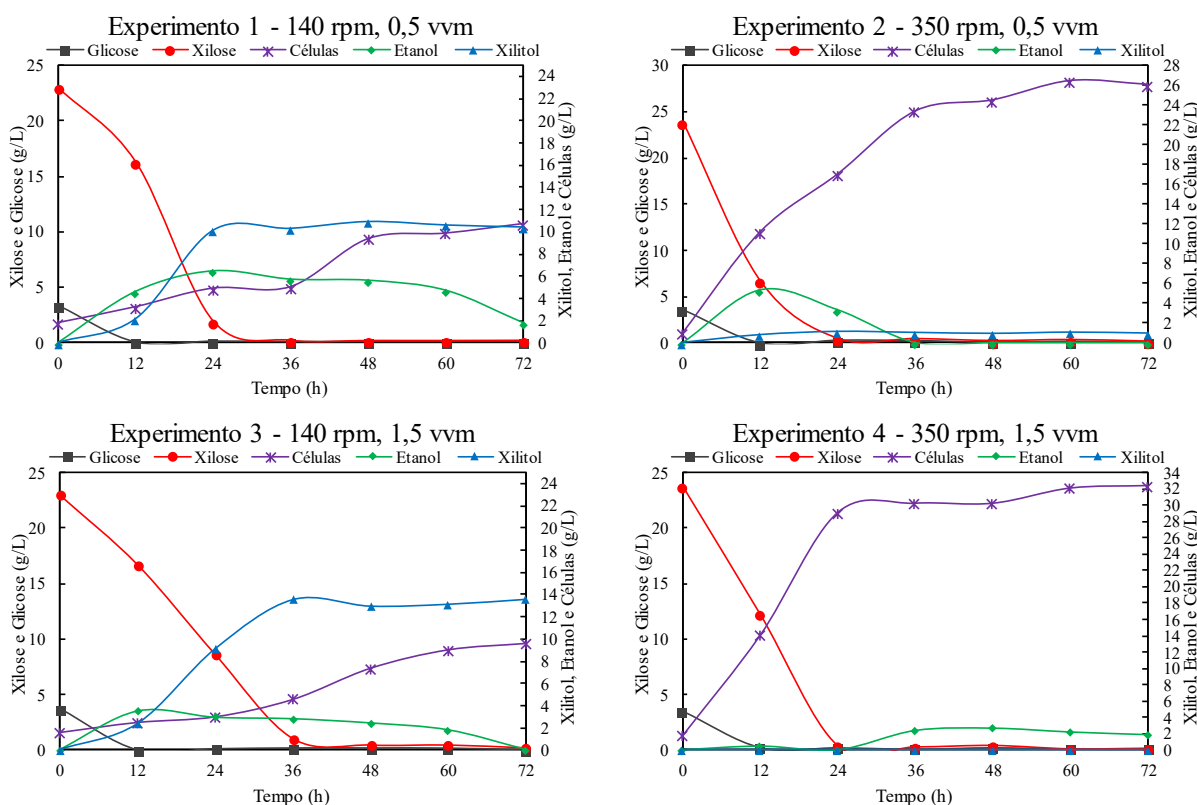


Figura 27. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central rotacional para o estudo das variáveis independentes agitação e aeração, experimentos 1 ao 4.

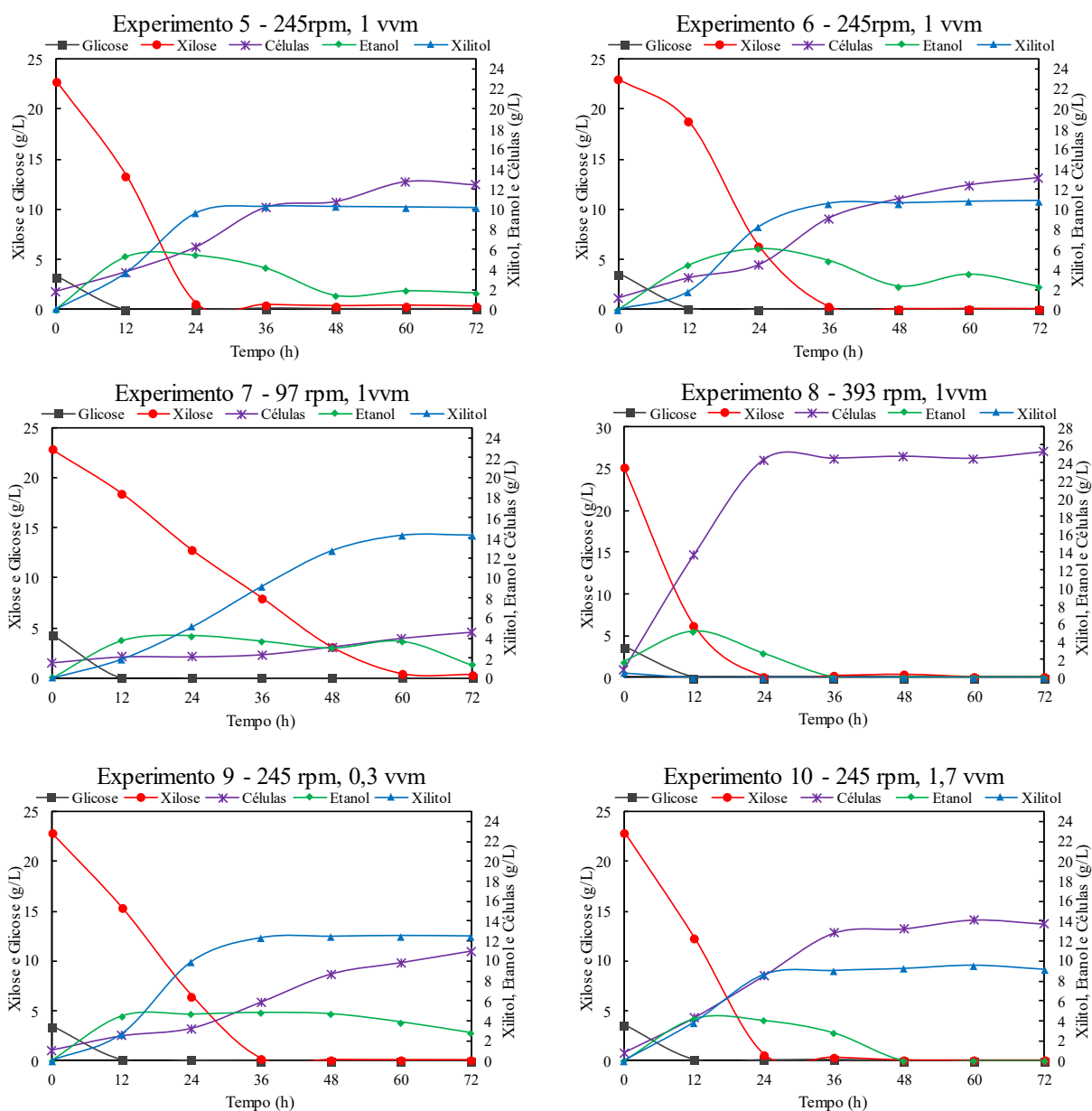


Figura 28. Crescimento celular, consumo de D-xilose e D-glucose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central rotacional para o estudo das variáveis independentes agitação e aeração, experimentos 5 e 10.

8.4.2 Estudo do CO₂ durante a fermentação em biorreator de bancada pela levedura *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306

Para melhor compreender o perfil metabólico e a relação entre a produção de CO₂ e os processos de conversão de D-xilose em xilitol, etanol e biomassa foi

investigado a formação de CO₂ ao longo da fermentação conduzida pela levedura *S. boniae*

Como pode ser observado nas Figuras 29 e 30, os experimentos com a rotação no nível superior (Experimentos 2, 4 e 8) mostraram maiores formações de CO₂ nas primeiras 12 horas, seguido de uma queda nas concentrações nas horas subsequentes. Como pode ser observado no experimento 2 (350 rpm, 0,5 vvm) ocorreu a formação de um pico de CO₂ nas primeiras 12 horas, alcançando 23,27 g/L, e posteriormente há um decréscimo acentuado na concentração, atingindo 0,29 g/L ao final do experimento. No experimento 4 (350 rpm, 1,5 vvm) há a presença de um pico inicial de 6,68 g/L de CO₂ às 12 horas, seguido de um decréscimo rápido para valor de (0,12 g/L) em 72 horas. Já no experimento 8 (393 rpm, 1 vvm) há a formação CO₂ de 13,11 g/L em 12 horas de fermentação, seguido de uma queda atingindo 0,34 g/L em 72 horas. Essa diminuição brusca nas concentrações de CO₂ nesses experimentos está relacionada com a depleção das fontes de carbono a partir de 24 horas de fermentação, resultando em uma queda de atividade metabólica. Como já observado anteriormente, esses experimentos foram os que apresentaram as maiores taxas de crescimento celular, indicando que em condições aeróbias o metabolismo da levedura é direcionado para divisão celular. Sob condições aeróbias, toda a D-xilose é reduzida a xilitol usando NADPH como cofator, o NADPH é regenerado a partir de NADP por meio da via das pentoses fosfato, e todo o xilitol é oxidado a D-xilulose usando NAD⁺ como cofator, e o NAD⁺ é regenerado a partir de NADH via cadeia respiratória (167). Além disso, nos experimentos 2 e 4 o oxigênio dissolvido (DO) aumenta rapidamente após 12 horas, atingindo picos de 17,8% e 20,1 % respectivamente, e depois volta a diminuir. Esses picos indicam que o consumo de oxigênio diminuiu após o período inicial de alta atividade metabólica e também, pela depleção das fontes de carbono.

