



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021003691-5 A2



(22) Data do Depósito: 26/02/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 06/09/2022

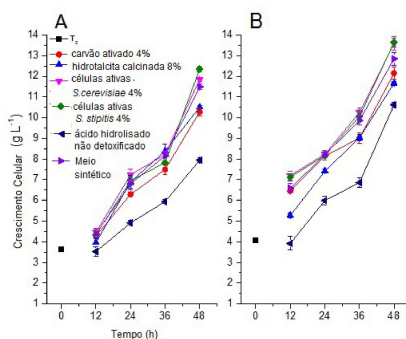
(54) **Título:** DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO

(51) **Int. Cl.:** C12P 7/10; C12Q 1/02; C12N 1/22; C12R 1/865; C12R 1/645.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** JOÃO PAULO CANDIDO; DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS; DILZA APARECIDA NALIN DE OLIVEIRA LEITE; MICHEL BRIENZO.

(57) **Resumo:** DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO. O presente pedido de patente de invenção está relacionado com a destoxificação de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar com células inativas de *Saccharomyces cerevisiae* visando a melhoria no processo fermentativo. Para isso, foram investigadas diferentes concentrações de ácido sulfúrico na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (1 a 5 % m/v H₂SO₄) e o emprego de adsorventes/absorventes com a prerrogativa de melhorar a qualidade do hidrolisado ácido (AH) para fins microbiológicos de fermentação etanólica. Foi avaliado o crescimento celular e o rendimento fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) and *Scheffersomyces stipitis* (NRRL Y-7124). Hidrolisado ácido (HA) (pH 5.5) de bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como fonte de pentoses (17,70 g L⁻¹) e melaço (ME) de cana-de-açúcar como fonte de hexoses (47,00 g L⁻¹). Foram utilizados os adsorventes/absorventes: carvão ativado, argila, hidrotalcita calcinada e células ativas e inativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, em concentrações que variaram (1 a 8 % m/v). Resultados de crescimento celular e caracterização química permitiram selecionar os materiais adsorventes/absorventes mais efetivos, com ênfase para células ativas de *S. cerevisiae* que removeu (...).



DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se à destoxificação de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar com células inativas de *Saccharomyces cerevisiae* visando a melhoria no processo fermentativo.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] O presente pedido de patente de invenção demonstra a inovação no campo técnico relacionado à utilização de materiais lignocelulósicos, com destaque às indústrias agrícola e agroindustrial.

ESTADO DA TÉCNICA

[003] O desenvolvimento de técnicas para produzir etanol de segunda geração ou etanol celulósico (E2G) vem se consolidando o que promove esta importante alternativa bioenergética (Antunes *et al.* 2018). O E2G utiliza diferentes tipos de materiais lignocelulósicos como substrato (Lennartsson *et al.* 2014; Gomes *et al.* 2019), destacando-se: subprodutos agrícolas e agroindustriais (Fu and Holtzapple 2010).

[004] O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) (Souza *et al.* 2020). Esta condição favorece o uso de subprodutos derivados dessa cultura, especialmente o bagaço (Brienzo *et al.* 2016), que compõe cerca de 1/3 da biomassa (Rocha *et al.* 2015).

[005] O bagaço de cana-de-açúcar é uma importante fonte de biomassa para produção de E2G (Wang *et al.* 2018) e sua composição aproximada é de 27 % hemicelulose, 42 % celulose 22 % lignina (Rocha *et al.* 2015). Este material varia na sua composição e estrutura, dependendo, dentre outros fatores, da região de origem do cultivo (Brienzo *et al.* 2014). A constituição da hemicelulose apresenta pentoses: D-xilose, L-arabinose, e hexoses: D-mannose, D-glucose, D-galactose (van der Pol *et al.* 2014; Gírio *et al.* 2010). A glicose é o carboidrato predominante da celulose (Ogeda and Petri 2010).

[006] Contudo, para que estes açúcares presentes na forma de polímeros se tornem disponíveis à fermentação, é necessário um pré-tratamento que permita a despolimerização da hemicelulose e torne a celulose susceptível à ação enzimática

(Zheng *et al.* 2009). Esta etapa é fundamental para que os processos subsequentes transformem os açúcares em etanol (Aditiya *et al.* 2016, Sindhu *et al.* 2016).

[007] O uso de ácidos diluídos está entre os métodos mais utilizados para efetuar o pré-tratamento de material lignocelulósico (Brienzo *et al.* 2016), apresenta vantagens econômicas (Aditiya *et al.* 2016), inclui a possibilidade de uso em escala industrial (Kumar and Sharma 2017; Sindhu *et al.* 2016), causa mínima modificação estrutural da xilose (Brienzo *et al.* 2014), além de ser comumente empregado em pesquisas que envolvem hidrólise de biomassa (Canilha *et al.* 2010; Martini *et al.* 2016; Santos *et al.* 2018; Sindhu *et al.* 2011).

[008] Entretanto, dentre as dificuldades da etapa do pré-tratamento estão a formação de substâncias consideradas inibitórias da fermentação, tais como: derivados do furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), derivados fenólicos e ácidos orgânicos (acético, fórmico e levulínico) (Kumar and Sharma 2017; Jönsson *et al.* 2013; Perna *et al.* 2018).

[009] A destoxificação é um passo indispensável para melhorar a qualidade da fração líquida obtida do hidrolisado ácido e melhorar a conversão de carboidratos pelos micro-organismos na fermentação (Gupta *et al.* 2017). Dentre os métodos utilizados na destoxificação de hidrolisados podem ser empregados os de natureza física (evaporação, uso de membranas, adsorventes), química (overliming) e biológica (Mussato e Roberto 2004). A combinação de diferentes métodos pode ser uma alternativa importante na destoxificação (Vallejos *et al.* 2016; Hernández-Pérez *et al.* 2016).

[010] O comprometimento do metabolismo microbiano varia conforme características da matéria-prima, tipo de hidrólise empregada no substrato lignocelulósico e a adaptação do micro-organismo ao meio (Mussato and Roberto 2004). Somados a fatores, como condição fisiológica e pH que também exercem forte influência sobre os efeitos das substâncias inibitórias (Taherzadeh *et al.* 2000).

[011] A fermentação da glicose é bem estudada e aplicada na indústria alcooleira na produção de etanol por *Sacharomyces cerevisiae* (Gírio *et al.* 2010; Gombert and van Maris 2015; Passoth and Sandgren 2019), por outro lado, esta levedura não fermenta

xilose (Chandel *et al.* 2011; Lennartsson *et al.* 2014). Importante alternativa na fermentação da xilose é o uso de *Scheffersomyces stipitis* (Lee *et al.* 1986; Sanchez *et al.* 2004; Gírio *et al.* 2010). Muitos estudos têm sido realizados com esta levedura na tentativa de viabilizar a produção de etanol de segunda geração (Nakanishe *et al.* 2017; Silva *et al.* 2012).

[012] O grande desafio é a cofermentação dos açúcares pentose e hexose (Milanez *et al.* 2015; Rech *et al.* 2019), principalmente, xilose proveniente da hidrólise da hemicelulose (Silva *et al.* 2012) e glicose da celulose (Ogeda and Petri 2010). Uma eficiente fermentação da xilose em etanol pode representar na atualidade um ganho econômico importante para o desenvolvimento do E2G (Milanez *et al.* 2015).

[013] O uso de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar apresenta uma alternativa interessante para a produção de etanol de segunda geração (2G). Técnicas para melhorar o processo de fermentação, por exemplo, o uso de células imobilizadas, é um dos fatores-chave para uma produção eficiente. Aqui, é apresentado o efeito de dois parâmetros importantes (concentração celular no sistema imobilizado e taxa de agitação) na produção de etanol 2G utilizando a levedura brasileira *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio. Um planejamento fatorial completo 2^2 de experimentos foi realizado para avaliar o efeito das concentrações de células em solução de alginato de sódio para a produção de grânulos imobilizados (3,0, 6,0 e 9,0 g L⁻¹) e taxa de agitação (150, 200 e 250 rpm) para 2G produção de etanol. A análise estatística mostrou que o uso de ambas as variáveis em níveis baixos (menor nível empregado) aumentou o rendimento de etanol ($Y_{P/S}$). Sob essas condições de processo, ($Y_{P/S}$) de 0,31 g/g de produtividade de etanol (Qp) de 0,12 g/L.h foram alcançados. Os resultados mostraram o potencial desta levedura imobilizada na produção de etanol 2G a partir de açúcares C5 e demonstram a importância da concentração celular adequada em sistemas imobilizados, um achado que pode aumentar o rendimento e a produtividade dos bioprocessos (F.A.F. Antunes *et al.*, 2016).

