

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

MARIA DA GLÓRIA CONCEIÇÃO DA SILVA

**Engenharia Evolutiva de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para
Utilização na Produção de Etanol de Segunda Geração**

RECIFE
2013

MARIA DA GLÓRIA CONCEIÇÃO DA SILVA

Engenharia Evolutiva de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para
Utilização na Produção de Etanol de Segunda Geração

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Ana Maria Souto-Maior

RECIFE
2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Maria da Glória Conceição da

Engenharia evolutiva de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para utilização na produção de etanol de segunda geração / Maria da Glória Conceição da Silva. – Recife: O Autor, 2013.

84 f.: il.

Orientadora: Ana Maria Souto-Maior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2013.

Inclui referências

1. Álcool 2. Álcool como combustível 3. Fungos 4. Biotecnologia-Indústria I. Souto-Maior, Ana Maria (orient.) II. Título.

662.6692

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-248

MARIA DA GLÓRIA CONCEIÇÃO DA SILVA

**Engenharia Evolutiva de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*
para Utilização na Produção de Etanol de Segunda Geração**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Souto Maior
UFPE

Prof.^a Dr.^a Ester Ribeiro Gouveia
UFPE

Prof.^a Dr.^a Gláucia Manoella de Souza Lima
UFPE

Recife, 29 de abril de 2013.

Dedico primeiramente a Deus, a minha mãe
Mariluce, ao meu pai José, ao meu irmão
Felipe, ao meu namorado Darne, a minha
orientadora Ana Maria e aos meus
verdadeiros amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me cedeu o dom da vida, me dando forças para vencer as dificuldades e que me faz acreditar na minha superioridade diante das adversidades.

Aos meus pais José Mariano e Mariluce e ao meu irmão Felipe, pela força, dedicação e confiança dedicados a mim. Muito obrigada meus queridos pais por terem sempre batalhado apoiando as minhas escolhas.

Ao meu namorado Darne Almeida, pelo carinho, companheirismo, apoio, confidências, paciência, me ajudando a chegar onde estou. Muito obrigada meu eterno amor.

À minha orientadora Ana Maria Souto-Maior pela oportunidade, dedicação, apoio, amizade, paciência e por estar disposta a ajudar nas minhas conquistas. Muito obrigada pelo conhecimento adquirido.

Aos amigos e companheiros de experimentos no Laboratório de Processo Biotecnológicos em especial a Solange, Márcia, Clarissa, Cynthia, Thiago, Fernanda e Aldiana pela força e as minhas queridas e disputadas iniciação científica (ICs) Bruna e Jéssica.

A todo o pessoal do Laboratório de Processos Biotecnológicos pela amizade e apoio.

À professora Magali pelo apoio e permissão do uso do seu laboratório quando necessário. Muito obrigada.

À professora Norma por ter me dado a oportunidade de iniciar a vida científica no Departamento de Antibióticos.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial e acreditaram na realização do mesmo em especial a professora Ester Ribeiro Gouveia.

A todos aqueles do Departamento de Antibióticos que de alguma forma me ajudaram.

Ao CNPq, processo 551046/2010-4, pelo fornecimento da bolsa de Mestrado.

*“O Sucesso é a soma de pequenos esforços,
repetidos o tempo todo.” (Robert Collier)*

RESUMO

A presente dissertação teve como objetivo obter linhagens etanológicas robustas por engenharia evolutiva para produção de etanol de segunda geração. As duas linhagens utilizadas neste trabalho, *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 e *Zymomonas mobilis* UFPEDA 205, foram selecionadas em trabalho anterior por suas características de fermentação em meio de glicose, na presença e/ou na ausência de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Para a evolução das duas linhagens, foram realizadas transferências em tubos de ensaio contendo meios de fermentação com concentrações crescentes de hidrolisado, com a finalidade de aumentar a tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por tratamento hidrotérmico (195°C, 10 minutos, 10% carga de sólidos) em um reator descontínuo de 20 L (Regmed AU/E-20). *Z. mobilis* não cresceu em presença de hidrolisado com concentração acima de 25 % (v/v). A população procedente de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 cresceu em meio com até 75% (v/v) de hidrolisado. Dessa população, foram isoladas 2 linhagens, L1 e L2. A linhagem L2 foi escolhida para comparação com a linhagem parental por apresentar melhores resultados em produtividade celular e produtividade de etanol em fermentações com o hidrolisado. As fermentações foram realizadas em biorreator de bancada instrumentado de 2 L, com pH, agitação e temperatura controlados em 5, 500 rpm e 35°C, respectivamente. Em meio de fermentação com glicose, sem hidrolisado hemicelulósico, *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 e *S. cerevisiae* L2 apresentaram, respectivamente, rendimentos de etanol iguais a 0,37 g g⁻¹ e 0,38 g g⁻¹ e produtividades de etanol 2,42 g L⁻¹ h⁻¹ e 1,75 g L⁻¹ h⁻¹. UFPEDA 1238 e L2, em meio de fermentação com glicose e hidrolisado, exibiram, respectivamente, rendimentos de etanol iguais a 0,07 g g⁻¹ e 0,20 g g⁻¹ e produtividades de etanol iguais a 0,05 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,16 g L⁻¹ h⁻¹. Através de engenharia evolutiva, foi, portanto, possível se obter uma linhagem de *S. cerevisiae* que apresentou um melhor desempenho fermentativo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em comparação com a linhagem parental.

Palavras-chave: bioetanol; inibidores; fermentação

ABSTRACT

The aim of this work was obtaining robust ethanologenic microorganisms by evolutionary engineering for second generation ethanol production. The two strains used in this study, *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 and *Zymomonas mobilis* UFPEDA 205, were selected in previous work for their fermentation characteristics in glucose media, in the presence and/or absence of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. For the evolution of the two strains, aiming the increase of tolerance to inhibitors present in the hydrolysate, transfers were made in test tubes containing fermentation media with increasing concentrations of the hydrolysate. The hemicellulosic hydrolysate was obtained by hydrothermal treatment (195 °C, 10 min) in a 20 L batch reactor (Regmed AU/E-20). *Z. mobilis* ZAP was not capable of growing in the presence of 25% (v/v) hydrolysate concentration. The population originating from *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 grew in media containing up to 75% (v/v) hydrolysate. From this population, two strains, L1 and L2, were isolated. L2 was chosen for comparison with the parental strain for showing best results in cell productivity and yield of ethanol after fermentation in hydrolysate. The fermentations were carried out in an instrumented 2 L bioreactor, with pH, agitation and temperature controlled at 5, 500 rpm and 35 °C, respectively. In glucose medium without hydrolysate, *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 and *S. cerevisiae* L2 showed, respectively, ethanol yields of 0.37 g g⁻¹ and 0.38 g g⁻¹ and ethanol productivities of 2.42 g L⁻¹ h⁻¹ and 1.75 g L⁻¹ h⁻¹. In glucose medium with hemicellulosic hydrolyzed, UFPEDA 1238 and L2 exhibited, respectively, ethanol yields of 0.07 g g⁻¹ and 0.20 g g⁻¹ and ethanol productivities of 0.05 g L⁻¹ h⁻¹ and 0.16 g L⁻¹ h⁻¹. Through evolutionary engineering it was thus possible to obtain a strain of *S. cerevisiae* with better fermentation performance in sugarcane bagasse hydrolyzate compared to the parental strain.

Key-words: bioethanol; inhibitors; fermentation

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
NOMENCLATURA.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Matriz Energética.....	4
3.2 Etanol.....	6
3.3 Composição dos Materiais Lignocelulósicos.....	7
3.3.1 Celulose.....	8
3.3.2 Hemicelulose.....	9
3.3.3 Lignina.....	9
3.4 Inibidores da Fermentação Presentes em Hidrolisados Lignocelulósicos.....	11
3.5 Efeito dos Inibidores sobre os Micro-organismos.....	13
3.6 Mecanismo de Ação dos Inibidores.....	15
3.7 Micro-organismos para a Produção de Etanol.....	18
3.7.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.7.2 <i>Zymomonas mobilis</i>	22
3.8 Desenvolvimento de Linhagens Robustas para Produção de Etanol de Segunda Geração.....	25