Por outro lado, em condições de rotação no nível inferior (Experimentos 1, 3 e 7) há uma menor formação de CO₂ e uma maior formação de xilitol.

No experimento 1 (140 rpm, 0,5 vvm) o CO₂ aumentou significativamente até 24 horas, atingindo um valor de 4,68 g/L, antes de decrescer progressivamente até 0,84 g/L em 72 horas. O oxigênio dissolvido (DO) atingiu 2,8 % em 12 horas de fermentação e se manteve estável até 36 horas, diminuindo para 1,4% em 72 horas. Nesse experimento, também, foi observado um esgotamento das fontes de carbono em 24 horas de fermentação o que justifica a queda de CO₂ após esse período.

No experimento 3 (140 rpm, 1,5 vvm) a emissão de CO₂ é significativamente menor comparada ao Experimento 1 (140 rpm, 1,5 vvm), alcançando concentrações de aproximadamente 1,16 g/L em 12 horas, com um decréscimo até 0,268 g/L em 72 horas. O oxigênio dissolvido (DO) variou pouco, começando em 0,8% e permanecendo estável em torno de 1,4% até o final da fermentação.

Como pode ser observado no experimento 7 (97 rpm, 1 vvm), há um acúmulo de CO₂ (1,05 g/L) em 12 horas de fermentação que diminui progressivamente até 0,39 g/L em 72 horas. Em rotação menos vigorosa há menos oxigênio disponível, o que pode limitar a regeneração de NAD⁺ via cadeia respiratória. O metabolismo seria então menos eficiente em oxidar o xilitol, sendo observado um acúmulo maior de xilitol e um processo mais lento de consumo de D-xilose.

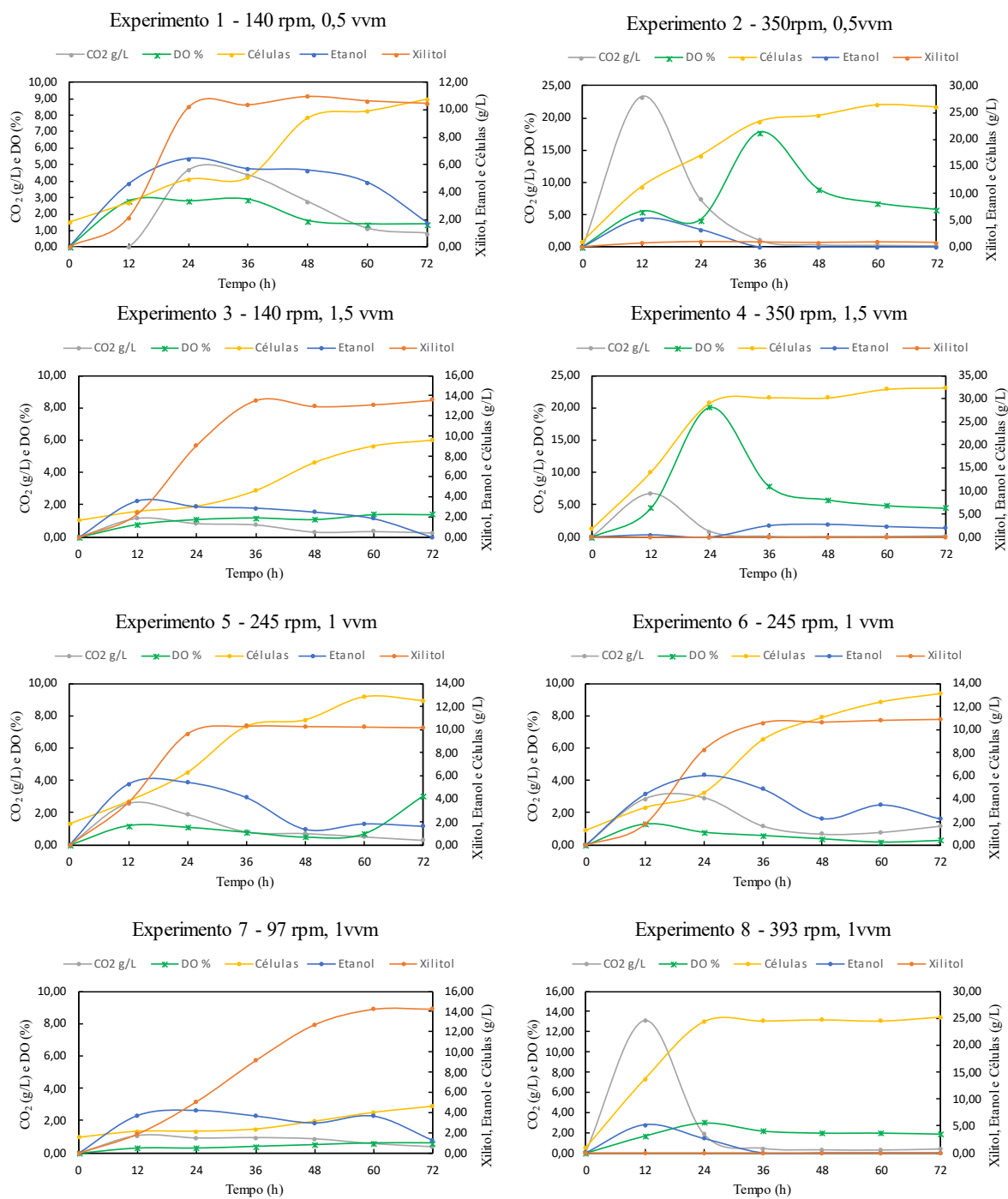


Figura 29. Concentrações de CO₂, oxigênio dissolvido (OD), crescimento celular, etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central, experimentos 1 ao 8.

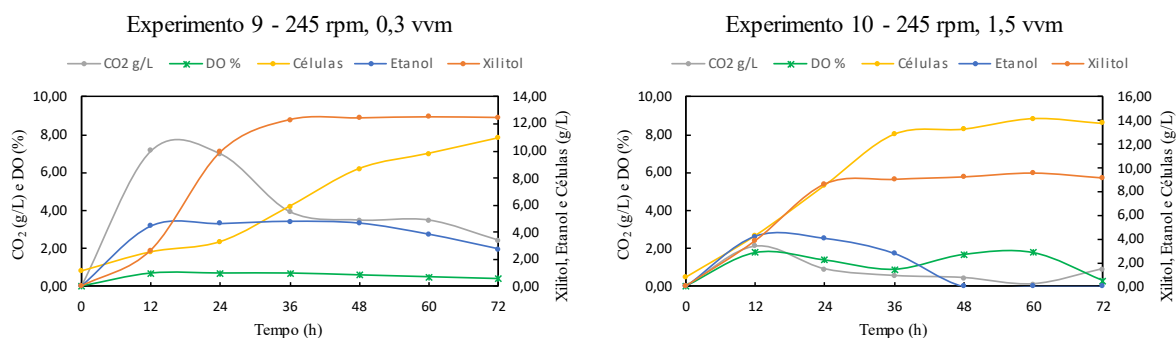


Figura 30. Concentrações de CO₂, oxigênio dissolvido (OD), crescimento celular, etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* de acordo com planejamento composto central, experimentos 9 e 10.

8.4.3 Efeito da agitação e aeração nas atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)

Com o objetivo de obter uma análise complementar sobre o efeito da agitação e aeração na conversão de D-xilose em xilitol por *S. boniae*, foi analisado o comportamento de duas importantes enzimas envolvidas no metabolismo da D-xilose, xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Na literatura científica, não há informações sobre a influência da agitação e aeração sobre as enzimas do metabolismo da D-xilose pela levedura *Spathaspora boniae* na fermentação do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar.

A avaliação dos comportamentos de XR e XDH durante a bioconversão de D-xilose em xilitol/etanol são apresentados nas Figuras 31 e 32. A atividade das enzimas XR e XDH foram realizadas com os cofatores NADPH e NAD⁺, respectivamente. Uma vez que no estudo realizado por Morais *et al.* (67) mostra que atividade dessas enzimas foram detectadas na presença desses cofatores, sendo a maior atividade da XR pelo NADPH e a atividade da XDH estritamente dependente de NAD⁺.

A maior produção de xilitol em relação ao etanol observada nos experimentos, sessão 8.4.1, pode ser explicada pelo tipo de dependência de cofatores da via metabólica envolvida. Uma vez que microrganismos que possuem XR dependente de NADH são mais eficientes na produção de etanol, enquanto aqueles com dependência de NADPH tendem a acumular mais xilitol. Esse fenômeno está relacionado à atividade da XDH, que requer NAD⁺. A regeneração de NAD⁺ ocorre pela reoxidação do NADH via XR. Assim, quando o XR é dependente de NADH, o desequilíbrio redox na via é menor, favorecendo a produção de etanol. Em contrapartida, uma XR

dependente de NADPH provoca um maior desequilíbrio redox, devido à limitada regeneração de NAD^+ , o que interrompe a via e aumenta a excreção de xilitol (168).