[014] O trabalho de Bruno Fonseca *et al.*, de 2011, teve como objetivo principal contribuir para o desenvolvimento da destoxificação biológica de hidrolisados de

hemicelulose obtidos de diferentes plantas de biomassa utilizando levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097. Testes com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações foram realizados para avaliar a influência da concentração do hidrolisado na remoção de compostos inibitórios do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sem redução da concentração de açúcar. Os maiores valores de redução da concentração de inibidores e menores perdas de açúcar foram observados quando o hidrolisado concentrado quántuplo foi tratado pela levedura avaliada. Nesses experimentos, verificou-se que as altas concentrações de açúcar favoreciam o menor consumo de açúcar pela levedura. A maior redução da concentração de siringaldeído (66,67%), ácido ferúlico (73,33%), furfural (62%) e 5-HMF (85%) foi observada quando o hidrolisado concentrado foi destoxificado usando esta cepa de levedura após 24 h de experimentação. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram o potencial da levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097, como agente destoxificante de hidrolisado hemicelulósico de diferentes plantas de biomassa.

[015] O etanol de segunda geração tem a perspectiva de se tornar uma importante alternativa de bioenergia. O desenvolvimento desta tecnologia está associado à utilização de materiais lignocelulósicos, com ênfase em subprodutos agrícolas e agroindustriais a partir dos quais pode ser produzido o açúcar fermentável. A hidrólise ácida despolimeriza a hemicelulose liberando principalmente xilose. Posteriormente, a celulose pode ser convertida em glicose por hidrólise enzimática. No entanto, a hidrólise ácida produz compostos tóxicos, como derivados de furano, fenólicos e ácidos orgânicos, que são prejudiciais aos microrganismos fermentativos. Este estudo investigou diferentes concentrações de ácido sulfúrico na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (1– 5% m/v) e o uso de diferentes materiais adsorventes/absorventes com a prerrogativa de melhorar a qualidade do hidrolisado ácido (AH) para fermentação etanólica microbiana. O crescimento celular e o rendimento fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e *Scheffersomyces stipitis* (NRRL Y-7124) foram avaliados. O AH foi utilizado como fonte de pentoses (17,7 g L⁻¹) e o melaço (ME) de cana-de-açúcar como fonte de hexoses (47 g L⁻¹). Foram utilizados os seguintes

adsorventes/absorventes: carvão ativado, argila, hidrotalcita calcinada e células ativas e inativas de PE-2 e NRRL Y-7124, em concentrações variando (1 a 8% m/v). Os resultados do crescimento celular e caracterização química permitiram selecionar os materiais mais eficazes na remoção de compostos tóxicos com ênfase para células ativas que removeram 66% furfural e 51% de 5-HMF e produtividade alcoólica de 23,5 g L⁻¹ em substrato contendo AH e ME, na presença de cultura mista. Células inativas, por sua vez, removeram níveis semelhantes de compostos tóxicos (Fig 2). Esses resultados indicam a aplicação de células de levedura (células ativadas e inativadas) na destoxificação de hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar previamente à fermentação (Candido, *et al*, 2020).

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[016] Assim, o objetivo do presente pedido de patente de invenção é avaliar a destoxificação do hidrolisado ácido (usando carvão ativado, argila, hidrotalcita calcinada e células inativas e ativas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis*). *S. cerevisiae* e *S. stipitis* foram utilizadas em cultura mista para fermentação dos açúcares de 5 e 6 carbonos provenientes do hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar, fonte de xilose e hexoses, respectivamente.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[017] O presente pedido de patente de invenção será melhor explicado pela apresentação da metodologia, tabelas e figuras. O invento foi dividido em etapas que serão melhor explicadas a seguir.

[018] Etapa 1: Micro-organismos e cultivo do Inóculo: As leveduras utilizadas no presente pedido de patente de invenção foram *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e *Scheffersomyces stipitis* (NRRL Y-7124). *S. stipitis* NRRL Y-7124 foi obtida do estoque de cultura da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (Lorena, São Paulo, Brasil) e *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 foi obtida da Universidade Federal de São Carlos (Araras, São Paulo, Brasil).

[019]. As culturas foram mantidas em meio sólido com ágar: Extrato de Levedura / Peptona / Glicose / Agar (YEPD); e Extrato de levedura / Peptona / Xilose / Agar (YEPX) (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ xilose ou glicose e 18 g L⁻¹ de ágar). As culturas foram mantidas em óleo mineral e estocadas em refrigerador (4°C ± 2°C), com transferência regular para novos meios. Para multiplicação celular foi adicionado uma alçada de cultura preservada em óleo mineral para 50 mL de meio líquido YEPX contidos em frascos Erlenmeyer, este foi levado a mesa agitadora a 30 °C ± 2 °C, 130 rpm por 72 h. Todos os meios foram esterilizados a 121 °C por 15 min.

[020] Etapa 2: Melaço de cana-de-açúcar: Utilizou-se melaço de cana-de-açúcar proveniente de Usina Sucroalcooleira de Rio Pardo, município de Cerqueira César, SP, Brasil. O melaço foi utilizado como fonte de açúcares redutores totais (ATR) (47 g L⁻¹/12° Brix) na fermentação. O melaço concentrado apresentou 56 % de ATR. A inversão da sacarose ocorreu mediante hidrólise ácida (HCl 1,3 mol L⁻¹) com posterior quantificação dos açúcares redutores (RS) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O melaço diluído utilizado na fermentação foi filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore). °Brix foi medido em refratômetro modelo No34292, Tokyo, Japão.

[021] Etapa 3: Pré-tratamento com ácido diluído: O bagaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela Usina São João, localizada no município de Araras, SP, Brasil, proveniente da safra 2016/2017. As etapas para a hidrólise ácida consistiram: secagem da biomassa (60°C), trituração em moinho de facas e posterior peneiramento (mesh 20). Pesagem de 50 g de biomassa seca foi adicionada em frascos de vidro do tipo Schott com 500 mL de solução de ácido sulfúrico (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 5,0 % m/v - H₂SO₄) (massa de material/volume de ácido, m/v). Esta mistura ficou em repouso por 12 h. Os frascos foram autoclavados a 1 atm/60 min, a massa resultante foi filtrada à vácuo, uma fração líquida foi obtida com monômeros de xilose, arabinose e glicose. Após filtração, o pH da fração líquida foi ajustado (5,5) com solução de NaOH 10 mol L⁻¹. Após análise dos compostos tóxicos presentes na fração líquida obtida da hidrólise

ácida, foi selecionado o tratamento a 2 % m/v H₂SO₄, sendo este utilizado na etapa de destoxificação, crescimento celular e fermentação.

[022] Etapa 4: Destoxificação com adsorventes/absorventes: Cinco materiais foram utilizados na destoxificação: carvão ativado, argila, hidrotalcita calcinada e células ativas e inativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, nas concentrações: 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 % (m/v). As células de leveduras foram cultivadas (YEPD) e posteriormente centrifugadas a 2500 rpm, desprezou-se o sobrenadante. As células ativas e inativas (células inativas foram previamente autoclavadas a 1 atm por 15 min) foram adicionadas diretamente ao hidrolisado. A biomassa equivalente em g L⁻¹ (secagem a 105 °C) para *S. cerevisiae* foi de: 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 g L⁻¹ e para *S. stipitis*: 1,7; 3,5; 7,0 e 14,0 g L⁻¹. A hidrotalcita foi calcinada em forno mufla a 600 °C por 2 horas e posteriormente adicionada ao hidrolisado ácido. A argila e o carvão ativado foram adicionados diretamente ao hidrolisado. A argila utilizada neste trabalho foi caracterizada por Tomasella *et al* (2015) em um prévio estudo de nosso grupo. O processo de destoxificação foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada frasco continha 50 mL de hidrolisado ácido e o adsorvente/absorvente, que foram colocados em mesa agitadora a 30 °C, 120 rpm por 60 min. A seguir o líquido foi centrifugado a 2500 rpm por 15 min. Foram retiradas amostras para quantificação de crescimento e viabilidade celular e para análise cromatográfica. As amostras retiradas para crescimento celular foram suplementadas com extrato de levedura e peptona (10 e 20 g L⁻¹). As amostras para análise cromatográfica foram filtradas (0,22 µm - Millipore) e estocadas em freezer (-5°C ± 2°C) para quantificação de furfural; 5-hidroximetilfurfural; ácido acético; ácido fórmico; xilose; glicose e arabinose.