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Micro-organismos.....	29
4.2 Meios de Cultura.....	29
4.2.1 Meio de manutenção.....	29
4.2.2 Meio de preparação do pré-inóculo e inóculo.....	30
4.2.3 Meios de fermentação.....	31
4.3 Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar.....	33
4.4 Procedimento Experimental.....	35
4.4.1 Fermentação com reciclo de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meio de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	35
4.4.2 Evolução das linhagens.....	37
4.4.3 Isolamento e seleção de linhagens evoluídas.....	39
4.4.4 Comparação entre a linhagem parental e evoluída.....	40
4.5 Métodos Analíticos.....	41
4.5.1 Determinação de concentração de biomassa.....	41
4.5.2 Determinação da viabilidade celular.....	42
4.5.3 Determinação das concentrações de produtos e substrato.....	42
4.6 Parâmetros Cinéticos da Fermentação.....	45
4.6.1 Rendimento de biomassa microbiana ($Y_{X/S}$).....	45
4.6.2 Rendimento de produto em substrato ($Y_{P/S}$).....	45
4.6.3 Rendimento de coproduto em substrato ($Y_{CP/S}$).....	45
4.6.4 Eficiência do processo fermentativo.....	46
4.6.5 Produtividades.....	46
4.7 Análise Estatística.....	47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Fermentação com Reciclo de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238.....	48
5.2 Obtenção de Linhagens Resistentes aos Inibidores Através da Engenharia Evolutiva.....	56
5.2.1 Evolução de <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 205.....	57
5.2.2 Evolução de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238.....	57
5.2.3 Comparação das linhagens parental e evoluídas.....	58
5.3 Fermentação de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 e L2.....	65
5.3.1 Caracterização da linhagem UFPEDA 1238.....	65
5.3.2 Caracterização da linhagem L2.....	68
6. CONCLUSÕES E SUGESTÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1:	Projeção da produção de petróleo. Fonte: CNI, 2007..	4
Figura 3.2:	Participação de renováveis e não renováveis na matriz energética Mundial e Brasileira em 2011 e 2012. Fonte: EPE, 2012.....	5
Figura 3.3:	Estrutura da fibrila de celulose. Modificado de Silva et al. (2009).....	9
Figura 3.4:	Representação esquemática da hemicelulose. (SANTOS et al. 2012).....	9
Figura 3.5:	Estrutura proposta para lignina de madeira do <i>Eucalyptus grandis</i> (PILÓ-VELOSO et al., 1993).....	10
Figura 3.6:	Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H). (BARBOSA et al., 2008).....	11
Figura 3.7:	Compostos formados durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos. Modificado de Palmqvist et al. (2000b).....	12
Figura 3.8:	Modos de atuação dos inibidores nos micro-organismos durante a fermentação. Modificado de Hasunuma & Kondo (2012).....	16
Figura 3.9:	Vias de conversão de 2-furaldeído (furfural) e 5-(hidroximetil)-2-furaldeído. Modificado de Liu et al. (2009).....	17
Figura 3.10:	Via metabólica da fermentação do etanol em <i>S. cerevisiae</i> . Modificado de Bai et al. (2008).....	21
Figura 3.11:	Vias metabólicas de carboidratos em <i>Z. mobilis</i> . Modificado de Sprenger (1996).....	23
Figura 3.12:	Princípio da Engenharia evolutiva. Modificado de Hahn-Hägerdal et al. (2005).....	26
Figura 4.1:	Sequência utilizada para a obtenção de meio de fermentação com hidrolisado estéril a base de glicose.....	31
Figura 4.2:	Reator de 20 L (REGMED AU/E-20) utilizado para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	34
Figura 4.3:	Fluxograma de obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	34

Figura 4.4:	Cultivo do inóculo para uso no experimento de reciclo de células em mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, C25KC), em frascos Fernbach com 300 mL de meio de inóculo.....	36
Figura 4.5:	Inóculo obtido após a centrifugação em 1000 x g por 5 minutos a 4 °C.....	37
Figura 4.6:	Fermentação de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em tubos contendo meio de fermentação a base de glicose sem hidrolisado (A) e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (B), após 8 horas.....	37
Figura 4.7:	Sequência planejada para a realização da evolução de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 e <i>Z. mobilis</i> UFPEDA 205 em meio de fermentação a base de glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	39
Figura 4.8:	Tubo inoculado com <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 apresentando produção de gás e turbidez, à esquerda, e tubo não inoculado (controle) à direita.....	39
Figura 4.9:	Biorreator utilizado para as fermentações e comparação das linhagens (New Brunswick Scientific, Bioflo 110).....	41
Figura 4.10:	Sistema para realização de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, Série 1100) pertencente ao Departamento de Antibióticos utilizado para a quantificação da concentração de substrato, produtos e inibidores.....	43
Figura 5.1:	Consumo de glicose (200 g L^{-1}) durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.....	49
Figura 5.2:	Concentração de etanol produzido durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.....	49
Figura 5.3:	Concentração de Glicerol produzido durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.....	53
Figura 5.4:	Concentração de Ácido acético (g L^{-1}) produzido durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.....	53
Figura 5.5:	Concentração de Furfural e Hidroximetil Furfural (HMF) durante 8 horas de fermentação, em meio com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.	55

Figura 5.6:	Viabilidade celular obtida ao final de cada 8 horas de fermentação.....	55
Figura 5.7:	Viabilidade celular inicial e após 8 horas de fermentação.....	55
Figura 5.8:	Placa de Petri contendo meio de manutenção com hidrolisado hemicelulósico a 75%(v/v) apresentando o crescimento de colônias na superfície após 9 dias em estufa a 35 °C.....	58
Figura 5.9:	Absorbância das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em presença de meio de fermentação com glicose e hidrolisado.....	59
Figura 5.10:	Consumo da glicose pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas, em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	60
Figura 5.11:	Produção de etanol pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas, em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	60
Figura 5.12:	Produção de glicerol pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	63
Figura 5.13:	Produção de ácido acético pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas, em, meio de fermentação com glicose e hidrolisado.....	63
Figura 5.14:	Percentual remanescente das concentrações dos inibidores, após 24 horas de fermentação em meio de glicose e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	64
Figura 5.15:	Perfil de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meio de glicose (100 g L ⁻¹).....	67
Figura 5.16:	Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	68
Figura 5.17:	Perfil de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e coprodutos por <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	69

Figura 5.18:	Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	70
Figura 5.19:	Perfil de consumo de substrato e produção de etanol e coproduto por de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meio com melaço e hidrolisado hemicelulósico.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1:	Composição da matriz energética no Mundo e no Brasil.....	5
Tabela 3.2:	Inibidores presentes em diversas fontes de matérias-primas após o tratamento para liberação da celulose presente no material lignocelulósico.....	13
Tabela 3.3:	Características Importantes em micro-organismos para a produção de etanol. Modificado de Dien et al. (2003).	19
Tabela 4.1:	Composição do meio GLP para manutenção de <i>S. cerevisiae</i> (pH=7,0).	29
Tabela 4.2:	Composição do meio SSDL para manutenção de <i>Z. mobilis</i> (pH=6,5).	30
Tabela 4.3:	Composição do meio de cultura utilizado para preparação de inóculos para ambas as linhagens (pH = 6,0).	30
Tabela 4.4:	Composição do meio utilizado nas fermentações com reciclo (pH = 5,0).....	32
Tabela 4.5:	Composição do meio de fermentação utilizado para a evolução das linhagens (pH = 5,0).....	32
Tabela 4.6:	Composição do meio de fermentação para a caracterização das linhagens em biorreator instrumentado.....	33
Tabela 4.7:	Composição e concentração de açúcares e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico.....	35
Tabela 5.1:	Produtividade de etanol de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L ⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.....	50

Tabela 5.2:	Rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 em meios contendo 200 g L ⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.....	51
Tabela 5.3:	Eficiência da produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L ⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.....	52
Tabela 5.4:	Rendimento de coprodutos de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L ⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.....	54
Tabela 5.5:	Análise estatística da viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L ⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.....	56
Tabela 5.6:	Produtividade e rendimento em etanol para as linhagens <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 de fermentação em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	61
Tabela 5.7:	Rendimento de biomassa e produtividade celular para as linhagens <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 de fermentação em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	61
Tabela 5.8:	Eficiência da fermentação pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.....	62
Tabela 5.9:	Rendimento de coprodutos glicerol e ácido acético pelas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em presença de meio de fermentação com glicose e hidrolisado.....	64
Tabela 5.10:	Viabilidade celular das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em presença de meio de fermentação com glicose e hidrolisado.....	65
Tabela 5.11:	Comparação dos parâmetros cinéticos da fermentação de <i>S. cerevisiae</i> UFPEDA 1238 e <i>S. cerevisiae</i> L2 em meio de fermentação com glicose e hidrolisado.....	72

NOMENCLATURA

X	Concentração de biomassa (g L^{-1})
S	Concentração de substrato (g L^{-1})
P	Concentração de produto (g L^{-1})
CP	Concentração de coproduto (g L^{-1})
$Y_{X/S}$	Rendimento de biomassa em substrato (g g^{-1})
$Y_{P/S}$	Rendimento de produto em substrato (g g^{-1})
$Y_{CP/S}$	Rendimento de coproduto em substrato (g g^{-1})
Q_X	Produtividade volumétrica de biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Q_P	Produtividade volumétrica de produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Q_{CP}	Produtividade volumétrica de coproduto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