A disponibilidade de oxigênio é o fator mais importante em termos de produção de xilitol a partir de D-xilose pelas leveduras. Pois, sob condições limitadas de oxigênio, a cadeia transportadora de elétrons não é capaz de reoxidar todo o NADH gerado. Portanto, a concentração intracelular de NADH está aumentando, resultando no acúmulo de xilitol, mas também diminui a produção de energia e a formação de intermediários de carbono, afetando o crescimento celular. (169,155). Em outras palavras, o acúmulo de xilitol é promovido por uma restrição na disponibilidade de oxigênio, condição na qual a atividade do XDH é limitada devido a um desequilíbrio redox NADH/NAD^+ , resultando na redução da formação de xilulose.

Como pode ser observado nas Figuras 30 e 31, a atividade de XR aumentou durante o curso da fermentação para atingir um máximo, então diminuiu até o final do processo fermentativo. Uma observação interessante foi que o valor máximo de XR diminuiu com o aumento da agitação, como pode ser observado nos experimentos 2, 4 e 8 (Figura 31). O alto valor de XR no início da fermentação (tempo 0h) pode ser atribuído ao fato de que as células utilizadas vieram de um pré-inóculo contendo D-xilose (YPX) (Arruda et al., 2011).

A atividade da xilose redutase ligada ao NADPH (redução da D-xilose para xilitol) foi considerada máxima em uma agitação de 97 rpm e aeração de 1 vvm (Experimento 7, Figura 31). O alto nível de atividade da xilose redutase ($1,501 \text{ U mg}_{\text{prot}}^{-1}$) nesse experimento foi obtido em 36 horas de fermentação resultando na máxima produção de xilitol nessa condição. Assim o experimento 7 foi que apresentou a maior produção de xilitol de $14,23 \text{ g/L}$ ($Y_{P/S} = 0,631 \text{ g/g}$, $Q_P = 0,198 \text{ g/L.h}$) e a maior atividade da enzima XR. O experimento 2 foi o que apresentou a menor produção de xilitol de $0,97 \text{ g/L}$. A maior atividade da enzima XR observada nesse experimento foi de $0,048 \text{ U mg}_{\text{prot}}^{-1}$ em 12 horas de fermentação. Dessa forma, a atividade enzimática no Experimento 7 foi aproximadamente 31 vezes maior que no Experimento 2. Isso sugere que com uma atividade enzimática significativamente mais elevada no Experimento 7, há uma maior eficiência na redução da D-xilose, resultando em um maior acúmulo de xilitol.

Estes resultados estão de acordo os obtidos por Milessi *et al.* (170) que observou que a produção máxima de XR ($2,5 \text{ U mg}_{\text{prot}}^{-1}$) foi obtida com o nível baixo de oxigênio dissolvido (20%) e a atividade enzimática diminuiu com altos valores de

oxigênio dissolvido. No trabalho realizado por Branco *et al.* (164), também foi observado o mesmo efeito, os autores investigaram o impacto do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) na atividade das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), e constataram que a maior taxa de XR ($1,45 \text{ U mg}_{\text{prot}}^{-1}$) foi registrada no experimento com o menor valor de k_La . Eles identificaram que a atividade máxima de XR reduziu à medida que o k_La aumentava. Os autores concluíram que esse efeito provavelmente ocorre devido a um desvio no metabolismo da levedura, de produção de xilitol para crescimento celular, já que, com maior disponibilidade de oxigênio, as células tendem a priorizar a síntese de aminoácidos, enzimas e proteínas. O estudo realizado por Pinzón *et al.* (128) também demonstrou que condições de limitação de oxigênio e baixas taxas de agitação favoreceram a maior concentração de xilose redutase (XR) ao longo da fermentação. As condições operacionais mais eficientes foram 30% de oxigênio dissolvido (OD) e 50 rpm, resultando em um consumo de 95,5% da D-xilose e uma produção máxima de xilitol de 5,46 g/L. A atividade enzimática de XR atingiu seu pico ($0,646 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína) após 144 horas de fermentação sob essas condições, sugerindo que o ambiente com oxigênio limitado e agitação controlada otimiza tanto o consumo de D-xilose quanto a produção de xilitol, mantendo uma alta eficiência do processo fermentativo.

Em relação a atividade da enzima xilitol desidrogenase observou-se que nas condições de maiores agitações foi obtido uma maior atividade dessa enzima em relação a xilose redutase como pode ser observado na Figura 31 (Experimentos 2, 4 e 8), ou seja, nesses experimentos foi obtido uma razão XR/XDH inferior a 1. Esse comportamento corrobora com o estudo de Gurpilhares *et al.* (171), que indicam que valores de razão XR/XD acima de 1 refletem uma maior atividade de XR em comparação à XDH, favorecendo a produção de xilitol. Cepas com uma relação XR/XDH menor produzem menos xilitol em comparação com aquelas que possuem uma razão mais elevada (172). Portanto, nos experimentos realizados em alta rotação, a baixa razão XR/XD favoreceu o menor acúmulo de xilitol e, conseqüentemente, um desvio do metabolismo para a produção de biomassa celular apresentando baixo ou nenhum acúmulo de etanol ao final de 72 horas de fermentação. Isso ocorre porque quando há um suprimento excessivo de oxigênio, o NADH gerado na conversão de xilitol em xilulose é reoxidado pela cadeia respiratória, e o xilitol é utilizado para o crescimento celular (122).

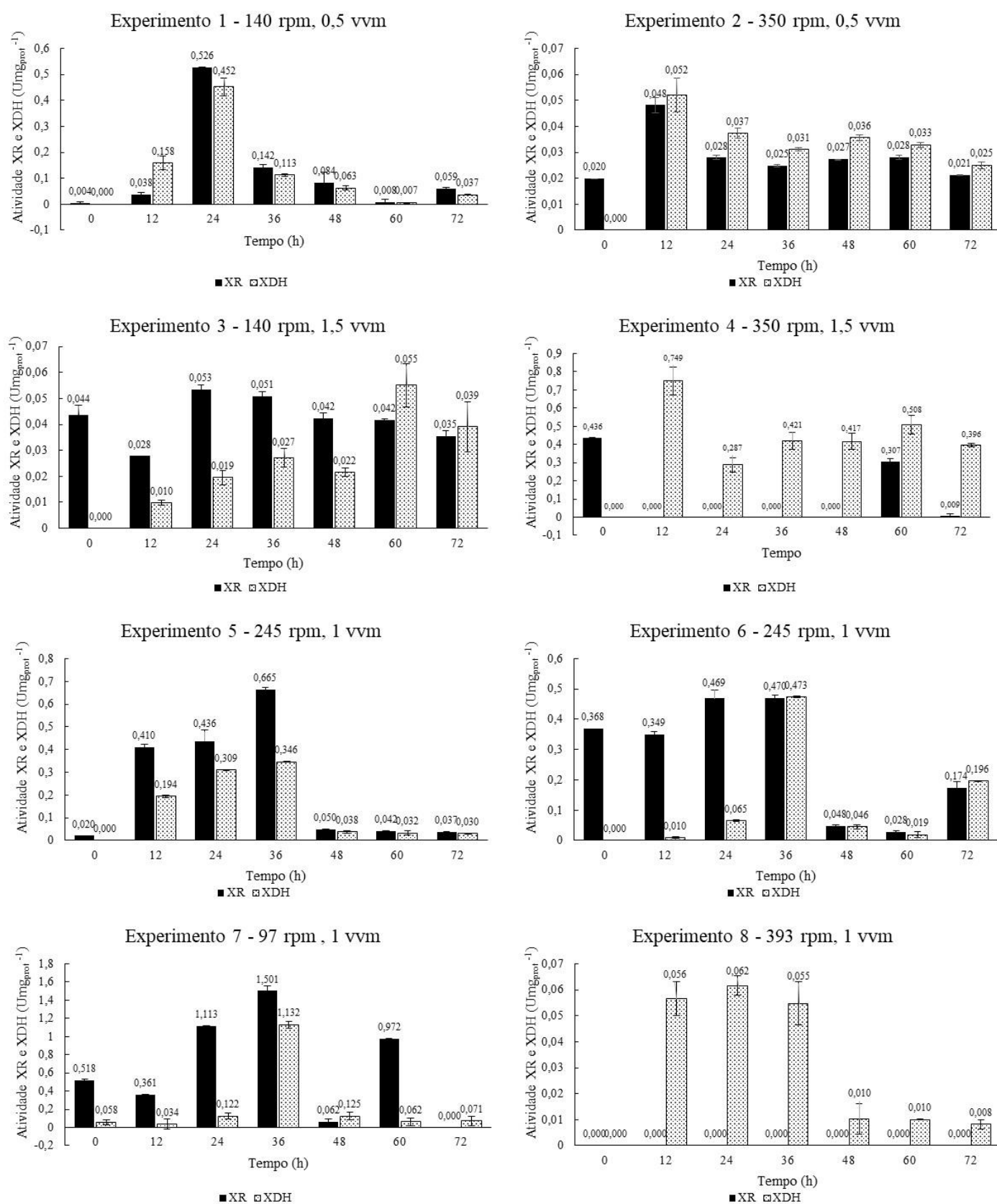


Figura 31. Influência da aeração e agitação na atividade específica máxima de XR e XDH de *Spathaspora boniae* na fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação, experimentos 1 ao 8.