[023] Etapa 5: Crescimento e viabilidade celular: *S. cerevisiae* e *S. stipitis* foram utilizadas como inóculo (10 % v/v) e avaliadas quanto ao crescimento celular em hidrolisado ácido destoxificado e suplementado. A equivalência (g L⁻¹) da suspensão celular a 4,7x10⁸ cels mL⁻¹ para *S. cerevisiae* foi de 0,92 g L⁻¹ e para *S. stipitis* (5.5x10⁸ cels mL⁻¹) de 1,10 g L⁻¹. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de hidrolisado ácido contendo arabinose, glicose e xilose nas concentrações de 1,5; 0,5; 15,7 g L⁻¹. Os Erlenmeyers foram incubados a 120 rpm por

48 h e a 30 °C. Alíquotas foram retiradas para contagem celular nos tempos: 0; 12; 24; 36 e 48 h. O crescimento e viabilidade celular foram realizados após diluição seriada em solução salina a 0.85 %, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer empregando-se eritrosina como corante diferencial. Utilizou-se cloranfenicol (5 ppm) como agente antibacteriano. O percentual de viabilidade celular foi avaliado conforme a Equação 1:

$$Vc = \frac{n^{\circ}celvivas}{n^{\circ}celvivas + n^{\circ}celmortas} \times 100$$

Equação 1

Onde: $Vc_{\%}$ é o percentual da viabilidade celular

[024] Dois controles de referência foram utilizados: meio sintético (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 17,1 g L⁻¹ xilose; 0,5 g L⁻¹ de glicose e 1,5 g L⁻¹ de arabinose) e hidrolisado não destoxificado. A esterilização do meio sintético foi realizada em filtro 0,22 µm (Millipore).

[025] Etapa 6: Fermentação: Para o estudo da fermentação foi utilizada a fração líquida do hidrolisado ácido (2 % m/v), contendo 17,71 g L⁻¹ de açúcares redutores (RS), obtido do bagaço de cana-de-açúcar e o melaço de cana-de-açúcar que foi ajustado para concentração de 47 g L⁻¹ de açúcares totais redutores (TRS). Os substratos foram aplicados isoladamente e associados na forma de cultivo misto (Tab. 1).

Tabela 1. Protocolo de caracterização química para substrato utilizado na fermentação com *S. cerevisiae* e *S. stipitis*.

Lote	Substrato	Composição				Inóculo
		Carbohidratos (g L ⁻¹)		Suplementos (g L ⁻¹)		
		RS	TRS	Extrato de Levedura	Peptona	
1	Melaço	-	47.00			
2	Melaço + ácido hidrolisado não desintoxicado	-	64.71	10.00	20.00	<i>S. cerevisiae</i>
3	Melaço + ácido hidrolisado desintoxicado	-	*63.40			
4	ácido hidrolisado não desintoxicado	17.71	-			
5	ácido hidrolisado desintoxicado	15.69	-			
6	Melaço	-	47.00	10.00	20.00	<i>S. stipitis</i>
7	Melaço + ácido hidrolisado não desintoxicado	-	64.71			
8	Melaço + ácido hidrolisado desintoxicado	-	*63.40			
9	Melaço + ácido hidrolisado não desintoxicado	-	64.71	10.00	20.00	<i>S. cerevisiae</i>
10	Melaço + ácido hidrolisado desintoxicado	-	*63.40			<i>S. stipitis</i>

* Quantidade de TRS com a subtração dos açúcares consumidos durante o processo de adsorção com o adsorvente

[026] A Figura 1 apresenta o crescimento celular (g L⁻¹) para *S. cerevisiae* (A) e *S. stipitis* (B) em hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar (2,0 % m/v - H₂SO₄). A destoxificação com: carvão ativado (4,0 %); hidrotalcita calcinada (8,0 %); células ativas de *S. cerevisiae* (4,0 %); células ativas de *S. stipitis* (4,0 %). Controles: hidrolisado ácido não destoxificado e meio sintético.

[027] Dentre os adsorventes/absorventes utilizados no processo de destoxificação (Fig. 1) selecionou-se o adsorvente constituído de células ativas de *S. cerevisiae*. Esta seleção ocorreu devido a alta eficiência na remoção de compostos tóxicos, principalmente ácido acético e 5-HMF. Valores similares para remoção de furfural e de ácido fórmico foram compatíveis com os valores observados para carvão ativado. A seleção deste material também levou em consideração o seu fácil acesso e baixo valor econômico.

[028] A fermentação foi conduzida em triplicata em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de substrato que foi suplementado com extrato de levedura e peptona (10 e 20 g L⁻¹). Foi utilizado inóculo de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* a 10 % (v/v). A concentração celular inicial foi de 6.7x10⁸ cels mL⁻¹ para *S. cerevisiae* e de 6.0x10⁸ cels mL⁻¹ para *S. stipitis*. Os frascos foram incubados a 30 °C. O pH do meio foi monitorado durante todo o processo fermentativo e variou de 5,10 a 5,80. Utilizou-se cloranfenicol a 5 ppm para controle de contaminantes bacterianos. Amostras provenientes da fermentação (48 h) foram centrifugadas, o sobrenadante foi filtrado (PVDF - Millex 22

µm) e armazenado em freezer (-5°C ± 2°C) para posterior análise de crescimento celular, ATR e etanol. A eficiência da fermentação foi calculada pelo percentual de rendimento prático de etanol (dado pelo valor em g L⁻¹) e pela relação de ATR consumidos (Equação 2) e para rendimento real da produtividade, considerou-se o valor de etanol e a relação de ATR disponíveis no substrato (Equação 3).

$$\text{Produtividade pr\u00e1tica (P}_y\text{)} \quad R_y = \frac{E \text{ (g/L)} \times 100}{S_i - S_f} \quad \text{Equa\u00e7\u00e3o 2}$$

$$\text{Produtividade real (R}_y\text{)} \quad R_y = \frac{E \text{ (g/L)} \times 100}{S_i} \quad \text{Equa\u00e7\u00e3o 3}$$

Onde: E = etanol (g L⁻¹) e S = a\u00e7\u00facares totais redutores (inicial/final).

[029] Etapa 7: M\u00e9todos anal\u00edticos: Para as an\u00e1lises dos a\u00e7\u00facares e dos \u00e1cidos ac\u00e9tico e f\u00f3rmico foi utilizado cromatografia l\u00edquida de alta efici\u00eancia (CLAE) (Shimadzo), com detector de \u00edndice de refra\u00e7\u00e3o (DIR, Shimadzo), coluna HPX-87H, BioRad (Temp. 60 °C, fase m\u00f3vel com \u00e1cido sulf\u00farico 0,005 mol L⁻¹ (modo isocr\u00e1tico), fluxo de 0,6 mL min⁻¹, forno a 65 °C e corrida de 25 min. Para quantifica\u00e7\u00e3o de 5-hidroximetilfurfural e furfural utilizou-se CLAE (Shimadzo), detector ultravioleta (274 nm), coluna C18 (Temp. 25 °C, fase m\u00f3vel: acetonitrila e \u00e1gua (1:8) e 1 % de \u00e1cido ac\u00e9tico, fluxo de 0,8 mL min⁻¹, volume de inje\u00e7\u00e3o de 10 µL e tempo de corrida de 20 min (Rocha et al. 2015).

[030] Etanol foi analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectr\u00f4metro de massas (GC-MS Shimadzu QP2010 ULTRA) com transfer\u00eancia da fase l\u00edquida para gasosa (T\u00e9cnica de Headspace). Amostras (5 mL) foram condicionadas em frascos headspace de 10 mL e aquecidas em banho Maria a 45 °C por 15 min. A separa\u00e7\u00e3o cromatogr\u00e1fica foi realizada com uma coluna capilar de s\u00edlica fundida (Restek RTX-5MS / 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm de espessura). 10 µL da fase gasosa foi injetada no CG/MS, para isso utilizou-se uma seringa de vidro (Hamilton Gastight), a inje\u00e7\u00e3o ocorreu no modo split (1:9). G\u00e1s H\u00e9lio com taxa de fluxo de 1,5 mL min⁻¹ foi utilizado como fase m\u00f3vel. A coluna do forno foi mantida em 40 °C por 1 min, posteriormente de 5 °C min⁻¹ at\u00e9 70 °C e de 10 °C at\u00e9 100 °C em intervalo de 0,5 min⁻¹. A temperatura do

injetor e do detector foi de 200 °C e de 250 °C, respectivamente. Elementos foram detectados em modo de corrente total de íons (TIC) e scan (m/z 35–500) com tempo total de corrida de 11,5 min. A identificação ocorreu com índice > 94 % de similaridade. A interpretação do espectro do GC–MS foi conduzida usando a base de dados (library) do NIST11/EPA/NIH Massa espectral.