Subscritos

i	Inicial
f	Final

Siglas

BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CNI	Confederação Nacional da Indústria
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UFPEDA	Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
EPE	Empresa de Pesquisa Energética

Abreviaturas

ADH	Álcool desidrogenase
-----	----------------------

EDA	2-ceto-3-desoxi-gluconato de aldolase
EDD	6-fosfogluconato desidratase
ENO	Enolase
FBPA	Frutose bifosfatoaldolase
FDM	Furano - 2,5 dimetanol (também denominado 2,5-bis-hidroximetilfurano)
FK	Fructokinase
FM	Furano-metanol (também conhecido por álcool fufurílico)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFOR	Glicose-frutose oxidorreductase
GK	Glucoquinase
GNTK	Gluconatoquinase
GPDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HK	Hexoquinase
HMF	Hidroximetilfurfural
IGP	Fosfoglucoisomerase
INVB	Invertase
KDPG	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
LEVU	Levansucrase
PDC	Descarboxilase do piruvato
PFK	Fosfofrutoquinase
PGK	Fosfogliceratoquinase
PGL	Fosfogluconolactonase
PGM	Fosfogliceromutase
PYK	Piruvatoquinase
TPI	Triose fosfato isomerase

1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 80, a crise do petróleo gerou uma intensa preocupação em como encontrar recursos energéticos renováveis capazes de substituir os atuais produtos oriundos de fontes petrolíferas. Diante da consciência atual de que os combustíveis fósseis irão se esgotar, faz-se necessária a busca de substitutos para esses combustíveis, que sejam menos impactantes para o meio ambiente, e nada mais racional do que produzi-los a partir de matéria orgânica renovável, ou seja, biomassa, sendo o etanol atualmente a melhor opção de combustível automotivo (BNDES & CGEE, 2008).

Dentro do contexto da produção de etanol lignocelulósico (etanol de 2^a geração), um conceito emergente está sendo desenvolvido, trata-se da “biorrefinaria”, referente à conversão da biomassa de diversas fontes em uma diversidade de produtos como energia, biomateriais e produtos químicos (OCTAVE & THOMAS, 2009). Grande parte das pesquisas em biorrefinaria está focada, atualmente, na área de produção de energia, destacando assim a importância dos biocombustíveis e dentre eles o etanol de 2^a geração (CGEE, 2010).

Materiais lignocelulósicos contêm até 70% de hidratos de carbono (como celulose e hemicelulose). No entanto, devido à estreita associação da celulose e hemicelulose com a lignina na parede celular dos vegetais, um pré-tratamento é necessário para tornar a celulose disponível para hidrólise enzimática e posterior fermentação. Durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, além de açúcares, uma ampla gama de compostos são formados e liberados, e muitos desses componentes inibem o crescimento de micro-organismos e a capacidade de fermentação do hidrolisado obtido. Os principais compostos tóxicos citados na literatura incluem hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético, vários compostos aromáticos e compostos fenólicos (ácido ferúlico, ácido p-cumárico, siringaldeído, vanilina, entre outros) (MUSSATTO et al., 2004).

Para a produção comercial de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos, faz-se necessário o uso de linhagens de micro-organismos capazes de fermentar hexoses e pentoses com altos rendimento e produtividade de etanol, como também que apresentem tolerância aos inibidores formados durante o pré-tratamento da

matéria-prima ou formados durante a fermentação (TIAN et al., 2009,2011; ALMEIDA et al., 2008).

Diante do exposto, torna-se evidente a importância da obtenção de micro-organismos robustos, capazes de serem utilizados em hidrolisados, originados de matéria-prima de baixo custo, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, sem uma prévia destoxificação dos mesmos. A Engenharia Evolutiva é uma estratégia que busca o melhoramento de micro-organismos, fundamentando-se no princípio da variação e seleção natural. Trata-se de uma alternativa, podendo até complementar a Engenharia Metabólica, na procura de fenótipos com características desejadas através da manutenção de micro-organismos em ambientes com uma ou mais pressões seletivas (SAUER, 2001).

Em trabalho realizado anteriormente por Sá (2012), foi comparada a produção de etanol entre 10 linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e entre 10 linhagens de *Zymomonas mobilis*, pertencentes à Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Entre as linhagens da levedura e da bactéria, foi possível selecionar duas linhagens, uma de cada grupo, que se destacaram por suas características de fermentabilidade em meio de glicose, na presença e/ou na ausência de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. As linhagens selecionadas, *S. cerevisiae* UFPEDA1238 e *Z. mobilis* UFPEDA 205, apresentaram ainda forte inibição do crescimento na presença de hidrolisado hemicelulósico.

Na presente pesquisa, o objetivo foi o melhoramento das linhagens *S. cerevisiae* UFPEDA1238 e *Z. mobilis* UFPEDA 205, através de engenharia evolutiva, para obtenção de linhagens mais tolerantes aos inibidores presentes em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar e, com isto, dar-se continuidade aos trabalhos previamente desenvolvidos no Laboratório de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desta proposta foi, por meio de engenharia evolutiva, obter um micro-organismo robusto para aplicação na produção de etanol de segunda geração.

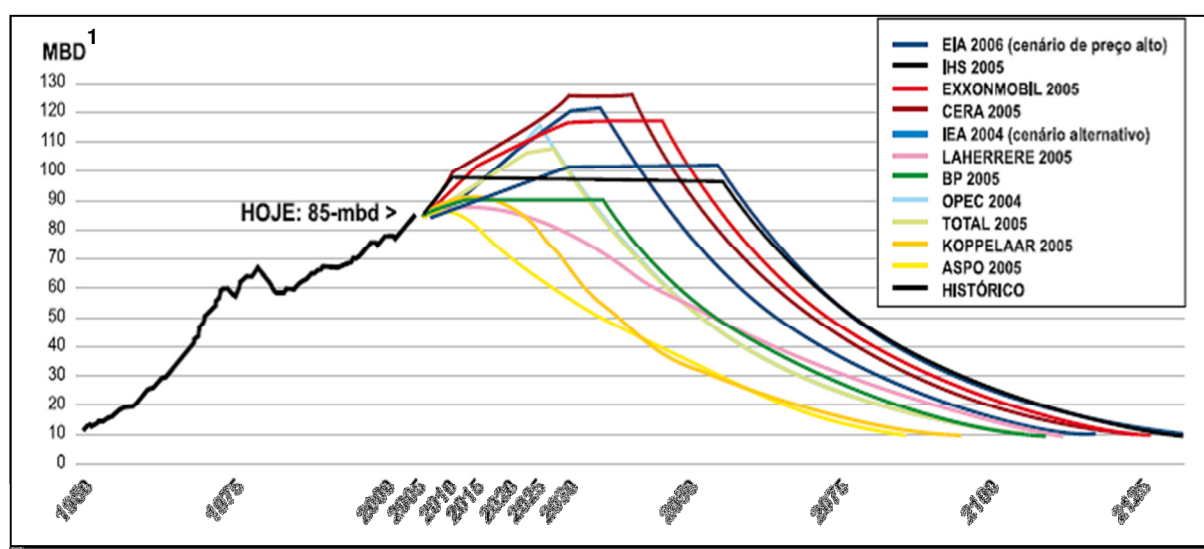
2.2. Objetivos Específicos

- Obter os parâmetros fermentativos da linhagem *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 por meio de fermentação com reciclo de células em meio à base de glicose, sem e com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar;
- Evoluir *S. cerevisiae* UFPEDA1238 e *Z. mobilis* UFPEDA 205 por meio de pressão seletiva, em meios contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em concentrações crescentes;
- Comparar as linhagens evoluída e parental através de experimentos em meios sem e com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Matriz Energética

A demanda energética no mundo indica o acréscimo de 1,7% ao ano de barris de petróleo entre 2000 a 2030, quando alcançará o consumo de 15,3 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo por ano. Se não houver uma mudança na matriz energética mundial, os combustíveis fósseis corresponderão a 90% deste aumento. No entanto, as reservas mundiais comprovadas de petróleo permitem suprir a demanda mundial por cerca de 40 anos, se forem mantidos os atuais níveis de consumo. É claro que tanto as reservas quanto o consumo incrementarão, mas se antevê que as reservas crescerão menos durante esse período. A Figura 3.1 ilustra as variações das projeções da produção de petróleo desde um decaimento imediato até acréscimos significativos de produção nos próximos anos (EMBRAPA, 2006; CNI, 2007).



¹ Milhões de barris por dia

Figura 3.1: Projeção da produção de petróleo. Fonte: CNI, 2007.

Observa-se que a matriz energética mundial é profundamente voltada para as fontes de origem fóssil, com participação global de 80%, sendo 36% de petróleo, 23% de carvão e 21% de gás natural (Tabela 3.1). O Brasil se destaca dentre as economias industrializadas pela elevada participação de fontes renováveis em sua

matriz energética, cerca de três vezes maior que a média mundial (EMBRAPA, 2006; TOLMASQUIM et al., 2007).