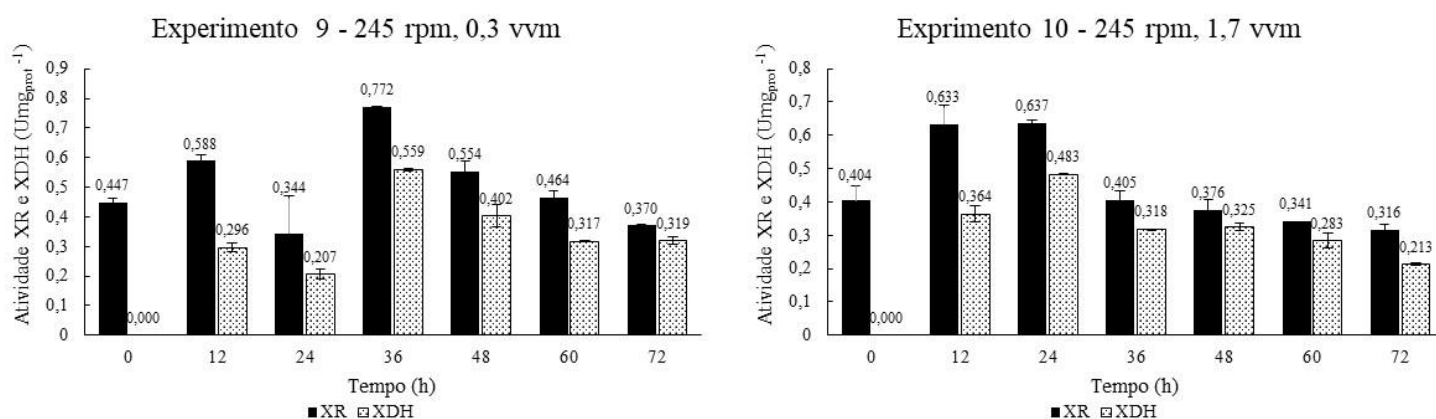


Figura 32. Influência da aeração e agitação na atividade específica máxima de XR e XDH de *Spathaspora boniae* na fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação, experimentos 9 e 10.

8.4.4 Otimização das variáveis agitação e aeração para maximização de xilitol pela levedura *Spathaspora boniae* UFMG-CM-Y306

A influência das variáveis agitação e aeração na fermentação a partir de hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar pela levedura *S. boniae*, sobre o parâmetro fermentativo produção de xilitol, foi estudada de maneira mais detalhada utilizando-se a metodologia estatística apresentada a seguir. Assim, foi realizado a otimização da condição de fermentação em biorreator de bancada.

No gráfico de Pareto (Figura 33), observou-se que para a produção de xilitol, apenas a variável agitação (L) apresentou efeito significativo. A variável agitação (Q), aeração (L e Q) e a interação agitação e aeração não apresentaram significância, confirmando as análises anteriores do item 8.4.1 sobre o consumo de açúcares, crescimento celular e produção de xilitol e etanol do processo fermentativo.

A Tabela 18 apresenta os resultados da análise de variância do modelo de regressão (ANOVA) para a resposta de produção de xilitol (g/L) com o coeficiente de correlação para *S. boniae* ($R^2 = 0,9253$, $R^2_{adj} = 0,8320$), mostrando que o modelo pode explicar 92,53% da variabilidade da resposta. Além disso, o modelo proposto foi significativo, e o teste de falta de ajuste não foi estatisticamente significativo (p -valor $>0,05$), indicando a capacidade do modelo ajustado em prever a resposta.

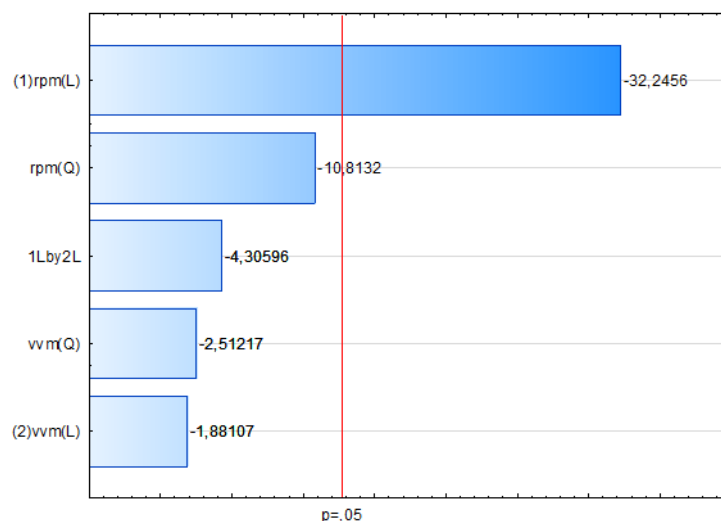


Figura 33. Gráfico de Pareto, estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) da variável resposta concentração de xilitol (g/L) de acordo com o Planejamento composto central rotacional pela levedura *Spathaspora boniae*.

Tabela 18. Análise de variância da regressão para o modelo da produção de xilitol (g/L) em biorreator de bancada para *Spathaspora boniae*.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F Calculado	p-Valor	Teste
Regressão	265,7397	5	53,1479	9,9138	0,0225976332	Significativo
Resíduos	21,4440	4	5,3610			
Falta de ajuste	21,2196	3	7,0732	31,5134	0,1300	Não Significativo
Erro Puro	0,2245	1	0,2245			
Total	287,1838	9				

$R^2 = 0,9253$, $R^2_{adj} = 0,8320$

A análise de regressão foi utilizada para ajustar a função resposta de produção de xilitol (g/L) com os dados experimentais, que é representado por equação polinomial de segunda ordem para *S. boniae* (Eq. 10). A Figura 34 apresenta os valores preditos pelo modelo em comparação com os valores observados, evidenciando uma boa concordância entre os resultados experimentais e os previstos para a levedura *Spathaspora boniae*.

$$\text{Xilitol (g L}^{-1}\text{)} = 3,71 + 0,07 \times x_1 - 0,00022 \times x_1^2 + 8,64 \times x_2 - 2,261 \times x_2^2 - 0,02 \times x_1 \times x_2 \quad (10)$$

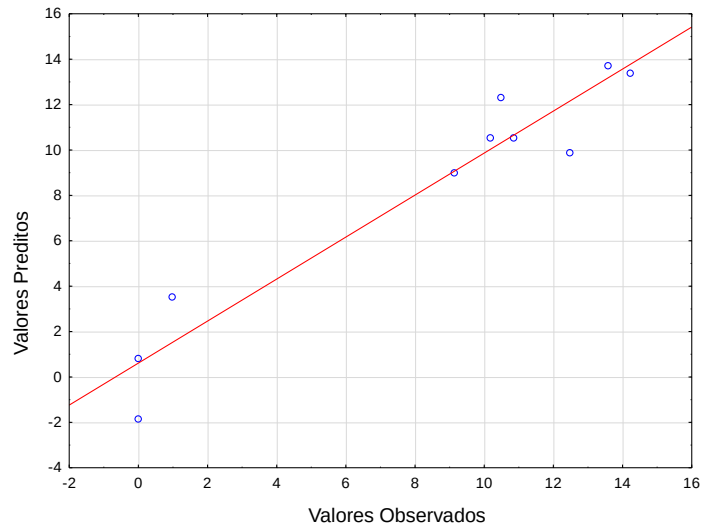


Figura 34. Valores preditos em função dos observados em relação a produção de xilitol pela levedura *Spathaspora boniae* no planejamento composto central rotacional.

Os gráficos de superfície de resposta e superfície de contorno mostram que para *S. boniae* (Figura 35) o aumento da aeração até valores entre 1,4 e 1,6 vvm e a diminuição do rpm entre valores de 50 e 100 favorecem a produção de xilitol (g/L) pela levedura *S. boniae* em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de cana-de-açúcar.