[031] Para quantificação de açúcares redutores foi utilizado o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), para as amostras de melaço a quantificação de açúcares ocorreu após hidrólise ácida (HCl 1,3 mol L⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

[032] Etapas 8: Análises estatísticas: Os dados foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) e t-test Student (Hammer et al. 2001). Testes de Shapiro Wilk e Levene's foram utilizados como requisitos preliminares (nível de significância de 0,05). Os procedimentos foram realizados nos softwares: Statdisk v.12.0.2; Past v.3.25 and Microsoft Office Excel.

[033] No tocante à caracterização química do hidrolisado ácido, a hidrólise ácida foi realizada com diferentes concentrações de H₂SO₄ (1 - 5 % m/v), para avaliar a relação do processo com a liberação de açúcares e dos compostos tóxicos. Os valores quantitativos de açúcares e compostos tóxicos derivados do pré-tratamento são influenciados pela concentração de ácido usado na hidrólise. A máxima liberação de xilose, compostos derivados do furano e de ácidos orgânicos ocorreu para o tratamento a 5 % m/v H₂SO₄ (xilose: 18,60 g L⁻¹; furfural e 5-HMF: 234,6 e 22,2 mg L⁻¹; ácido acético e fórmico: 3,0 e 0,5 mg L⁻¹).

[034] Foi observado que a eficiência na extração da xilose não ocorreu proporcionalmente com o aumento da concentração ácida. A eficiência na liberação de açúcar foi gradativamente perdida: tratamento ácido/liberação de xilose: 5 % m/v = 14,7 % > 2,5 % m/v = 0,88 % > 2,0 % m/v = 8,1 % > 1,5 % m/v = 8,7 % > 1% m/v. Por outro lado, ocorre uma intensificação na liberação de compostos tóxicos, principalmente de furfural e ácido fórmico (Tab 2).

Tabela 2 Quantificação (CLAE) para açúcares, ácidos orgânicos (g L⁻¹) e furanos (mg L⁻¹) provenientes da hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar (1 atm/1h) sob diferentes concentrações (H₂SO₄ - % m/v) antes do processo de destoxificação.

Ácido hidrolisado (H ₂ SO ₄ % m/v)	Glucose	Xylose	Arabinose	Ácido Fórmico	Ácido Acético	Furfural	5-HMF
1.00	0.316 ± 0.05	13.162 ± 0.47	1.341 ± 0.06	0.176 ± 0.02	2.551 ± 0.07	33.459 ± 0.07	0.969 ± 0.03
1.50	0.414 ± 0.02	14.425 ± 0.07	1.428 ± 0.03	0.182 ± 0.01	2.754 ± 0.02	38.811 ± 0.19	5.638 ± 0.02
2.00	0.490 ± 0.01	15.718 ± 0.07	1.502 ± 0.01	0.188 ± 0.01	2.817 ± 0.03	42.667 ± 0.04	12.534 ± 0.03
2.50	0.394 ± 0.01	15.853 ± 0.25	1.618 ± 0.03	0.202 ± 0.00	2.990 ± 0.03	46.812 ± 0.00	13.657 ± 0.07
5.00	1.532 ± 0.00	18.603 ± 0.07	1.926 ± 0.00	0.559 ± 0.01	3.063 ± 0.00	234.638 ± 0.07	22.285 ± 0.04

[035] Desta forma, a fração líquida originada do bagaço de cana-de-açúcar pela hidrólise ácida (2 % m/v) foi selecionada considerando o consumo de ácido utilizado na hidrólise versus a extração de açúcar e a conversão de compostos tóxicos. A concentração ácida selecionada foi utilizada para os ensaios: destoxificação, crescimento celular, e fermentação.

[036] Etapa 9: Crescimento celular e viabilidade: Para avaliar o crescimento e viabilidade celular das leveduras utilizou-se a fração aquosa do hidrolisado ácido a 2 % m/v H₂SO₄. Sobre a fração líquida foi adicionado cada adsorvente/absorvente nas respectivas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 % (m/v). Desta variação, foi verificado que o melhor crescimento celular para *S. cerevisiae* e *S. stipitis* ocorreu quando os adsorventes/absorventes foram administrados na concentração de 4,0 e 8,0 %.

[037] Os absorventes constituídos de células ativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* apresentaram melhor crescimento celular a 8 % m/v, embora não houve diferença significativa quando os valores foram comparados ao tratamento a 4 % m/v, desta forma, trabalhou-se com a menor concentração.

[038] Os tratamentos com carvão ativado, hidrotalcita calcinada e células ativas de leveduras não apresentaram diferença entre si (Fig. 1). Assim, os ensaios subsequentes foram realizados com células ativas de *S. cerevisiae*.

[039] Para os tratamentos com células inativas de leveduras e com argila não houve diferença significativa para crescimento celular quando os tratamentos foram comparados ao hidrolisado ácido não destoxificado (P-value > 0,05).

[040] Para os tratamentos relatados anteriormente (Fig. 1), *S. cerevisiae* apresentou crescimento celular médio 18,5 % maior quando comparado aos tratamentos com células inativas e argila. Quando comparado ao hidrolisado ácido não destoxificado o valor foi de 29 %. Para *S. stipitis*, a média foi 15,7 % e de 17 %, respectivamente. Estes resultados referem-se a contagem celular realizada no tempo de 48 h.

[041] Os resultados do percentual de sobrevivência indica adaptabilidade das leveduras ao hidrolisado ácido, principalmente após 12 h de crescimento celular (*S. cerevisiae*: T₀: 5,22 % para T₄₈: 2,50 %) e (*S. stipitis*: T₀: 2,18 % para T₄₈: 1,10 %). Para AH sem destoxificação, os seguintes valores foram obtidos: 11,0 para 9,7 % e 6,0 para 4,8 %, respectivamente.

[042] Amostras retiradas para ensaio de crescimento celular, tomadas após 48 horas, foram analisadas para quantificar açúcares residuais no meio (Tab. 3). Os resultados indicam que os açúcares disponíveis no hidrolisado ácido (17,7 g L⁻¹) não foram totalmente metabolizadas. O consumo total (g L⁻¹ e %) foram calculados pela relação entre a quantidade inicial e final dos açúcares.

Tabela 3. Crescimento celular e consumo de diferentes açúcares por *S. cerevisiae* e *S. stipitis* após 48 horas de crescimento celular em hidrolisado ácido (H₂SO₄ – 2,0 % m/v) detoxificado com diferentes materiais adsorventes.

<i>S. cerevisiae</i>						
Adsorventes 4 e *8 % m/v	Crescimento celular g L ⁻¹	Consumo (g L ⁻¹)			Açúcar redutor total	
		Arabinose	Glucose	Xylose	Total do consumo (g L ⁻¹)	Total do consumo (%)
48 h						
Carvão ativado	10.27	0.40	0.49	6.43	7.32	41.33
Argila	8.72	0.20	0.49	5.39	6.08	34.33
Hidrotalcite calcinada *	10.50	0.30	0.49	6.53	7.32	41.33
Células inativas <i>S. cerevisiae</i>	9.07	0.30	0.49	6.83	7.62	43.03
Células ativas de <i>S. cerevisiae</i>	11.86	0.40	0.49	8.03	8.92	50.37
Células inativas <i>S. stipitis</i>	9.75	0.40	0.49	6.30	7.19	40.60
Células ativas <i>S. stipitis</i>	12.35	0.30	0.49	7.98	8.77	49.54
Hidrolisado ácido não desintoxicado	7.94	0.20	0.49	5.11	5.80	32.75
Meio sintético	11.49	0.30	0.49	7.20	7.99	45.12
<i>S. stipitis</i>						
Carvão ativado	12.15	0.70	0.49	8.85	10.04	56.70
Argila	9.41	0.30	0.49	7.20	7.99	45.12
Hidrotalcite calcinada *	11.66	0.60	0.49	7.98	9.07	51.21
Células inativas <i>S. cerevisiae</i>	11.61	0.60	0.49	8.43	9.52	53.75
Células ativas de <i>S. cerevisiae</i>	13.57	0.70	0.49	9.50	10.69	60.36
Células inativas <i>S. stipitis</i>	11.24	0.70	0.49	8.26	9.45	53.36
Células ativas <i>S. stipitis</i>	13.64	0.90	0.49	9.64	11.03	62.28
Hidrolisado ácido não desintoxicado	10.61	0.60	0.49	7.51	8.60	48.56
Meio sintético	12.84	0.70	0.49	9.31	10.50	59.29

Concentração inicial: glucose/arabinose/xylose (g L⁻¹): 0.49; 1.50; 15.71

[043] A mais efetiva concentração de cada adsorvente/absorvente testado na destoxificação e aplicado para crescimento celular foi quantificado em CLAE para verificar a depleção/transformação de seus principais compostos inibitórios e para o decaimento de açúcares.