Tabela 3.1: Composição da matriz energética no Mundo e no Brasil.

Fonte	Mundo (%)	Brasil (%)
Petróleo	35,3	43,1
Carvão mineral	23,2	6,0
Gás natural	21,1	7,5
Biomassa tradicional	9,5	8,5
Nuclear	6,5	1,8
Hidrelétrica	2,2	14,0
Biomassa moderna	1,7	23,0
Outras renováveis	0,5	0,1

Fonte: EMBRAPA (Plano Nacional de Agroenergia, 2006-2011).

Dados do balanço energético nacional (Figura 3.2) indicam que a participação de renováveis na Matriz Energética Brasileira permaneceu entre as mais elevadas do mundo (EPE, 2012).

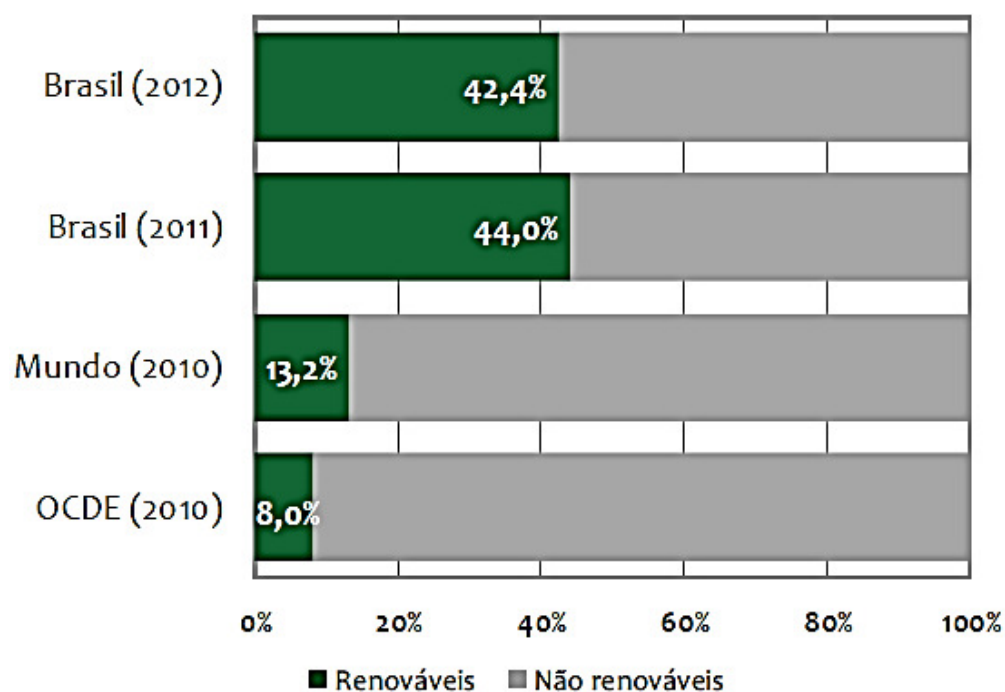


Figura 3.2: Participação de renováveis e não renováveis na matriz energética Mundial e Brasileira em 2011 e 2012. Fonte: EPE, 2012.

A energia por meio da agricultura no Brasil procede de quatro fontes de biomassa: as derivadas de cultivos ricos em carboidratos ou amiláceos, que geram o etanol; as procedidas de lipídios vegetais e animais, que geram o biodiesel; a madeira, que pode gerar o metanol, briquetes ou carvão vegetal; e os resíduos e dejetos da agropecuária e da agroindústria que podem gerar calor e energia elétrica. Em todas elas o Brasil tem vantagens comparativas na produção e pode criar vantagens competitivas para ser líder mundial no biomercado e no mercado internacional de energia renovável (EMBRAPA, 2006).

Nas próximas décadas, a biomassa deverá ser base da energia renovável e insumo para a indústria química. Especialistas acreditam que ela movimentará o maior volume de recursos das transações agrícolas internacionais, a partir de 2050. (EMBRAPA, 2006).

Projeções da Agência Internacional de Energia indicam que a participação da biomassa na geração mundial de eletricidade deverá passar de 10TWh, em 1995, para 27TWh, em 2020(EIA,2012).

Os resíduos da produção sucroalcooleira que podem ser utilizados na produção de eletricidade via cogeração são o bagaço, a palhada e os ponteiros da cana, além do vinhoto das destilarias de álcool. Do total da energia contida na cana, o álcool responde por cerca de um terço. O restante é distribuído entre o bagaço, os ponteiros e a palhada (EMBRAPA, 2006).

Alternativamente à cogeração, o bagaço ainda pode ser usado fora das usinas e destilarias, como ração animal, na fabricação de papel, na fabricação de elementos estruturais e até na produção de álcool combustível adicional, por hidrólise. Na verdade, tecnologias de produção de etanol a partir da hidrólise do bagaço estão em desenvolvimento e poderão atingir estágio comercial em 10 a 15 anos. Consequentemente, passa a ser importante a oportunidade do aproveitamento do bagaço, em virtude das múltiplas alternativas disponíveis (EMBRAPA, 2006).

3.2. O Etanol

O PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool) foi um programa governamental, instituído na década de 70, que teve originalmente como objetivo a produção de um combustível alternativo aos derivados de petróleo (MOREIRA &

GOLDEMBERG, 1999). A crise do petróleo e os baixos preços do açúcar conduziram o Brasil a uma nova estratégia, iniciando uma política para substituição da gasolina com álcool de cana-de-açúcar. O programa contou com a participação de diversas adesões tais como grupos políticos, grupos militares, destilarias, produtores de cana, pesquisadores e a mídia. A partir desse momento, o etanol passou a ter uma importância maior no cenário socioeconômico do País (SOCCOL et al., 2005).

No Brasil, existe o etanol hidratado, com 5% de água, que abastece os automóveis *flex fuel*, e o etanol anidro, com 0,5% de água, misturado na gasolina numa proporção de 20% a 25%. O etanol polui menos o ar do que os derivados do petróleo porque é um combustível mais limpo (não contém certos poluentes, como o benzeno, que são prejudiciais à saúde e ao meio ambiente). Além disso, a sua queima é mais completa, reduzindo a quantidade de poluentes na atmosfera. No Brasil, a cana-de-açúcar não compete com os alimentos e ainda tem um enorme potencial para produzir muito mais etanol e bioeletricidade por área cultivada, com o pleno aproveitamento do bagaço e da palha da cana, o que deve ocorrer nos próximos anos (UNICA, 2007).

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes tipos de matérias-primas. Essas são classificadas em três categorias em função da sua estrutura e complexidade molecular: matérias-primas açucaradas (por exemplo: cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino), matérias-primas amiláceas (por exemplo: milho, trigo, arroz, batata e mandioca) e matérias-primas lignocelulósicas (madeira, palha e bagaço de cana, sabugo e palha de milho, palha de trigo). Em relação aos materiais lignocelulósicos, estes podem ser ainda classificados em quatro grupos baseados no tipo da fonte da matéria-prima em: resíduos florestais, resíduos sólidos urbanos, resíduos de papel e resíduos de colheita (BALAT, 2011).

3.3 Composição dos Materiais Lignocelulósicos

O bagaço, como outros materiais lignocelulósicos, possui três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, que, devido à sua natureza recalcitrante, não podem ser facilmente separados em componentes prontamente utilizáveis. Sendo assim, a produção de bioetanol de segunda geração envolve geralmente

quatro etapas: pré-tratamento, para tornar a celulose acessível; hidrólise com a adição de enzimas ou um catalisador ácido para liberar os açúcares monoméricos; fermentação para converter açúcares em etanol e, finalmente, a destilação, para recuperação do produto (MARGEOT et al., 2009).

A biomassa vegetal é composta majoritariamente de celulose, hemicelulose, e lignina, juntamente com pequenas quantidades de pectina, proteína, extrativos (materiais solúveis não estruturais, tais como açúcares não estruturais, materiais nitrogenados, clorofila e ceras) e cinzas. A celulose é o principal componente estrutural da parede celular dos vegetais, sendo encontrada como uma estrutura fibrosa organizada. Como também é um dos compostos orgânicos mais abundantes na biosfera (KUMAR et al., 2009).

3.3.1 Celulose

A estrutura da fibrila de celulose é mostrada na Figura 3.3. Este polímero linear consiste em subunidades de β -D-glicoses ligadas entre si por ligações glicosídicas β - (1,4) carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se agregam paralelamente formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam tanto regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras apresentam maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade. A celulose cristalina compreende a maior proporção da celulose, enquanto que apenas uma pequena porcentagem abrange a celulose amorfa. A celulose é mais suscetível à degradação enzimática em sua forma amorfa.