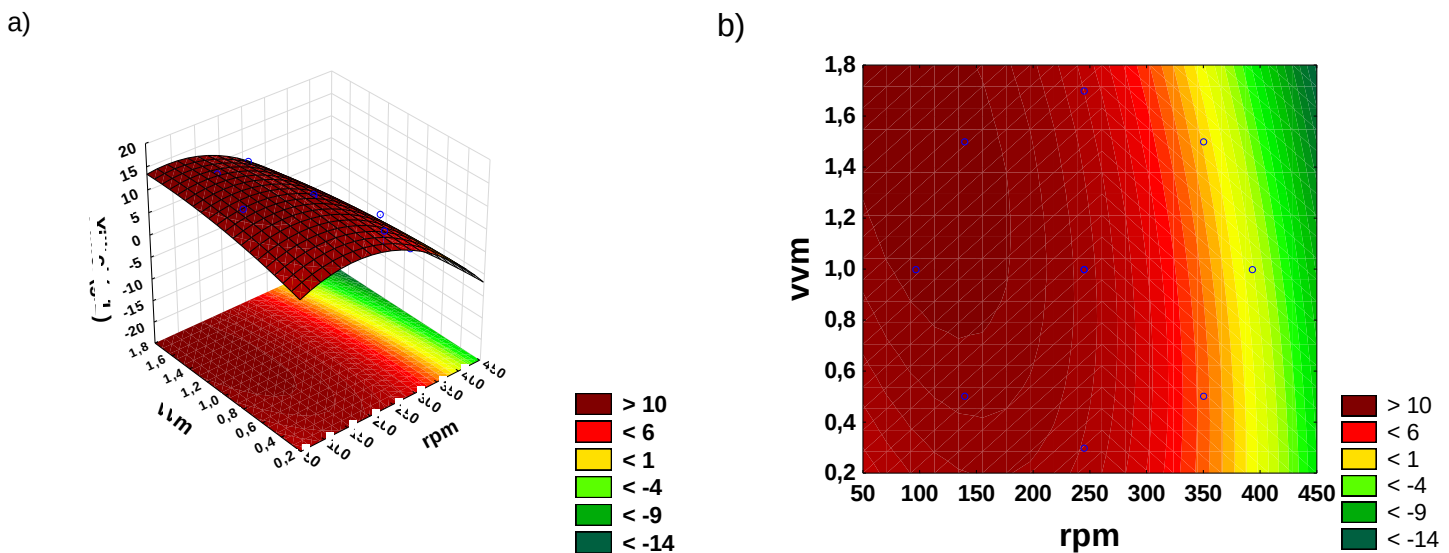


Figura 35. Gráfico de Superfície de resposta (a) e superfície de contorno (b) para a produção de xilitol em função das variáveis independentes agitação (rpm) e aeração (vvm).

Conforme ilustrado na Figura 36, a função de desejabilidade, que estima a melhor combinação de fatores para obter a resposta ideal dentro da região estudada, previu uma produção otimizada de xilitol de 13,96 g/L para a levedura *Spathaspora*

boniae. Como resultado, as condições ótimas das variáveis para *Spathaspora boniae* foram estimadas em 97 rpm e 1,5 vvm.

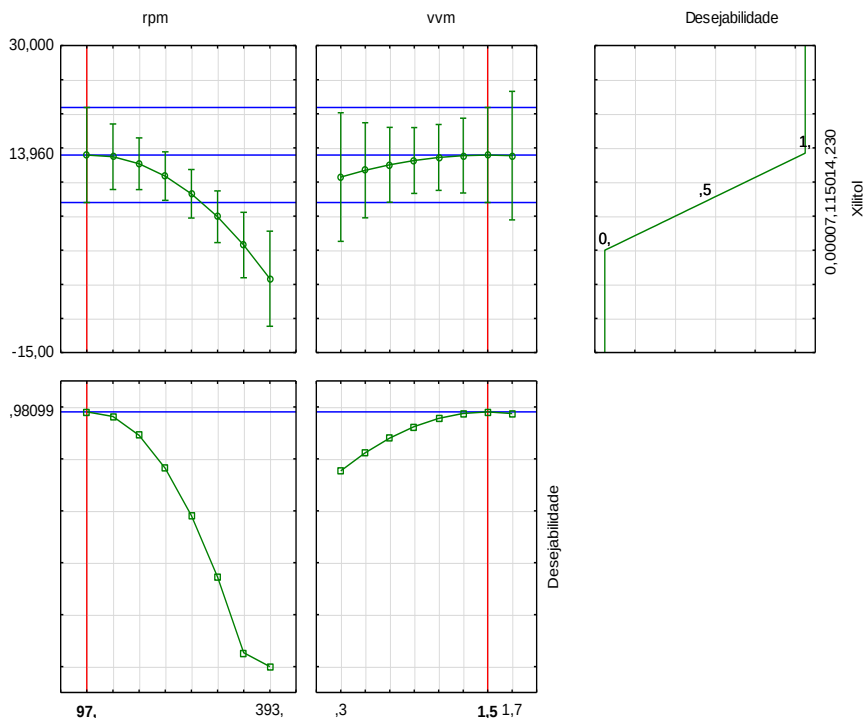


Figura 36. Perfis para valores previstos e desejabilidade para a produção de xitol pela levedura *Spathaspora boniae* em biorreator de bancada.

8.4.5 Validação do modelo

Para a validação do modelo, foi realizado um experimento de fermentação em biorreator de bancada, em triplicata, utilizando o hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar. As condições operacionais escolhidas foram 200 rpm e 1 vvm, diferentes daquelas previamente avaliadas, com o objetivo de testar a capacidade do modelo em prever de forma eficaz a resposta. Nessas novas condições, o modelo estimou uma produção de 12,43 g/L de xitol. Na Tabela 19 estão apresentados os valores de conversão de D-xilose em xitol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (Q_P) e concentração final de xitol e etanol para *S. boniae*. A produção de xitol obtida experimentalmente de 12,90 g/L ($Y_{P/S} = 0,554$ g/g, $Q_P = 0,179$ g/L/h) correspondeu a 100% do valor estimado pelo modelo, sendo este então validado para a levedura. Sendo assim, o modelo proposto consegue prever a variável resposta produção de xitol (g/L) em função das variáveis independentes agitação e aeração.

A Figura 37 apresenta uma comparação entre o perfil fermentativo da levedura *S. boniae* no experimento com máxima produção de xilitol (Experimento 7) e após a otimização das variáveis agitação e aeração. Como mostrado na Figura 37, o consumo total de D-glicose ocorreu em 12 horas de fermentação em ambos os experimentos. Diferentemente do observado no Experimento 7 (Figura 37b), no experimento de validação da otimização (200 rpm e 1 vvm), o consumo de D-xilose foi mais rápido, completando-se em 36 horas de fermentação. O xilitol aumentou à medida que a D-xilose foi metabolizada, atingindo a produção máxima em 36 horas, com a produção de etanol ocorrendo concomitantemente, indicando que a fermentação alcoólica também estava ocorrendo. Observa-se também que parte do etanol foi consumido ao longo da fermentação devido ao esgotamento dos açúcares (Figura 37a). Além disso, houve uma maior produção de biomassa celular (10,84 g/L) em comparação ao Experimento 7 ao final de 72 horas. A Figura 38 mostra a atividade enzimática das enzimas XR e XDH ao longo da fermentação no experimento de validação do modelo. Como pode ser observado, a razão XR/XDH foi superior a 1 em todos os tempos do experimento indicando que a houve maior atividade da enzima XR em relação a XDH. Dessa forma, o metabolismo de assimilação da D-xilose está mais direcionado para o acúmulo de xilitol ao longo da fermentação.

Tabela 19. Resultados obtidos utilizando as condições definidas para validação do modelo do planejamento composto central rotacional durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar pela *Spathaspora boniae*.

Leveduras	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	(g/L)
Xilitol			
<i>Spathaspora boniae</i>	0,554± 0,036	0,179± 0,004	12,90± 0,289
Etanol			
<i>Spathaspora boniae</i>	0,046± 0,066	0,018± 0,025	1,28± 1,811

Fonte: elaborado pelo Autor (2024).

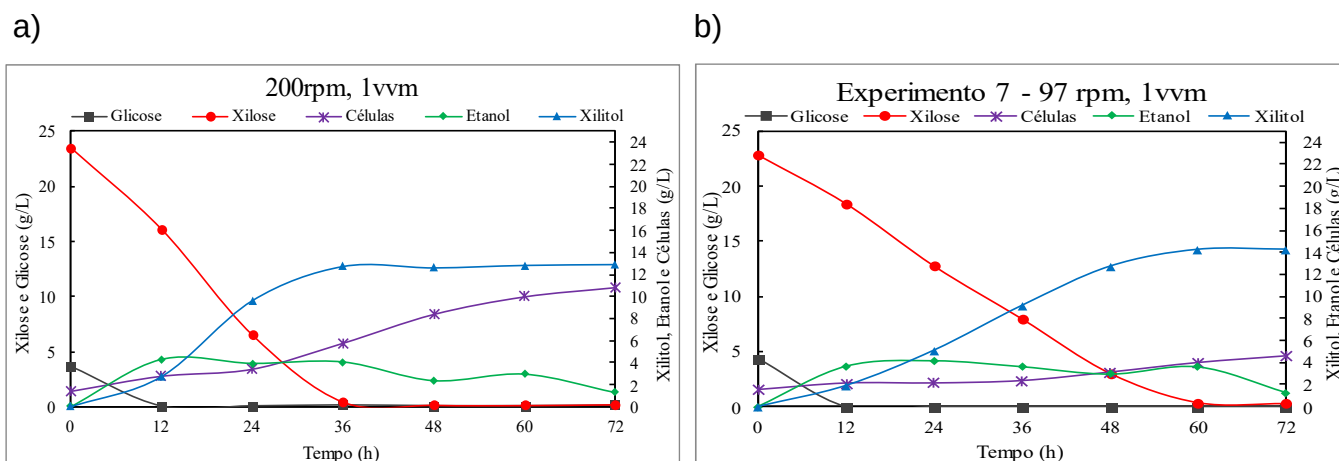


Figura 37 Crescimento celular, consumo de xilose e glicose, produção de etanol e xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de biomassa da cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora boniae* no (a) experimento de validação da otimização do planejamento composto central rotacional para (b) o estudo das variáveis independentes agitação e aeração.