[044] No tocante à caracterização química do hidrolisado ácido após a destoxificação, os principais compostos presentes no AH a 2 % para os adsorventes/absorventes utilizados foram quantificados em CLAE (Fig. 2).

[045] As Figuras 2A e 2B apresentam o gráfico de pareto para hidrolisado ácido (2,0 % m/v - H₂SO₄) destoxificado com diferentes materiais adsorventes/absorventes a 4,0 e 8,0 % m/v (Figura 2A) furfural; (Figura 2B) 5-HMF; (Figura 2C) ácido fórmico e (Figura 2D) ácido acético, com os Subtítulos: AH – hidrolisado ácido não destoxificado; AC – carvão ativado; CL – argila; CH – hidrotalcita calcinada; Scl – células inativas de *S. cerevisiae*; Ssl – células inativas de *S. stipitis*; ScA - células ativas de *S. cerevisiae*; SsA – células ativas de *S. stipitis*.

[046] A utilização de alguns adsorventes/absorventes possibilitou a melhoria da qualidade do hidrolisado pela adsorção ou alteração quantitativa dos principais compostos tóxicos.

[047] O carvão ativado na presença do hidrolisado ácido promoveu a remoção de 69 % de furfural, seguido pelo adsorvente biológico constituído de células ativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* com 66 e 64 %, respectivamente. Para células inativas *S. stipitis* e *S. cerevisiae* e a eficiência na remoção de furfural foi de 30 % e 29 %. A eficiência no decaimento de furfural para hidrotalcita foi de 20 %. O uso de argila foi desfavorável com remoção inferior a 1 %.

[048] Para o 5-HMF, os maiores valores de remoção foram para as células ativas *S. cerevisiae* e *S. stipitis* com 51 e 49 %, para carvão ativado (48 %) e hidrotalcita (28 %). As células inativas removeram em média 24 % de 5-HMF e a argila 7,8 %.

[049] Para o ácido fórmico, houve alta eficiência de adsorção/absorção, com ênfase para hidrotalcita calcinada (56 %), carvão ativado (47 %) e células ativas de *S. cerevisiae* (39 %), no entanto, não houve diferença significativa entre esses tratamentos e aqueles com os outros materiais adsorventes/adsorvente. Outro ponto importante é que a concentração desse ácido foi relativamente baixa ($0,2 \text{ g L}^{-1}$). Para o ácido acético, os valores de depleção foram inferiores a 7 %, com ênfase para as células ativas *S. cerevisiae* com 6,6 % de remoção.

[050] Foi registrado um decaimento máximo de xilose para o adsorvente constituído por célula ativa *S. stipitis* com 12 %. No entanto, a maior perda foi para glicose, apresentando decaimento significativo para os adsorventes biológicos constituídos de células ativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*: de $0,5$ para $0,1 \text{ g L}^{-1}$ e de $0,5$ para $0,12 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Para o açúcar arabinose, houve perda máxima de 2,3 %.

[051] Na fermentação, a produção de etanol foi avaliada em diferentes situações, conforme protocolo (Tab. 1). Os resultados de crescimento celular, o consumo de ATR e produtividade alcoólica são apresentados na Tab. 4.

[052] Para *S. cerevisiae* em substrato contendo apenas melaço (Lote 1 – Tab. 3) a produtividade alcoólica foi de $22,6 \text{ g L}^{-1}$ com rendimento prático (Y_p) de 50,3 % e rendimento real (Y_r) de 48,2 %. Quando *S. cerevisiae* foi aplicada em substrato constituído pelos açúcares de 5 e 6 C (Lote 2 – Tab. 3) a produtividade de etanol diminuiu em 7,2 % quando comparado ao meio contendo apenas hexoses (Lote1 –

Tab. 3). Com hidrolisado ácido destoxificado a diferença de produtividade alcoólica diminuiu para 6,0 % (Lote 3 – Tab. 3).

[053] *S. stipitis* em substrato com hidrolisado ácido não destoxificado (Lote 5 – Tab. 3) a produção de etanol foi de 1,3 g L⁻¹, obtendo rendimento prático de 9,7 % e rendimento real de 7.6 %. Em hidrolisado destoxificado, houve aumento de produtividade alcoólica de 22 % (Lote 6 – Tab. 3).

[054] Quando as leveduras foram utilizadas em cultura mista no substrato constituído de hidrolisado ácido não destoxificado e melaço (Lote 9 – Tab. 3) a produtividade alcoólica foi de 22,9 g L⁻¹. Quando o substrato foi composto por hidrolisado ácido destoxificado mais melaço, o valor de etanol foi de 23,5 g L⁻¹, uma diferença de 2,5% (Lotes 9 e 10 – Tab. 3).

[055] Esses resultados mostraram que a cultura mista é mais vantajosa em termos de produtividade alcoólica em comparação com a fermentação realizada com as leveduras isoladas (Lote 1 e Lote 8 - Tab. 3) para os substratos mais efetivos em termos de produtividade alcoólica: 22,6 g L⁻¹ para *S. cerevisiae* e 8,6 g L⁻¹ para *S. stipitis*.

Tabela 4. Produtividade alcoólica de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* cultivadas sob diferentes condições de substratos constituídos de hidrolisado ácido e melaço de cana-de-açúcar. Cultivos isolados e em cultura mista (48 h).

Fermento	Lote	Substrato	Celula Crescida g L ⁻¹	TRS total g L ⁻¹	Título de Etanol g L ⁻¹	Etanol %	Consumo TRS %	Py %	Ry %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	Melaço	5.51	47.00	22.64	2.26	95.74	50.31	48.17
	2	Melaço + ácido hidrolisado não desintoxicado	7.07	64.71	21.00	2.10	84.36	38.47	32.45
	3	Melaço + ácido hidrolisado desintoxicado	6.99	63.40	21.28	2.13	83.12	40.38	33.56
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	4	Melaço	6.21	47.00	8.59	0.86	55.00	33.23	18.28
	5	ácido hidrolisado não desintoxicado	4.73	17.71	1.35	0.14	78.90	9.66	7.62
	6	ácido hidrolisado desintoxicado	6.66	15.69	1.65	0.17	86.85	11.40	10.52
	7	Melaço + ácido hidrolisado não desintoxicado	6.21	64.71	9.87	0.99	57.95	26.32	15.25
	8	Melaço + ácido hidrolisado desintoxicado	5.92	63.40	10.43	1.04	60.89	27.02	16.45
<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. stipitis</i>	9	Melaço + ácido hidrolisado não desintoxicado	5.42	64.71	22.90	2.29	90.50	39.10	35.39
	10	Melaço + ácido hidrolisado desintoxicado	5.29	63.40	23.48	2.35	94.00	39.40	37.03

[056] Diferentes concentrações ácidas no pré-tratamento (1 – 5 % m/v) foram aplicadas para avaliar a quantidade de açúcar e subprodutos liberados no hidrolisado (Tab. 2). Estudos anteriores mostram que a concentração de ácido usada na hidrólise

de materiais lignocelulósicos tem sido aplicada com frequência na faixa de ácidos que variam de 1 a 5 % (m/v) (Klasson *et al.* 2013; Alvarez *et al.* 2015; Rocha *et al.* 2015; Dussán *et al.* 2016; Gupta *et al.* 2017; Nakanishi *et al.* 2017; Sritrakul *et al.* 2017; Santos *et al.* 2018).

[057] Nas condições avaliadas no presente pedido de invenção, o aumento da concentração ácida no pré-tratamento (1 – 5 %) aumentou a solubilização do açúcar, a mesma tendência foi observada para compostos como furfural, 5-HMF e ácidos orgânicos (Tab. 2). No entanto, a eficiência da solubilização de açúcares diminuiu, com um aumento dos compostos tóxicos. Esse resultado foi perceptível no pré-tratamento com ácido a 5 %, provavelmente nessa concentração ocorreu uma maior degradação da xilose e, conseqüentemente, houve um aumento nos compostos tóxicos derivados desse monômero de açúcar. Esses resultados corroboram com Chandel *et al.* (2007) que relataram hidrólise sob concentração ácida variando de 0,5 a 3,5 % (HCl), onde a solubilização de monômeros de açúcar diminuiu com o tratamento ácido acima de 2,5 %, enquanto a concentração de compostos tóxicos aumentou.