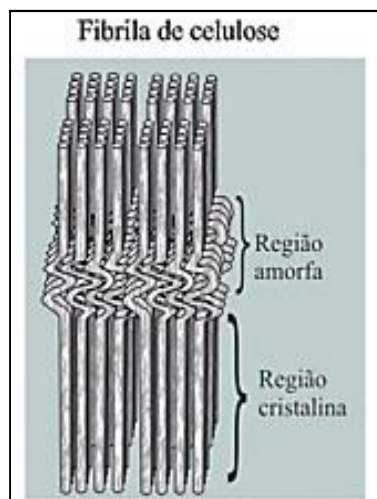


Figura 3.3: Estrutura da fibrila de celulose. Modificado de Silva et al. (2009).

3.3.2 Hemicelulose

A fração hemicelulósica, apresentada na Figura 3.4, consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. É constituída ainda por ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturônico, e deoxiexoses (KUMAR et al., 2009). Em contraste com a celulose, os polímeros presentes em hemiceluloses são facilmente hidrolisáveis.

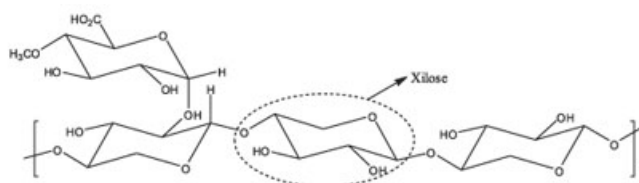


Figura 3.4: Representação esquemática da hemicelulose (SANTOS et al., 2012).

3.3.3 Lignina

A lignina é uma estrutura molecular complexa, contendo polímeros de monômeros fenólicos (Figura 3.5). Ela está presente na parede celular primária, dando suporte estrutural, impermeabilização e resistência contra ataque microbiano.

A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumarilíco, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 3.6). Em geral, plantas herbáceas, como gramíneas têm o menor conteúdo de lignina, enquanto coníferas tem o conteúdo mais alto de lignina (KUMAR et al., 2009).

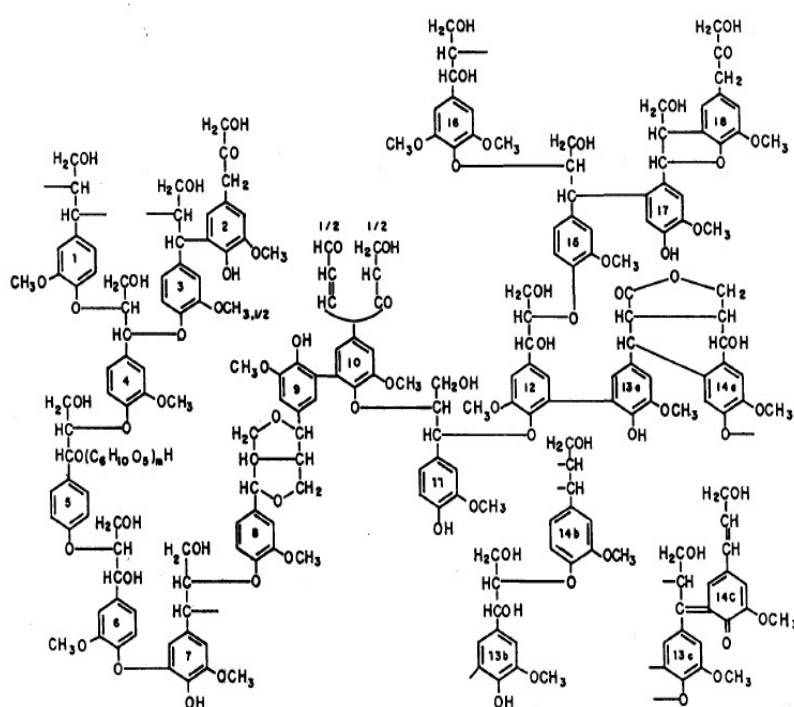


Figura 3.5: Estrutura proposta para lignina de madeira do *Eucalyptus grandis* (PILÓ-VELOSO et al., 1993).

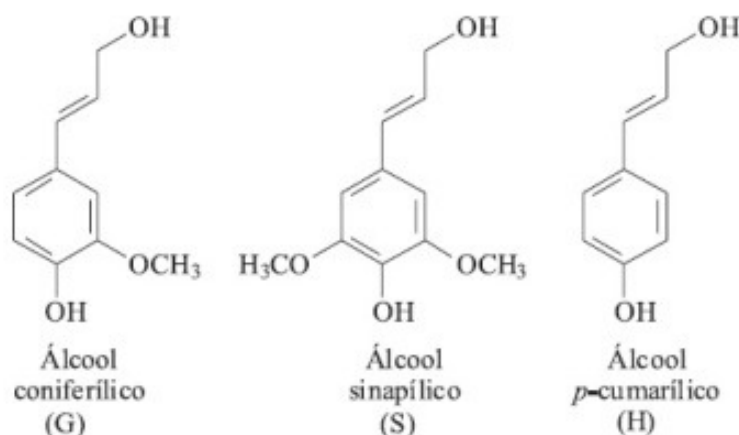


Figura 3.6: Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e p-hidroxifenila (H). (BARBOSA et al., 2008)

A lignina pode ser encontrada em maior quantidade na camada S2 da parede secundária, especialmente nas fibras, nos vasos e traqueídeos do xilema, fornecendo-os rigidez, suporte mecânico, impermeabilidade, consentindo o transporte de água e solutos. Também é encontrada, em menor quantidade, na periderme integrada à suberina onde atua como um obstáculo contra patógenos (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

3.4. Inibidores da Fermentação presentes em Hidrolisados Lignocelulósicos

O pré-tratamento é uma operação unitária chave para o sucesso da conversão de materiais lignocelulósicos para etanol. O principal papel dessa etapa é diminuir a interação entre os principais componentes da parede celular tornando-os suscetíveis à sacarificação e à fermentação (SOCCOL et al., 2010). Durante as etapas de pré-tratamento e de hidrólise, diferentes compostos, com caráter inibidor para micro-organismos etanologênicos, são formados e/ou liberados (Figura 3.7). Esses inibidores são geralmente divididos de acordo com os seus grupos funcionais como ácidos fracos, furanos e compostos fenólicos (PALMQVIST et al., 2000b).

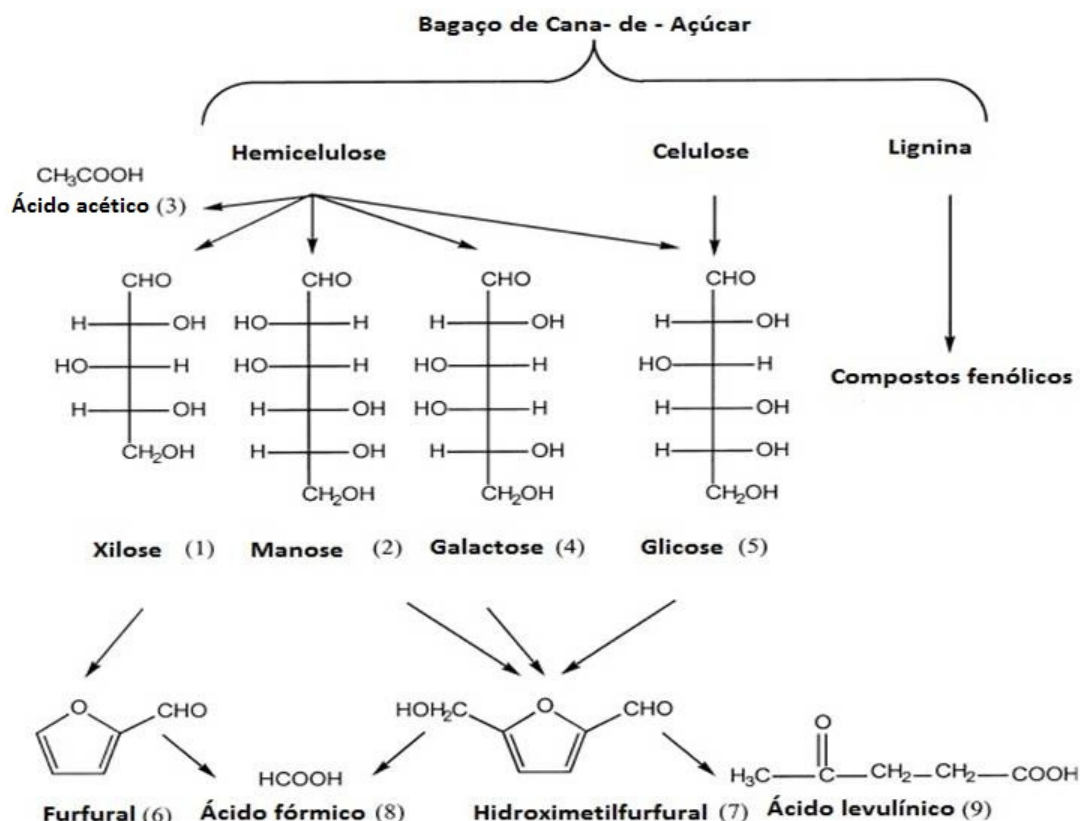


Figura 3.7: Compostos formados durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos. Modificado de Palmqvist et al.(2000b)

O Ácido acético é o principal ácido alifático presente no hidrolisado hemicelulósico, liberado a partir da estrutura da hemicelulose quando os materiais lignocelulósicos são submetidos a algum processo de hidrólise. O ácido fórmico é formado quando tanto o furfural quanto o hidroximetilfurfural são degradados. Compostos fenólicos incluem ácidos, álcoois, aldeídos e cetonas. Ácido ferúlico e siringaldeído são alguns dos diversos compostos aromáticos liberados durante o processo de hidrólise, devido à degradação parcial da lignina.