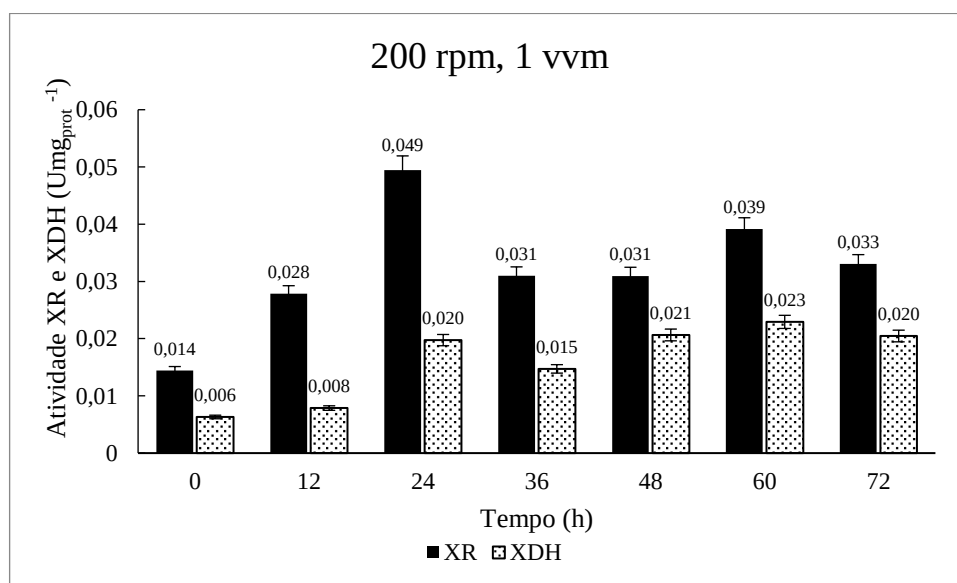


Figura 38 . Influência da aeração e agitação na atividade específica máxima de XR e XDH de *Spathaspora boniae* na fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar sem destoxificação para o experimento de validação do modelo.

9 CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho conclui-se que:

- As leveduras *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* isoladas de biomas brasileiros foram capazes de fermentar açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico da biomassa de cana-de-açúcar, tendo o xilitol como principal produto e o etanol como subproduto. A *Spathaspora boniae*, em particular, mostrou-se capaz de crescer em hidrolisado não detoxificado, destacando-se por sua maior resistência aos inibidores presentes no meio, o que evidencia seu potencial para aplicações industriais.
- A maximização da produção de xilitol por *Spathaspora boniae* e *Spathaspora brasiliensis* foi alcançada com diferentes combinações de fontes de nitrogênio. Enquanto a *S. boniae* produziu 9,74 g/L ($Y_{P/S} = 0,455$ g/g, $Q_P = 0,135$ g/L.h) de xilitol sob condições otimizadas, a *S. brasiliensis* atingiu uma produção superior, de 10,11 g/L ($Y_{P/S} = 0,473$ g/g, $Q_P = 0,140$ g/L.h) de xilitol. Portanto, é fundamental ajustar cuidadosamente as concentrações de ureia, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio para otimizar a fermentação e a produção de xilitol por diferentes espécies de leveduras.
- A otimização da produção de xilitol por *Spathaspora boniae* exige um equilíbrio entre agitação e aeração, com baixas rotações e aeração moderada sendo as condições ideais. Nessas condições, a levedura demonstrou alta eficiência de conversão de D-xilose em xilitol ($Y_{P/S} = 0,631$ g/g), uso eficiente do substrato e menor tempo de fermentação (72 horas), superando outras leveduras em simplicidade operacional e economia de energia, além de não exigir destoxificação do meio.
- A análise das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) mostrou que baixas taxas de agitação e aeração favorecem a produção de xilitol por *Spathaspora boniae*, devido ao maior desequilíbrio redox que aumenta a atividade de XR. Em condições de alta agitação, a atividade de XDH

supera a de XR, desviando o metabolismo para o crescimento celular, o que reduz a produção de xilitol. Portanto, o controle da oxigenação é essencial para otimizar a bioconversão de D-xilose em xilitol.

- A produção de xilitol e etanol a partir de resíduos da biomassa de cana-de-açúcar promove o uso eficiente de recursos renováveis, alinhando-se ao ODS 7, que busca fomentar o uso de energia limpa e sustentável, contribuindo para uma economia mais verde.

REFERÊNCIAS

- ¹CHEN, Z. et al. Exploitation of lignocellulosic-based biomass biorefinery: A critical review of renewable bioresource, sustainability and economic views. **Biotechnology Advances**, v. 69, n. June, p. 108265, 2023.
- ²WANG, S. et al. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33–86, 2017.
- ³MARRIOTT, P. E.; GÓMEZ, L. D.; MCQUEEN-MASON, S. J. Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1366–1381, 2016.
- ⁴RAO, J. et al. Hemicellulose: Structure, chemical modification, and application. **Progress in Polymer Science**, v. 140, p. 101675, 2023.
- ⁵WANG, S.; LUO, Z. **Pyrolysis of biomass**. [s.l.] Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2016. v. 1
- ⁶VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 4, p. 203–209, 2004.
- ⁷NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 28–41, 2018.
- ⁸ZHOU, X. et al. A critical review on hemicellulose pyrolysis. **Energy Technology**, v. 5, n. 1, p. 52–79, 2017.
- ⁹SUN, D. et al. Effects of hydrothermal pretreatment on the dissolution and structural evolution of hemicelluloses and lignin: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 281, p. 119050, 2022.
- ¹⁰PENG, F. et al. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.
- ¹¹CHEN, Z. et al. Hemicellulose degradation: An overlooked issue in acidic deep eutectic solvents pretreatment of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops and Products**, v. 187, n. July, 2022.
- ¹²LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.
- ¹³BALAT, M. et al. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 12, p. 3147–3157, 2009.

- ¹⁴TEN, E.; VERMERRIS, W. Functionalized polymers from lignocellulosic biomass: State of the art. **Polymers**, v. 5, n. 2, p. 600–642, 2013.
- ¹⁵CHEN, H.; CHEN, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. **Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice**, p. 25–71, 2014.
- ¹⁶UDDIN, N. et al. Lignin developmental patterns and Casparian strip as apoplastic barriers: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 129595, 2024.
- ¹⁷KHAIRE, K. C.; MOHOLKAR, V. S.; GOYAL, A. Bioconversion of sugarcane tops to bioethanol and other value added products: An overview. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 54–68, 2021.
- ¹⁸SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015.
- ¹⁹DUVAL, A.; LAWOKO, M. A review on lignin-based polymeric, micro-and nano-structured materials. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 78–96, 2014.
- ²⁰TONG, Y. et al. A review on the overall process of lignin to phenolic compounds for chemicals and fuels: From separation and extraction of lignin to transformation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 181, p. 106663, 2024.
- ²¹CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira 2023/2024. **Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)**, v. 11, n. 2318 6852, p. 110, 2024.
- ²²FIORANELLI, A.; BIZZO, W. A. Generation of surplus electricity in sugarcane mills from sugarcane bagasse and straw: Challenges, failures and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 186, p. 113647, 2023.
- ²³SILVA, V. S.; DE ALMEIDA GARCIA, C.; DA SILVA, C. M. O destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do paraná. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 59–76, 2010.
- ²⁴UNICADATA. **BIOELETRICIDADE EM NÚMEROS**. Disponível em: <<https://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=134>>.
- ²⁵SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.
- ²⁶COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA 1  LEVANTAMENTO SAFRA 2023/24 CANA-DE-AÇÚCAR. v. 11, 2023.

- ²⁷LISBOA, I. P. et al. Applying Soil Management Assessment Framework (SMAF) on short-term sugarcane straw removal in Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 175–184, 2019.
- ²⁸PIMENTEL, M. L. et al. Quantity, quality and physical protection of soil carbon associated with sugarcane straw removal in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 237, p. 105976, 2024.
- ²⁹SANTOS, F. A. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. **Química Novascielo**, , 2012.
- ³⁰GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.
- ³¹AGUIAR, A. et al. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, p. 105896, 2021.
- ³²LIAO, J. C. et al. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 288–304, 2016.
- ³³CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015.
- ³⁴ROSALES-CALDERON, O.; ARANTES, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 240, 2019.
- ³⁵VENKATESWAR RAO, L. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299–310, 2016.
- ³⁶GARCÍA MARTÍN, J. F.; SÁNCHEZ, S.; CUEVAS, M. Evaluation of the effect of the dilute acid hydrolysis on sugars release from olive prunings. **Renewable Energy**, v. 51, p. 382–387, 2013.
- ³⁷SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- ³⁸JAIN, V.; GHOSH, S. Biotransformation of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 11, p. 9643–9661, 2023.
- ³⁹UNREAN, P.; KETSUB, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. April, p. 238–246, 2018.