[058] A variação ácida é um parâmetro extremamente importante na hidrólise de materiais lignocelulósicos, apesar disso, parâmetros como temperatura e tempo de reação têm forte influência na solubilização da hemicelulose (Gupta *et al.* 2017; Sritrakul *et al.* 2017), bem como o tamanho das partículas (Alvarez *et al.* 2015).

[059] Os compostos referenciados como tóxicos têm efeitos negativos nos micro-organismos utilizados nos processos biotecnológicos para obtenção de produtos de valor agregado. Assim, a destoxificação é uma etapa fundamental para atenuar os efeitos causados por compostos tóxicos no metabolismo de micro-organismos (Gupta *et al.* 2017). A destoxificação do hidrolisado ácido está associada com melhor desempenho na cinética fermentativa, resultando em maior produtividade alcoólica. Uma destoxificação deficiente diminui a produtividade de etanol pela ação de compostos que causam danos à célula. Compostos tóxicos resultam em perda nos níveis de ATP e NAD(P)H, o que prejudica a ação enzimática (Almeida *et al.* 2007) e compromete a via glicolítica (Palmqvist e Hahn-Hagerdal 2000). A desregulação na regeneração de cofatores resulta na produção de radicais, como peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e ânion de radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), mediados por espécies reativas de oxigênio (Perrone *et al.* 2008). É importante notar que os efeitos dos compostos tóxicos dependem do micro-organismo utilizado, das condições do processo e da concentração de substrato disponível (Almeida *et al.* 2007; Chandel *et al.* 2011b; Palmqvist e Hahn-Hagerdal 2000). A ação dos compostos tóxicos ocorre no crescimento celular, afetando principalmente a fase de *lag* e decrescendo o rendimento alcoólico (Almeida *et al.* 2007; Palmqvist e Hahn-Hagerdal 2000).

[060] Portanto, existe uma grande necessidade de formas alternativas para destoxificar a biomassa hidrolisada, e possíveis adsorventes/absorventes capazes de remover os compostos formados durante o pré-tratamento. No presente pedido de patente de invenção, a depleção de alguns compostos pelo uso de células ativas e inativas de levedura foi equivalente ao carvão ativado (Fig. 2), um material amplamente utilizado no processo de adsorção de compostos tóxicos presentes em hidrolisados ácidos de materiais lignocelulósicos. O uso do adsorvente biológico, como as células de levedura, é vantajoso por ser inerente ao processo e por ser um material economicamente acessível, o que favorece seu uso em comparação aos adsorventes químicos e físicos. As células de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido utilizadas, por exemplo, na absorção de metais (Ferreira *et al.* 2007) e na depleção de corantes (Mitter e Corso 2013; Dilarri *et al.* 2016). Na destoxificação de materiais lignocelulósicos, outras espécies de leveduras foram utilizadas imobilizadas ou em suspensão (Fonseca *et al.* 2011; Antunes *et al.* 2015).

[061] A capacidade da célula de levedura de destoxificar furfural e 5-HMF deve-se a sua capacidade de modificar a estrutura dessas moléculas em compostos menos tóxicos, como seus respectivos álcoois (Palmqvist e Hahn-Hagerdal 2000). No entanto, essa via de reação consome NAD(P)H (Palmqvist *et al.* 1999) que, como mencionado anteriormente, pode interferir em vários processos biológicos.

[062] Ácido acético e fórmico representam outra importante classe de compostos capazes de inibir a atividade celular. Basicamente, a diferenciação na intensidade da ação desses compostos é devida aos valores de pKa (Jönsson e Martin 2016) e da condição do pH do médio, que interfere na dissociação ácida (Perna *et al.* 2018). Os

efeitos no metabolismo da levedura são causados por disfunção no equilíbrio do pH intracelular que é regulado pela enzima ATPase. O excesso de prótons causa um desequilíbrio nessa regulação com consequente consumo de ATP, o que resulta em ineficiência do crescimento celular e na perda de rendimento alcoólico (van Zyl *et al.* 1991; Almeida *et al.* 2007). No presente pedido de patente de invenção, embora a depleção do ácido acético tenha sido inferior a 10 % usando células ativas de *S. cerevisiae*, o crescimento e a viabilidade celular foram equiparados ao meio sintético que não o continha. Estudos têm sugerido que o ácido acético exerce efeito de inibição celular sob alta concentração (Perna *et al.* 2018), em doses baixas o ácido acético favoreceu o crescimento celular.

[063] Na fermentação do lote 4 (Tab. 3), observa-se baixa produtividade alcoólica para *S. stipitis* (8,59 g L⁻¹) em comparação com *S. cerevisiae* no mesmo substrato (22,64 g L⁻¹) (Lote 1 - Tab. 3). Uma possível explicação para a baixa eficiência de *S. stipitis* neste substrato é sua baixa afinidade no sistema de transporte de frutose (Lee e Fisher 1990) e na incapacidade metabólica da expressão da invertase, que hidrolisa a sacarose em monômeros fermentáveis. Portanto, houve baixa eficiência alcoólica para esta levedura (*S. stipitis*: Py: 33,23 % e Ry: 18,28 %) em comparação com *S. cerevisiae* (Py: 50,31 % e Ry: 48,17 %), que nesse substrato atingiu a máxima produtividade teórica.

[064] Por outro lado, o rendimento de álcool para *S. cerevisiae* foi inferior a 6 % com substrato de melaço e hidrolisado ácido destoxificado em relação ao substrato contendo apenas melaço (Lote 1 comparado ao Lote 3 - Tab. 3). Esses resultados sugerem que os compostos tóxicos permaneceram no substrato, mesmo em concentrações reduzidas (Fig. 2), exercendo efeitos negativos no metabolismo microbiano.

[065] Nakanishi *et al.* (2017) avaliaram o hidrolisado ácido contendo xilose (14,9 g L⁻¹) e glicose (42,9 g L⁻¹) e encontraram etanol entre 14,70 e 18,50 g L⁻¹ na fermentação com *S. stipitis*. Este resultado sugere que em meio contendo apenas xilose e glicose o rendimento alcoólico é melhor. Neste estudo, a suplementação de melaço forneceu sacarose, glicose e frutose ao meio. Essa pode ser uma das razões para a menor

produção de álcool nos lotes 7 e 8 (9,87 e 10,43 g L⁻¹). Em concordância com este estudo, Gutiérrez-Rivera (2015) relatou um rendimento de etanol de 11,4 g L⁻¹ usando xilose e melaço para *P. stipitis* (*S. stipitis*) sob condições limitadas de oxigênio.

[066] A cultura mista de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* em melaço e hidrolisado ácido destoxificado resultou na maior produtividade de etanol (23,48 g L⁻¹ / 48 h) (Lote 10 - Tab. 3) entre os lotes de fermentação testados. Este valor foi 2,5 % maior em relação ao meio não destoxificado (Lote 9 - Tab. 3) e apresentou melhor rendimento em relação à cultura isolada de *S. cerevisiae* em substrato contendo apenas melaço, o qual apresentou a segunda melhor eficiência em termos de produção absoluta de etanol (Lote 1 - Tabela 3). Deve-se notar que, mesmo em níveis percentuais tão baixos, isso pode significar um ganho considerável quando se trata de escala industrial. Outro importante resultado ocorrido no cultivo misto foi o consumo de açúcar. Aproximadamente 94 % do TRS foi consumida, por outro lado, com o cultivo isolado com *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, os valores de decaimento dos açúcares foi menor (83 % e 61 %), respectivamente (Lote 10 comparado aos Lotes 3 e 8 - Tab. 3).

[067] Realizar uma fermentação simultânea de açúcares de 5 e 6 carbonos por *S. cerevisiae* e *S. stipitis* ainda é um desafio. Embora *S. cerevisiae* contenha o gene da xilose redutase (Kahar et al. 2011), ela não é capaz de fermentar xilose (Chandel et al. 2011a; Lennartsson et al. 2014), a glicose é usada como substrato primário (van Zyl et al., 1993). *S. stipitis* fermenta naturalmente a xilose (Lee et al. 1986; Sanchez et al. 2004; Gírio et al. 2010; Ferreira et al. 2011), no entanto, a glicose é consumida preferencialmente em um substrato com a mistura glicose e xilose (Gutiérrez-Rivera et al. 2012).

[068] Sob as condições avaliadas neste estudo, verificou-se que açúcares de 6 C foram preferencialmente consumidos durante a fermentação de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* (dados não mostrados).