A natureza e concentração destes compostos inibitórios dependem do tipo de matéria-prima (conteúdo percentual de celulose, hemicelulose e lignina), do pré-tratamento utilizado, das condições do processo (temperatura e tempo de reação) e do emprego ou não de catalisadores ácidos (TAHERZADEH, 1999). Tais compostos foram identificados e quantificados em diferentes tipos de hidrolisados (Tabela 3.2),

Tabela 3.2: Inibidores presentes em diversas fontes de matérias-primas após o tratamento para liberação da celulose presente no material lignocelulósico.

Material lignocelulósico	Tratamento	Inibidores (g L ⁻¹)	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrólise ácida	Furanos: 1,89 Fenólicos: 2,75 Ácido acético: 5,45	Chandel et al., 2007
Palha de arroz	Hidrólise ácida	Furfural: 0,15 ± 0,02 Ácido acético: 2,70 ± 0,33	Nigam, 2001
Palha de milho	Hidrólise ácida	Ácido acético: 1,48 Furanos: 0,56 Fenólicos: 0,08	Cao et al., 2009
Abeto	Termoquímico com ácido sulfúrico diluído	Fenólicos: 0,44 ± 0,05 Furfural: 1,0 HMF: 3,3 ± 0,2 Ácido acético: 5,0 ± 0,4 Ácido levulínico: 0,2 ± 1 Ácido fórmico: 0,7 ± 0,1	Alriksson et al., 2011
<i>Eucalyptus globulus</i>	Hidrólise ácida	Furfural: 0,26 5-HMF: 0,07 Ácido acético: 3,41 Fenólicos: 2,23	Villarreal et al., 2006
<i>Saccharum spontaneum</i>	Ácido sulfúrico diluído, hidróxido de sódio diluído e amônia aquosa	Furfural: 1,54 ± 0,04 Fenólicos: 2,01 ± 0,08	Chandel et al., 2011

3.5. Efeito dos Inibidores sobre os Micro-organismos

Diversos trabalhos foram publicados objetivando estudar os efeitos dos inibidores em micro-organismos e as consequências no desempenho da fermentação. Muitos desses trabalhos utilizaram tanto micro-organismos selvagens, conhecidos pela eficiente capacidade fermentativa, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*, bem como micro-organismos engenheirados, que também podem assimilar xilose, incluindo aqui linhagens modificadas de organismos já estabelecidos, como os anteriormente citados, e *Escherichia coli* (JEFFRIES et al., 1999; ZALDIVAR et al., 2001; DIEN et al., 2003 ; MARTÍN et al., 2007).

O ácido acético é um ácido fraco gerado a partir da desacetilação da hemicelulose durante o pré-tratamento (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000; KLINKE et al, 2004;. ALMEIDA et al, 2007). É sabido que o mesmo pode inibir o

crescimento microbiano e por isso tem sido utilizado como um agente antimicrobiano para as indústrias alimentares e de bebidas. O ácido acético está presente em concentrações variadas, em todos os tipos de biomassa, por exemplo, na palha de milho e no álamo pode conter de 5,6% a 3,6% de acetila ($-COCH_3$), em massa, respectivamente (LU et al., 2009).

Taherzadeh e colaboradores, em 1997, observaram que o crescimento de *S.cerevisiae* em anaerobiose, utilizando 50 g L^{-1} de glicose, foi determinado como uma função do pH e da concentração de ácido acético adicionada ao meio, indicando que a quantidade de ácido acético, na forma não dissociada, não deve exceder de 5 g L^{-1} no meio para o crescimento ocorrer. No entanto, na concentração de $3,3\text{ g L}^{-1}$ de ácido acético, na forma não dissociada, houve uma produção de etanol 20% mais elevada em relação ao meio sem adição de ácido acético. Também houve uma redução no rendimento em biomassa 45% e em glicerol 33%.

Entre os aldeídos, a literatura cita que o furfural comprometeu a velocidade de produção de etanol e o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, enquanto o hidroximetilfurfural e a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) afetou apenas a velocidade de produção de etanol (KLINKE et al., 2004).

O crescimento da levedura *S. cerevisiae* foi retardado em concentrações de 10,30 e 60 mM de HMF e/ou furfural sobre condições controladas (LIU et al., 2004; LIU et al., 2011). Os produtos da conversão do furfural o (FM) e do HMF o (FDM) contém os anéis de furanos com a composição de $C_5H_6O_2$ e $C_6H_8O_3$, respectivamente, e, quando detectado por análise em HPLC, durante o processo de conversão dos inibidores, esses elementos furanos permaneceram intactos e persistiram no meio até o final da fermentação. A presença de FM e FDM não afetou o crescimento da levedura e o rendimento em etanol. Aparentemente, o grupo funcional aldeído no furfural e no HMF é tóxico para a levedura, entretanto o anel furano não é tóxico ou a associação deste com grupo funcional álcool. Aparentemente, uma redução do grupo funcional aldeído é um mecanismo envolvido na destoxificação in situ do furfural e do HMF (LIU, 2011).

Um derivado fenólico muito abundante nos hidrolisados é o ácido 4-hidroxibenzóico, originado na ruptura das ligações éster que unem os grupos hidroxilas dos álcoois cinâmicos da lignina (TAHERZADEH, 1999). Os furanos e fenóis inibiram o crescimento celular e a velocidade de produção de etanol, mas não

influenciaram no rendimento de etanol em *S. cerevisiae* e *Z.mobilis* (DELGENES et al.,1996; PALMQVIST et al., 1999).

Monômeros fenólicos foram quantificados em hidrolisado lignocelulósico de álamo e a maioria dos compostos inibiu a fermentação, no entanto, o grau de inibição dependeu fortemente dos grupos funcionais ligados ao anel benzeno. O autor, através dos resultados obtidos dos parâmetros da fermentação, estimou um valor inibitório para cada grupo funcional sendo os grupos funcionais CH=CH e CHO os que possuíam o grau de inibição mais elevado (ANDO et al., 1986).

Inibidores podem, também, aumentar o estresse ambiental devido ao decréscimo da atividade de água. Inibição por alto conteúdo de sais, metais pesado ou álcalis presentes em muitos substratos como, por exemplo, hidrolisados lignocelulósicos e melaço, podem inibir o processo de fermentação. Esta alta concentração de sais resulta em alto stress osmótico na cultura e para diminuir essa condição a levedura ou outro micro-organismo tenta reduzir esse efeito produzindo glicerol (STOUTENBURG et al.,2011).

3.6. Mecanismo de Ação dos Inibidores

Os inibidores geralmente atuam de diversos modos (Figura 3.8). Entre os seus efeitos, pode-se incluir o comprometimento da membrana celular, inibição de enzimas essenciais, interação negativa com o DNA ou RNA, entre outros (MILLS et al., 2009).

Os ácidos orgânicos fracos tem demonstrado a capacidade de reduzir o “pool” intracelular de alguns aminoácidos como glutamato, aspartato, lisina, arginina, glutamina e metionina (MILLS et al., 2009).