- ⁴⁰ZAHED, O. et al. Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a membrane bioreactor. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 3, p. 179–189, 2016.
- ⁴¹MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1596–1601, 2013.
- ⁴²DE ALMEIDA, S. G. C. et al. Biochar production from sugarcane biomass using slow pyrolysis: Characterization of the solid fraction. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 179, p. 109054, 2022.
- ⁴³SOUZA, J. P. et al. Fermentation of Sugarcane Biomass Hemicellulosic Hydrolysate by Yeast-Producer of Xylitol and Ethanol Isolated from the Atlantic Forest and the Brazilian Amazon Forest. **Waste and Biomass Valorization**, 2024.
- ⁴⁴KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 15 abr. 2009.
- ⁴⁵MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.
- ⁴⁶JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.
- ⁴⁷VENKATESWAR RAO, L. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299–310, 2016.
- ⁴⁸LIMA, L. H. A. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 734–738, 2004.
- ⁴⁹SILVA, D. D. V. et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 248–254, 2004.
- ⁵⁰CASEY, E. et al. 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.
- ⁵¹RAO, R. S. et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresource technology**, v. 97, n. 15, p. 1974–1978, 2006.

- ⁵²PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 1, p. 18–24, 1997.
- ⁵³MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. **Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** scielo , , 2002.
- ⁵⁴NILVEBRANT, N. O. et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 91–93, p. 35–49, 2001.
- ⁵⁵RIBEIRO, M. et al. Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 2, p. 132–138, 2001.
- ⁵⁶MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 20, p. 1681–1684, 2001.
- ⁵⁷LEE, W. G. et al. Ethanol Production Using Concentrated Oak Wood Hydrolysates and Methods to Detoxify BT - Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Presented as Volumes 77–79 of Applied Biochemistry and Biotechnology Proceedings of the Twentieth Sympo. In: DAVISON, B. H.; FINKELSTEIN, M. (Eds.). Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 547–559.
- ⁵⁸SARAWAN, C. et al. Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 286, p. 121403, 2019.
- ⁵⁹MARTON, J. M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9–21, 2006.
- ⁶⁰MARTINEZ-JIMENEZ, F. D. et al. Exploiting the Non-conventional Yeast *Spathaspora passalidarum* as a Platform for Hemicellulosic Hydrolysate Conversion into Bioproducts: a Mini Review. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 2, p. 689–708, 2021.
- ⁶¹ALI, S. S. et al. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0181141, 13 jul. 2017.
- ⁶²NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232–1241, 2006.

- ⁶³CADETE, R. M. et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43135, 13 ago. 2012.
- ⁶⁴VERAS, H. C. T. et al. Metabolic flux analysis for metabolome data validation of naturally xylose-fermenting yeasts. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 58, 2019.
- ⁶⁵CADETE, R. M. et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.
- ⁶⁶CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 421–431, 2013.
- ⁶⁷MORAIS, C. G. et al. *Spathaspora boniae* sp. nov., a D-xylose-fermenting species in the *Candida albicans*/*Iododermyces* clade. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 3798–3805, 2017.
- ⁶⁸GRANSTRÖM, T.; LEISOLA, M. Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 511–516, 2002.
- ⁶⁹BARBOSA, M. F. S. et al. Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 241–251, 1988.
- ⁷⁰YABLOCHKOVA, E. N. et al. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 414–417, 2003.
- ⁷¹KWAK, S. et al. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 271–283, 2019.
- ⁷²CADETE, R. M. et al. The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, 2016.
- ⁷³HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205–214, 2012.
- ⁷⁴DA SILVA, D. D. V.; DE ALMEIDA FELIPE, M. DAS G. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 7, p. 1294–1300, 1 jul. 2006.

- ⁷⁵MANZETTI, S.; ANDERSEN, O. A review of emission products from bioethanol and its blends with gasoline. Background for new guidelines for emission control. **Fuel**, v. 140, p. 293–301, 2015.
- ⁷⁶BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, p. 60–88, 2015.
- ⁷⁷JAIN, S.; KUMAR, S. A comprehensive review of bioethanol production from diverse feedstocks: Current advancements and economic perspectives. **Energy**, v. 296, p. 131130, 2024.
- ⁷⁸CAMPOS, V. J. et al. Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 977–990, 2022.
- ⁷⁹SHARMA, S.; ARORA, A. Tracking strategic developments for conferring xylose utilization/fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 50, 2020.
- ⁸⁰OJEDA, K.; SÁNCHEZ, E.; KAFAROV, V. Sustainable ethanol production from lignocellulosic biomass – Application of exergy analysis. **Energy**, v. 36, n. 4, p. 2119–2128, 2011.
- ⁸¹RECH, F. R. et al. Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 1, p. 83–92, 2019.
- ⁸²KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950–4962, 2011.
- ⁸³MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v. 54, n. 4, p. 603–613, 2000.
- ⁸⁴DELGADO ARCAÑO, Y. et al. Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. **Catalysis Today**, v. 344, n. April 2018, p. 2–14, 2020.
- ⁸⁵FELIPE HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. et al. Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 924–943, 3 out. 2019.
- ⁸⁶ZACHARIS, C. Xylitol. In: **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**. [s.l: s.n.]. p. 347–382.
- ⁸⁷SOLER, E. et al. Intranasal Xylitol for the Treatment of COVID-19 in the Outpatient Setting: A Pilot Study. **Cureus**, v. 14, n. 7, 2022.

- ⁸⁸DASGUPTA, D. et al. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, v. 197, p. 9–21, 2017.
- ⁸⁹MISRA, S. et al. Comparative study on different strategies involved for xylitol purification from culture media fermented by *Candida tropicalis*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 3, p. 266–273, 2011.
- ⁹⁰QUEIROZ, S. S. et al. Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 154, n. October 2021, p. 111789, 2022.
- ⁹¹DASGUPTA, D. et al. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, v. 197, p. 9–21, 2017.
- ⁹²WANG, S.-J.; ZHONG, J.-J. Chapter 6 - Bioreactor Engineering. In: YANG, S.-T. B. T.-B. FOR V.-A. P. FROM R. R. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 131–161.
- ⁹³MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.
- ⁹⁴MORAIS JUNIOR, W. G. et al. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. **Yeast**, v. 36, n. 5, p. 349–361, 2019.
- ⁹⁵DA SILVEIRA, F. A. et al. Isolation of xylose-assimilating yeasts and optimization of xylitol production by a new *Meyerozyma guilliermondii* strain. **International Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 325–334, 2020.
- ⁹⁶MORAIS JUNIOR, W. G. et al. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified JA2 strain. **Yeast**, v. 36, n. 5, p. 349–361, 1 maio 2019.
- ⁹⁷WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of d-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 4, p. 685–697, 1990.
- ⁹⁸NAKANISHI, S. C. et al. 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.
- ⁹⁹THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of nitrogen limitaton on synthesis of enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of high concentration of carbohydrates. **Biotechnology letters**, v. 18, p. 1165–1168, 1996.
- ¹⁰⁰ABD-AZIZ, S. et al. Effect of C/N ratio and starch concentration on ethanol production from sago starch using recombinant yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 713–719, 2001.

- ¹⁰¹H, S. et al. Effect of Time, C/N Ratio and Molasses Concentration on *Saccharomyces cerevisiae* Biomass Production. **Journal of Veterinary and Animal Research**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2018.
- ¹⁰²ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The scientific world journal**, v. 2014, n. 1, p. 957102, 2014.
- ¹⁰³SILVA, R. O. DA; SERPA, M. DO N.; BROD, F. C. A. **INFLUENCE OF AGITATION AND AERATION ON XYLITOL PRODUCTION BY THE YEAST *Starmerella meliponinorum***. *Química Nova*, v. 44, n. 1, p. 1–5, 2020.
- ¹⁰⁴RAJ, K.; KRISHNAN, C. Improved co-production of ethanol and xylitol from low-temperature aqueous ammonia pretreated sugarcane bagasse using two-stage high solids enzymatic hydrolysis and *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**, v. 153, p. 392–403, 2020.
- ¹⁰⁵VAZ DE ARRUDA, P. et al. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 297–302, 2017.
- ¹⁰⁶BELLIDO, C. et al. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 51–58, 2013.
- ¹⁰⁷GOBERT, A. et al. Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. **Food Microbiology**, v. 83, p. 71–85, 2019.
- ¹⁰⁸GODARD, P. et al. Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3065–3086, 1 abr. 2007.
- ¹⁰⁹YANG, X. et al. Comparisons of urea or ammonium on growth and fermentative metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 98, 2021.
- ¹¹⁰TER SCHURE, E. G.; VAN RIEL, N. A. W.; VERRIPS, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 67–83, 1 jan. 2000.
- ¹¹¹DE ALBUQUERQUE, T. L. et al. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p. 33–40, 2015.
- ¹¹²MARTINIANO, S. E. et al. Evaluation of Rice Bran Extract as a Nitrogen Source for Improved Hemicellulosic Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by New Xylose-Fermenting Yeast Strains Isolated from Brazilian Forests. **Sugar Tech**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014.