[069] Estes resultados concordam com Gutiérrez-Rivera et al. (2012) que verificaram comportamento semelhante na co-cultura testada com dosagem semelhante de glicose e xilose. No entanto, os autores enfatizam que a preferência pelo uso de glicose pode ser alterada pela razão de concentração de açúcar disponível no substrato. Esses

autores observaram esse comportamento na relação glicose e xilose (25 e 10 g L⁻¹), nessas condições os açúcares foram consumidos simultaneamente.

[070] A cultura mista com diferentes espécies de leveduras pode apresentar limitações na diferença fisiológica de necessidade de oxigênio (efeito Crabtree e efeito não Crabtree) (Delgenes *et al.* 1996), supressão de um açúcar sobre o outro (van Zyl *et al.* 1993), na intolerância a alta concentração de etanol (Meyrial *et al.* 1995) e na predominância de uma das espécies (Gutiérrez-Rivera *et al.* 2015). Porém, os testes mostraram que houve um aumento na produtividade alcoólica quando as leveduras foram associadas (Batch 9 e 10 - Tab. 3).

[071] Alguns pontos podem ser destacados no presente pedido de patente de invenção, a investigação de absorção utilizando células ativas e inativas de leveduras mostrou melhora na qualidade do hidrolisado ácido pela depleção ou transformação dos principais compostos tóxicos; o crescimento celular foi melhor adaptado ao substrato que foi submetido ao processo de destoxificação com alguns materiais adsorventes e absorventes, resultando em menor porcentagem de morte celular e melhora no rendimento de etanol; o absorvente de origem biológica utilizado na destoxificação do hidrolisado é vantajoso, pois é inerente ao processo fermentativo e equivalente a outros materiais adsorventes mais caros; células ativas e inativas de leveduras permitem a destoxificação *in situ* e podem trazer ganhos na economia do processo; o melaço é uma importante fonte para suplementação de açúcares e vitaminas e pode ser utilizado em culturas mistas com as leveduras *S. cerevisiae* e *S. stipitis*; cultura mista sobre substrato com melaço e hidrolisado destoxificado alcançou melhor rendimento alcoólico (2,5 %) quando comparada a cultura isolada de *S. cerevisiae*, que obteve o segundo melhor rendimento alcoólico.

REIVINDICAÇÕES

1. **“DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO”**, o dito processo de destoxificação do ácido hidrolisado proveniente de bagaço de cana-de-açúcar **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- Etapa 1: Micro-organismos e cultivo do Inóculo: As leveduras utilizadas foram *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e *Scheffersomyces stipitis* (NRRL Y-7124); em que as culturas foram mantidas em meio sólido com ágar: Extrato de Levedura / Peptona / Glicose / Agar (YEPD) e Extrato de levedura / Peptona / Xilose / Agar (YEPX) (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ xilose ou glicose e 18 g L⁻¹ de ágar); em que as culturas foram mantidas em óleo mineral e estocadas em refrigerador (4°C ± 2°C), com transferência regular para novos meios; em que, para a multiplicação celular foi adicionado uma alçada de cultura preservada em óleo mineral para 50 mL de meio líquido YEPX contidos em frascos Erlenmeyer, este foi levado a mesa agitadora a 30 °C ± 2 °C, 130 rpm por 72 h e em que todos os meios foram esterilizados a 121 °C por 15 min;
- Etapa 2: Melaço de cana-de-açúcar: Utilizou-se melaço de cana-de-açúcar e o mesmo foi utilizado como fonte de açúcares redutores totais (ATR) (47 g L⁻¹/12° Brix) na fermentação; em que o melaço concentrado apresentou 56 % de ATR; em que a inversão da sacarose ocorreu mediante hidrólise ácida (HCl 1,3 mol L⁻¹); em que o melaço diluído utilizado na fermentação foi filtrado em membrana de 0,22 µm;
- Etapa 3: Pré-tratamento com ácido diluído: em que as etapas para a hidrólise ácida consistem de: secagem da biomassa (60°C), trituração em moinho de facas e posterior peneiramento (mesh 20); em que a pesagem de 50 g de biomassa seca foi adicionada em frascos de vidro do tipo Shot com 500 mL de solução de ácido sulfúrico (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 5,0 % m/v - H₂SO₄) (massa de material/volume de ácido, m/v); em que a mistura ficou em repouso por 12 h; em que os frascos foram autoclavados a 1 atm / 60 min, a massa resultante foi filtrada à vácuo, uma fração líquida foi obtida com monômeros de xilose, arabinose e glicose; em que, após filtração, o pH da fração

líquida foi ajustado (5,5) com solução de NaOH 10 mol L⁻¹; em que, após análise dos compostos tóxicos presentes na fração líquida obtida da hidrólise ácida, foi selecionado o tratamento a 2 % m/v H₂SO₄, sendo este utilizado na etapa de destoxificação, crescimento celular e fermentação;

- Etapa 4: Destoxificação com adsorventes/absorventes: em que cinco materiais foram utilizados na destoxificação: carvão ativado, argila ativada, hidrotalcita calcinada e células ativas e inativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, nas concentrações: 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 % (m/v); em que as células de leveduras foram cultivadas (YEPD) e posteriormente centrifugadas a 2500 rpm, desprezou-se o sobrenadante; em que as células ativas e inativas (células inativas foram previamente autoclavadas a 1 atm por 15 min) foram adicionadas diretamente ao hidrolisado; em que a biomassa equivalente em g L⁻¹ (secagem a 105 °C) para *S. cerevisiae* foi de: 1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 g L⁻¹ e para *S. stipitis*: 1,7; 3,5; 7,0 e 14,0 g L⁻¹; em que a hidrotalcita foi calcinada em forno mufla a 600 °C por 2 horas e posteriormente adicionada ao hidrolisado ácido; em que a argila e o carvão ativado foram adicionados diretamente ao hidrolisado; em que o processo de destoxificação foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada frasco continha 50 mL de hidrolisado ácido e o adsorvente/absorvente, que foram colocados em mesa agitadora a 30 °C, 120 rpm por 60 min; em que após o líquido foi centrifugado a 2500 rpm por 15 min; em que foram retiradas amostras para quantificação de crescimento e viabilidade celular e para análise cromatográfica; em que as amostras retiradas para crescimento celular foram suplementadas com extrato de levedura e peptona (10 e 20 g L⁻¹); em que as amostras para análise cromatográfica foram filtradas (0,22 µm) e estocadas em freezer (-5°C ± 2°C) para quantificação de furfural; 5-hidroximetilfurfural; ácido acético; ácido fórmico; xilose; glicose e arabinose;

- Etapa 5: Crescimento e viabilidade celular: em que *S. cerevisiae* e *S. stipitis* foram utilizadas como inóculo (10 % v/v) e avaliadas quanto ao crescimento celular em hidrolisado ácido destoxificado e suplementado; em que a equivalência (g L⁻¹) da suspensão celular a 4,7x10⁸ cels mL⁻¹ para *S. cerevisiae* foi de 0,92 g L⁻¹ e para *S. stipitis* (5,5x10⁸ cels mL⁻¹) de 1,10 g L⁻¹; em que os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de hidrolisado ácido contendo

arabinose, glicose e xilose nas concentrações de 1,5; 0,5; 15,7 g L⁻¹; em que os Erlenmeyers foram incubados a 120 rpm por 48 h e a 30 °C; em que as alíquotas foram retiradas para contagem celular nos tempos: 0; 12; 24; 36 e 48 h; em que o crescimento e a viabilidade celular foram realizados após diluição seriada em solução salina a 0,85 %, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer empregando-se eritrosina como corante diferencial; Utilizou-se cloranfenicol (5 ppm) como agente antibacteriano;

- Etapa 6: Fermentação: em que para a fermentação foi utilizada a fração líquida do hidrolisado ácido (2 % m/v), contendo 17,71 g L⁻¹ de RS, obtido do bagaço de cana-de-açúcar e o melaço de cana-de-açúcar que foi ajustado para concentração de 47 g L⁻¹ de ATR.