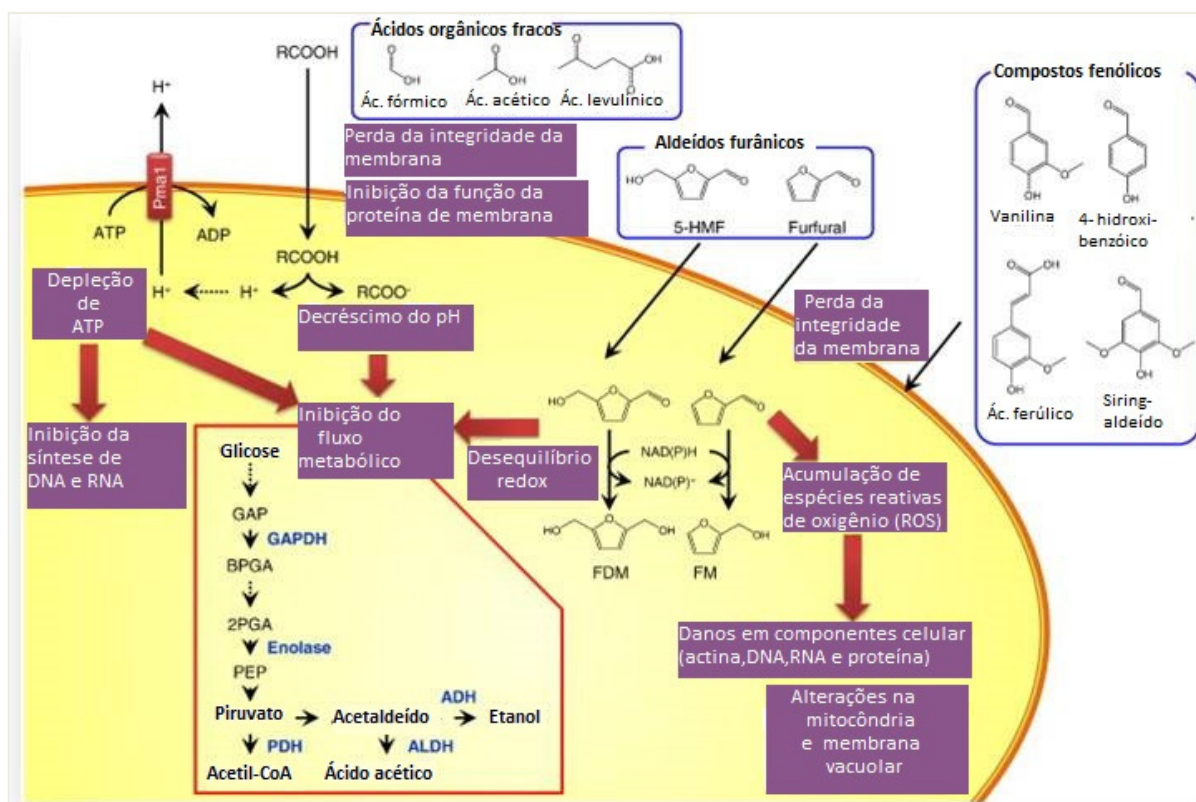


Figura 3.8: Modos de atuação dos inibidores nos micro-organismos durante a fermentação. Modificado de Hasunuma & Kondo (2012).

O mecanismo sugerido para esclarecer o efeito inibitório dos ácidos alifáticos encontrado no hidrolisado é a chamada teoria do desacoplamento. Conforme essa teoria o efeito tóxico depende do pKa dos ácidos e do pH do meio. Como apenas a forma não dissociada penetra na célula por difusão, quando internamente é dissociada devido ao maior pH intracelular, provoca uma diminuição do pH interno. Essa diminuição deve ser compensada por uma ATPase de membrana que bombeia prótons para fora da célula gastando ATP. Esse consumo do ATP reduz a disponibilidade do mesmo para a formação de biomassa celular, restringindo o crescimento do micro-organismo. O outro mecanismo proposto seria a acumulação intracelular de ânions. De acordo com essa teoria, enquanto os prótons são excretados os ânions são capturados pela célula ocorrendo um acúmulo dos mesmos internamente, sendo a inibição causada pela toxicidade do ânion. (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000b; KLINKE et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007).

Os furanos e fenóis causam diversos efeitos na estrutura celular dos micro-organismos durante a fermentação, devido a essas mudanças, precaução deve ser tomada quando o crescimento do mesmo é monitorado por densidade óptica, pois os inibidores podem induzir mudanças na morfologia das células (KLINKE et al., 2004).

Pesquisas atuais indicam que a destoxificação de inibidores do grupo de aldeídos (Figura 3.9) está atribuída a múltiplas enzimas envolvidas em atividades de redução acopladas com os cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e /ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (LIU, 2011; LIU et al., 2009)

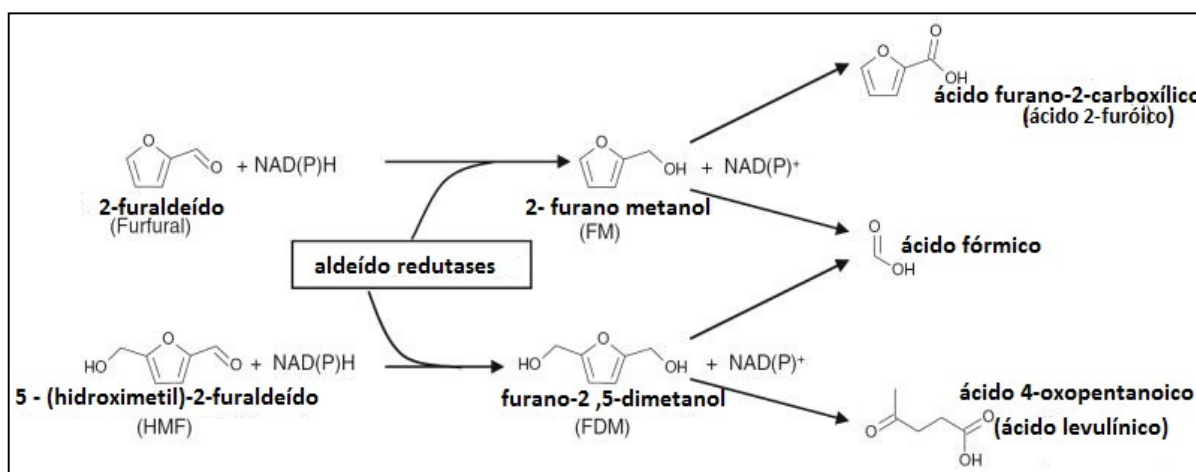


Figura 3.9: Vias de conversão de 2-furaldeído (furfural) e 5-(hidroximetil)-2-furaldeído. Modificado de Liu et al. (2009).

Furfural tem sido caracterizado comoceptor de elétrons e a escassez de NADH foi observada na presença de furfural. Parece que a redução de furfural compete por NADH e interfere com a glicólise durante a regeneração do NAD⁺. Como resultado, furfural pode causar acumulação de acetaldeído, resultando em um atraso da produção de acetato e etanol. Redução da tolerância ao furfural foi observada por deleção seletiva de genes mutantes na rota metabólica da pentose fosfato. Estas observações sugerem evidência indireta do potencial de reações NADPH-dependentes envolvidas na via metabólica da pentose-fosfato (GORSICH et al., 2006; LIU, 2011).

É proposta na literatura a ocorrência de biotransformações dos compostos inibidores, mais precisamente o HMF e o furfural para substâncias menos tóxicas ou

inertes ao micro-organismo, durante a permanência do mesmo em hidrolisados lignocelulósicos (PETERSSON et al., 2006; LAADAN et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008; LIU, 2011). Recentemente, um produto da conversão metabólica do HMF foi isolado e identificado como furano-2,5 dimetanol (FDM), também denominado 2,5-bis-hidroximetilfurano, assim como para o furfural o composto encontrado relacionado ao mesmo foi o furano-metanol (FM), também conhecido por álcool fufurílico (LIU et al 2004; LIU et al 2011).

Diante dos problemas anteriormente citados, diversos trabalhos foram realizados objetivando a obtenção de micro-organismos tolerantes aos inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico (LARSSON et al., 2001; MARTÍN et al., 2007; TIAN et al., 2011).

3.7. Micro-organismos para a Produção de Etanol

A cana-de-açúcar coletada no canavial carrega naturalmente vários gêneros de leveduras, como exemplo, *Saccharomyces*, *Torulae* e *Pichia*. As leveduras habitantes naturais do caldo são potencialmente candidatas a dominarem as dornas de produção de etanol (ANDRIETTA et al., 2006).

A incidência de leveduras não *Saccharomyces* nos processo de produção de aguardente é comum, uma vez que nem sempre os teores alcoólicos nesse tipo de fermentação é tão alto ao ponto de selecionar apenas linhagens do gênero *Saccharomyces*; já no caso da fermentação para obtenção do etanol combustível, a permanência de uma linhagem não *Saccharomyces* em condições normais do processo, é difícil, uma vez que os teores alcoólicos nas dornas desse processo não permitem a sobrevivência de linhagens não *Saccharomyces* que não toleram altos níveis de etanol (ANDRIETTA et al., 2006; DING et al., 2009; BAI et al., 2008).

As leveduras industriais resultam do isolamento de variantes obtidas durante a operação de destilarias e não apresentam marcas genéticas de auxotrofia. As mutações resultantes de estresse são as principais responsáveis pela heterogeneidade de uma população de levedura industrial. Durante a fermentação alcoólica, as células de leveduras são submetidas a diversas condições de estresse e, desta maneira, precisam desenvolver mecanismos moleculares de resistência a

estas situações adversas (ANDRIETTA et al., 2006; DING et al., 2009; BAI et al., 2008).