- ¹¹³SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 31–38, 2012.
- ¹¹⁴CARVALHEIRO, F. et al. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate: Effect of supplementation. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1887–1891, 2007.
- ¹¹⁵DA SILVA, D. D. V. et al. New cultive medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane bagasse using rice bran extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1469–1475, 2014.
- ¹¹⁶SAHA, B. C.; KENNEDY, G. J. Optimization of xylitol production from xylose by a novel arabitol limited co-producing *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 51, n. 8, p. 761–768, 2021.
- ¹¹⁷PALLADINO, F. et al. **Bioreactors: Applications and Innovations for a Sustainable and Healthy Future—A Critical Review**. **Applied Sciences**, 2024.
- ¹¹⁸ABBOTT, A. P. et al. Do group 1 metal salts form deep eutectic solvents? **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 36, p. 25528–25537, 2016.
- ¹¹⁹PRADO, C. A. et al. An Overview of Different Approaches and Bioreactors for Xylitol Production by Fermentation BT - Current Advances in Biotechnological Production of Xylitol: Fermentative Production of Xylitol. In: DE ALMEIDA FELIPE, M. DAS G.; CHANDEL, A. K. (Eds.). Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 81–108.
- ¹²⁰ZHUANG, Y. et al. Origami-Based Bionic Reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 60, n. 11, p. 4279–4289, 24 mar. 2021.
- ¹²¹MEARS, L. et al. A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. **Journal of Biotechnology**, v. 245, p. 34–46, 2017.
- ¹²²SINGH, S.; ARYA, S. K.; KRISHANIA, M. Bioprocess optimization for enhanced xylitol synthesis by new isolate *Meyerozyma caribbica* CP02 using rice straw. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, n. 1, p. 31, 2024.
- ¹²³SINGH, P. et al. Xylitol biosynthesis and process scale-up from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida tropicalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 217, p. 118855, 2024.
- ¹²⁴RANIERI, R. et al. Fermentative processes for the upcycling of xylose to xylitol by immobilized cells of *Pichia fermentans* WC1507. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, n. January, p. 1–10, 2024.

- ¹²⁵MANAF, S. F. A. et al. Kinetic study and model of fermentation parameters affected growth and xylitol production in bioreactor by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36,907. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 8, p. 7247–7263, 2023.
- ¹²⁶PALLADINO, F. et al. Strategy to reduce acetic acid in sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate concomitantly with xylitol production by the promising yeast *Cyberlindnera xylophilica* in a bioreactor. **Biotechnology Letters**, v. 45, n. 2, p. 263–272, 2023.
- ¹²⁷ABDUL MANAF, S. F. et al. Sequential detoxification of oil palm fronds hydrolysate with coconut shell activated charcoal and pH controlled in bioreactor for xylitol production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 179, p. 90–106, 2022.
- ¹²⁸MANJARRES-PINZÓN, K. et al. Effects of agitation rate and dissolved oxygen on xylose reductase activity during xylitol production at bioreactor scale. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 42, p. 1–7, 2022.
- ¹²⁹ORTEGA-PLATAS, A. et al. Real-time monitoring of xylitol production in a bioreactor by *Candida tropicalis* IEC5-ITV using Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 20, p. 1–10, 2 jul. 2021.
- ¹³⁰PRABHU, A. A. et al. Biovalorisation of crude glycerol and xylose into xylitol by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 121, 2020.
- ¹³¹BEVILAQUA, G. C.; MAUGERI FILHO, F.; FORTE, M. B. S. Simultaneous production of xylitol and arabitol by *Candida tropicalis* fermentation improving agro-industrial wastes valorization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 140, p. 29–45, 2023.
- ¹³²REN, L. et al. Improving glycerol utilization during high-temperature xylitol production with *Kluyveromyces marxianus* using a transient clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 system. **Bioresource Technology**, v. 365, n. October, 2022.
- ¹³³DALL CORTIVO, P. R. et al. Conversion of fermentable sugars from hydrolysates of soybean and oat hulls into ethanol and xylitol by *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CM-Y303. **Industrial Crops and Products**, v. 146, n. February, p. 112218, 2020.
- ¹³⁴SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass - NREL/TP-510-42618. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. April 2008, p. 17, 2012.
- ¹³⁵GURPILHARES, D. B. et al. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 591–595, 2006.

- ¹³⁶ALEXANDER, N. J. Temperature sensitivity of the induction of xylose reductase in *Pachysolen tannophilus*. 1986.
- ¹³⁷SENE, L. et al. Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 84, p. 371–380, 2000.
- ¹³⁸BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- ¹³⁹GOUVEIA, E. R. et al. Validacao de metodologia para a caracterizacao quimica de bagaco de cana-de-acucar. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.
- ¹⁴⁰PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. [s.l: s.n.].
- ¹⁴¹CANILHA, 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**, v. 2012, 2012.
- ¹⁴²HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. et al. Valorization of the sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate through xylitol bioproduction: effect of oxygen availability and sucrose supplementation as key factors. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 11, p. 4901–4915, 2020.
- ¹⁴³DE SOUZA QUEIROZ, S. et al. Xylitol and ethanol co-production from sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate supplemented with molasses. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 4, p. 3143–3152, 2021.
- ¹⁴⁴ÁVILA, P. F.; FORTE, M. B. S.; GOLDBECK, R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, n. 80, p. 180–188, 2018.
- ¹⁴⁵MOUTTA, R. D. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. D. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 93–100, 2014.
- ¹⁴⁶MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- ¹⁴⁷DUARTE, L. C. et al. Effects of Aliphatic Acids , Furfural , and Phenolic Compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941 Lu Í s C . D UARTE , F LORBELA C ARVALHEIRO , I NÊS N EVES ,. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121–124, p. 413–425, 2005.

- ¹⁴⁸FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. **Fuel**, v. 288, n. July 2020, p. 119673, 2021.
- ¹⁴⁹NOURI, H. et al. Detoxification vs. adaptation to inhibitory substances in the production of bioethanol from sugarcane bagasse hydrolysate: A case study. **Biomass and Bioenergy**, v. 139, p. 105629, 2020.
- ¹⁵⁰WANG, S.; HE, Z.; YUAN, Q. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle. **Chemical Engineering Science**, v. 158, p. 37–40, 2017.
- ¹⁵¹JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.
- ¹⁵²WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 302–309, 2018.
- ¹⁵³UNREAN, P.; KETSUB, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. July, p. 238–246, 2018.
- ¹⁵⁴SOARES, L. B. et al. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, p. 105549, 2020.
- ¹⁵⁵HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; DE ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. DAS G. DE 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.
- ¹⁵⁶RIBEIRO, L. E. et al. Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal Genetics and Biology**, n. August, p. 103624, 2021.
- ¹⁵⁷ZHANG, Z. et al. Strategies for eliminating l-arabinitol in the bioconversion of xylitol. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1964–1972, 2016.
- ¹⁵⁸JÚNNIOR, H. et al. C/N ratio and carbon source-dependent lipid production profiling in *Rhodotorula toruloides*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 2639–2649, 2020.
- ¹⁵⁹SILVA, S. S. et al. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* in media containing different nitrogen sources. **Journal of Basic Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 205–208, 1 jan. 1994.

- ¹⁶⁰PACHECO, T. F. et al. Enhanced Tolerance of *Spathaspora passalidarum* to Sugarcane Bagasse Hydrolysate for Ethanol Production from Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 7, p. 2182–2197, 2021.
- ¹⁶¹TRICHEZ, D. et al. Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 4, 2019.
- ¹⁶²CERCEAU ALVES, Y. P. et al. From by- to bioproducts: selection of a nanofiltration membrane for biotechnological xylitol purification and process optimization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 125, p. 79–90, 2021.
- ¹⁶³VERAS, H. C. T.; PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 153, 2017.
- ¹⁶⁴BRANCO, R. F. et al. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 326–330, 2009.
- ¹⁶⁵CASTAÑÓN-RODRÍGUEZ, J. F. et al. Effects of oxygen and nutrients on xylitol and ethanol production in sugarcane bagasse hydrolyzates. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 1381–1389, 2015.
- ¹⁶⁶AGUIAR, W. B. et al. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *C. guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 1, p. 49–59, 2002.
- ¹⁶⁷BARBOSA, M. F. S. et al. Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 241–251, 1988.
- ¹⁶⁸BONAN, C. I. D. G. et al. Biorefinery Platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the Production of Ethanol, Xylitol, and Single Cell Protein from Sugarcane Bagasse. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 2, p. 1169–1181, 2022.
- ¹⁶⁹GRANSTRÖM, T. B.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 277–281, 2007.
- ¹⁷⁰SANTOS MILESSI, T. S. DOS et al. Effect of Dissolved Oxygen and Inoculum Concentration on Xylose Reductase Production from *Candida guilliermondii* Using Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. **Food and Nutrition Sciences**, v. 02, n. 03, p. 235–240, 2011.

- ¹⁷¹GURPILHARES, D. B. et al. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 87–93, 2009.
- ¹⁷²MARIE, J. et al. Reduced Oxidative Pentose Phosphate Pathway Flux in Recombinant Xylose-Utilizing *Saccharomyces cerevisiae* Strains Improves the Ethanol Yield from Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1604–1609, 1 abr. 2002.