2. **“DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** percentual de viabilidade celular (Vc) da etapa 5, ser avaliado conforme a equação:

$$Vc = \frac{n^{\circ}celvivas}{n^{\circ}celvivas+n^{\circ}celmortas} \times 100$$

3. **“DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO”**, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** etapa 6 de fermentação ser conduzida da seguinte forma: em triplicata em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de substrato que foi suplementado com extrato de levedura e peptona (10 e 20 g L⁻¹); em que utilizou-se o inóculo de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* a 10 % v/v; em que a concentração celular inicial foi de 6.7x10⁸ cels mL⁻¹ para *S. cerevisiae* e de 6.0x10⁸ cels mL⁻¹ para *S. stipitis*.; em que os frascos foram incubados a 30 °C; em que o pH do meio foi monitorado durante todo o processo fermentativo e variou de 5,10 a 5,80; em que utilizou-se cloranfenicol a 5 ppm para controle de contaminantes bacterianos; em que amostras provenientes da fermentação (48 h) foram centrifugadas, o sobrenadante foi

filtrado (PVDF - Millex 22 μm) e armazenado em freezer ($-5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para posterior análise de crescimento celular, ATR e etanol; em que a eficiência da fermentação foi calculada pelo percentual de rendimento prático de etanol (dado pelo valor em g L^{-1}) e pela relação de ATR consumidos (Equação 2) e em que para rendimento real da produtividade, considerou-se o valor de etanol e a relação de ATR disponíveis no substrato (Equação 3).

Produtividade prática (P_y)	$R_y = \frac{E (\text{g/L}) \times 100}{S_i - S_f}$	Equação 2
---------------------------------	---	-----------

Produtividade real (R_y)	$R_y = \frac{E (\text{g/L}) \times 100}{S_i}$	Equação 3
------------------------------	---	-----------

Onde: E = etanol (g L^{-1}) e S = açúcares totais redutores (inicial/final).

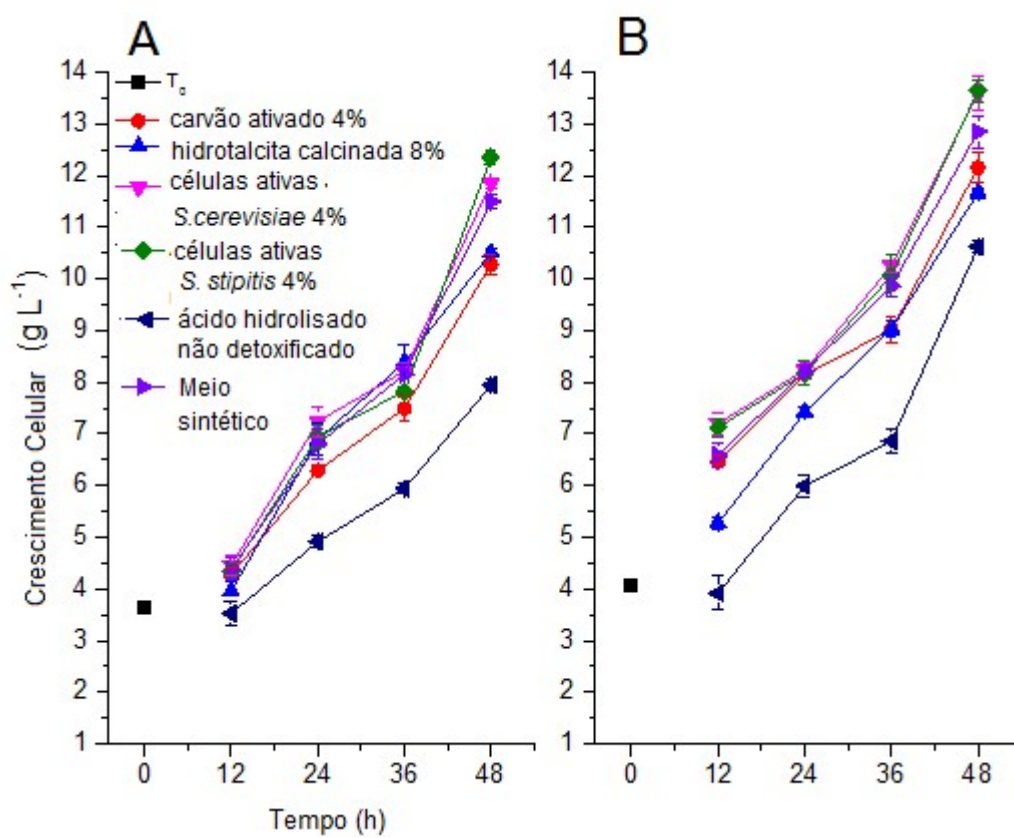
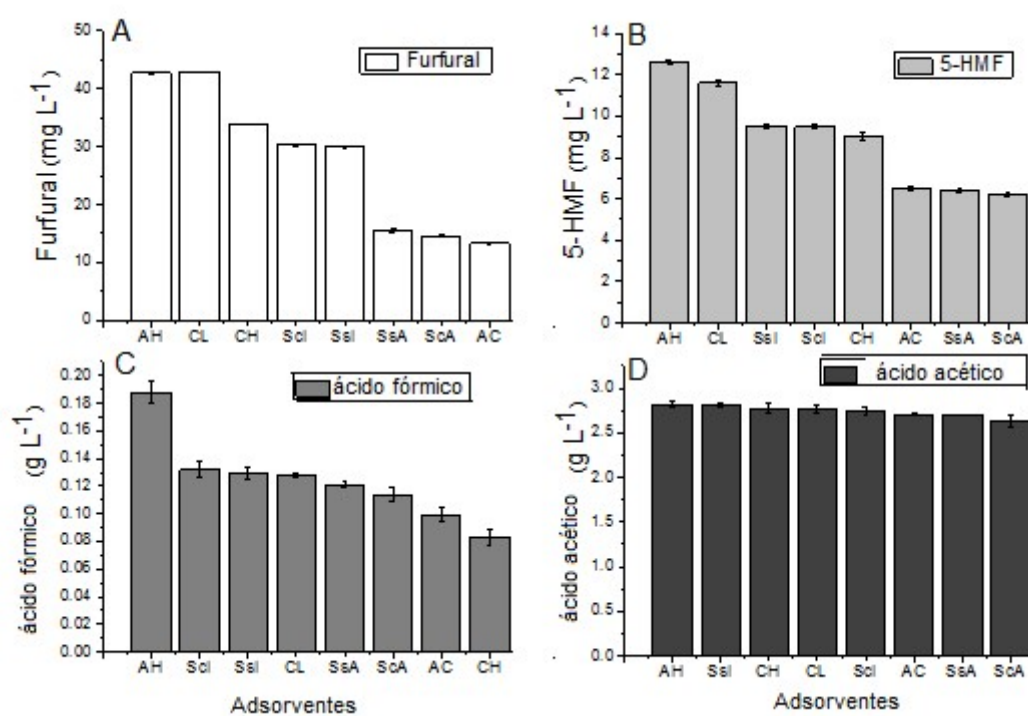


FIGURA 1



A) furfural; B) 5-HMF; C) ácido fórmico; D) ácido acético.

Subtítulos: AH – hidrolisado ácido não destoxificado; AC – carvão ativado; CL – argila; CH – hidrotalcita calcinada; Scl – células inativas de *S. cerevisiae*; Ssl – células inativas de *S. stipitis*; ScA – células ativas de *S. cerevisiae*; SsA – células ativas de *S. stipitis*

FIGURA 2

RESUMO

DESTOXIFICAÇÃO DE HIDROLISADO ÁCIDO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM CÉLULAS INATIVAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISEAE* VISANDO MELHORIA NO PROCESSO FERMENTATIVO.

O presente pedido de patente de invenção está relacionado com a destoxificação de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar com células inativas de *Saccharomyces cerevisiae* visando a melhoria no processo fermentativo. Para isso, foram investigadas diferentes concentrações de ácido sulfúrico na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (1 a 5 % m/v H_2SO_4) e o emprego de adsorventes/absorventes com a prerrogativa de melhorar a qualidade do hidrolisado ácido (AH) para fins microbiológicos de fermentação etanólica. Foi avaliado o crescimento celular e o rendimento fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) and *Scheffersomyces stipitis* (NRRL Y-7124). Hidrolisado ácido (HA) (pH 5.5) de bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como fonte de pentoses ($17,70 \text{ g L}^{-1}$) e melaço (ME) de cana-de-açúcar como fonte de hexoses ($47,00 \text{ g L}^{-1}$). Foram utilizados os adsorventes/absorventes: carvão ativado, argila, hidrotalcita calcinada e células ativas e inativas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, em concentrações que variaram (1 a 8 % m/v). Resultados de crescimento celular e caracterização química permitiram selecionar os materiais adsorventes/absorventes mais efetivos, com ênfase para células ativas de *S. cerevisiae* que removeu 66 % de furfural, 51 % de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), obtendo uma produtividade alcoólica de $23,48 \text{ g L}^{-1}$ em substrato contendo HA e ME, na presença de cultura mista. Células inativas, por sua vez, removeram níveis semelhantes de compostos tóxicos. Estes resultados indicam a aplicação de células de levedura (células ativadas e inativadas) na destoxificação de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar previamente à fermentação.