A década de 70 foi caracterizada por apresentar diversos esforços no sentido de melhorar e buscar novas fontes para a produção de etanol. Dentro desta totalidade, a bactéria *Zymomonas mobilis* mostrou-se um micro-organismo promissor para a conversão da glicose em etanol. No entanto, a presença de subprodutos formados a partir da fermentação da sacarose, tais como levana e sorbitol, causavam baixo rendimento em etanol, como consequência disso o uso dessa bactéria em destilarias não prosperou como esperado (ERNANDES, 2006).

Micro-organismos para a fermentação de etanol podem ser melhores caracterizados em termos de desempenho em relação aos seus parâmetros e/ou outros requisitos tais como a compatibilidade com produtos, processos e equipamento. Os principais parâmetros de desempenho de fermentação são: a faixa de temperatura, faixa de pH, a tolerância ao álcool, taxa de crescimento, a produtividade, tolerância osmótica, a especificidade, rendimento, a estabilidade genética, e a tolerância a inibidores (DIEN et al., 2003). Características consideradas necessárias para um micro-organismo industrialmente adequado estão resumidas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Características importantes em micro-organismos para a produção de etanol. Modificado de Dien et al. (2003).

Característica	Exigência
Rendimento em etanol	>90% do teórico
Produtividade de etanol	>1 g L ⁻¹ h ⁻¹
Robustez e requerimento de fatores de crescimento simples	Meio com formulação barata
Hábil para crescer em hidrolisado não diluído	Resistência a inibidores
Meio de crescimento em condições que retardam o surgimento de contaminantes	pH ácido ou altas temperaturas

3.7.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae* inicia-se quando uma hexose é transportada para o interior da célula e é degradada através da via glicolítica (Figura 3.9) em duas moléculas de piruvato. Durante a glicólise, há produção de 2 molécula de ATP e de duas moléculas de NADH, por molécula de hexose. As enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase convertem o piruvato em etanol e em dióxido de carbono e reoxidam 2 moléculas de NADH que são produzidas (BAI et al., 2008; SNOEK, 2007; MADIGAN et al., 2010).

Do ponto de vista energético, a fermentação alcoólica fornece à levedura 2 moléculas de ATP por molécula de glicose degradada, ou, 14,6 Kcal (biologicamente utilizável) por mol de glicose fermentada. Do ponto de vista termodinâmico, a alteração de energia livre durante a degradação de um mol de glicose e a consequente formação de etanol e CO₂ é de -40 Kcal. A diferença (25,4 Kcal) é dissipada sob a forma de calor, traduzindo-se frequentemente no aumento de temperatura ao longo do processo fermentativo (BAI et al., 2008; SNOEK, 2007; MADIGAN et al., 2010).

A capacidade de *S. cerevisiae* fermentar açúcares é absolutamente vital para o seu crescimento em condições anaeróbias. Essa levedura pertence ao grupo de leveduras Crabtree positivas (resposta fermentativa sob condições de aerobiose e de adição de excesso de açúcar), que produzem etanol para remover o excesso de NADH produzido pelo aumento do fluxo de hexoses para o interior da célula. O fator que contribui para que a fermentação se realize em condições de anaerobiose é o efeito Pasteur, que é definido como a inibição do consumo de açúcares em aerobiose. A fermentação não consegue competir eficientemente com a respiração, em termos de rendimento em ATP, conduzindo a uma diminuição da taxa de fermentação sob condições aeróbias (BAI et al., 2008; SNOEK, 2007; MADIGAN et al., 2010).

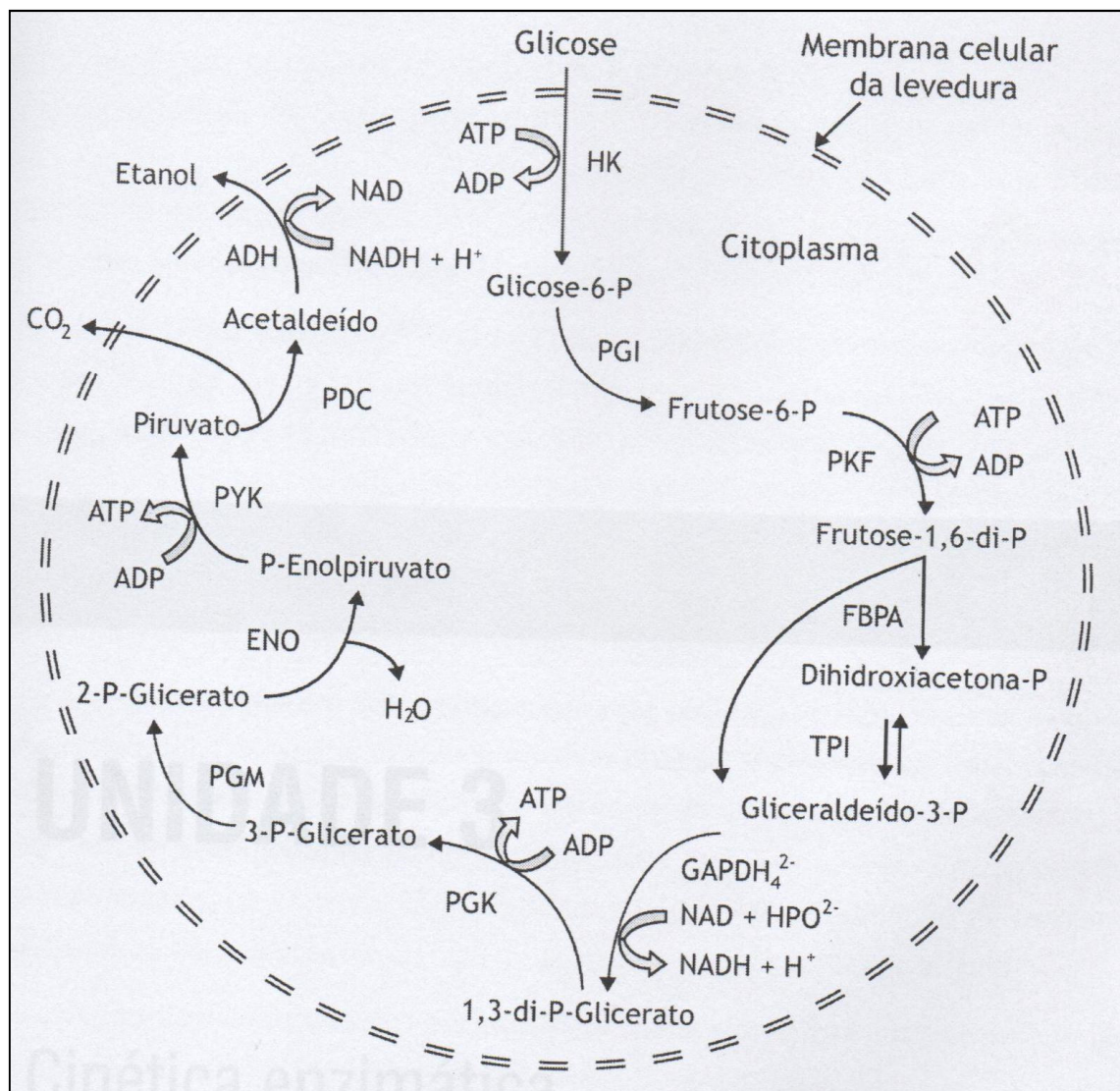


Figura 3.10: Via metabólica da fermentação do etanol em *S. cerevisiae*. Modificado de BAI et al.(2008).

3.7.2. *Zymomonas mobilis*

As bactérias da espécie *Zymomonas mobilis* são bastonetes Gram-negativos, que medem de 2 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,5 µm de largura, apresentando extremidades arredondadas ou ocasionalmente elipsoidais. Estas bactérias são frequentemente móveis, possuindo de 1 a 4 flagelos polares e não formam cápsulas e nem desenvolvem esporos. Podem ocorrer isoladamente ou, mais comumente, aos pares e se reproduzem, na maioria dos casos, por divisão binária simples, cujas colônias apresentam coloração branca ou creme quando crescidas em temperaturas em torno de 30°C. *Zymomonas mobilis* é anaeróbia facultativa, não patogênica, englobando apenas uma espécie, dividida em duas subespécies: *Zymomonas mobilis* subespécie *mobilis* e *Zymomonas mobilis* subespécie *pomacii* (FALCÃO DE MORAIS, 1983; GONÇALVES DE LIMA, 1968; SWINGS & DE LEY, 1977).

As linhagens de *Zymomonas mobilis* são capazes de crescer na faixa de pH variando entre 3,5 e 7,5, e embora muitas cresçam a pH 3,5 e 4,0, tal como sucede com as bactérias acéticas, que exibem habilidade para crescer em valores de pH entre 4,0 e 4,5, estudos realizados com diferentes linhagens de *Z. mobilis*, provenientes de diversas partes do mundo, demonstraram que a faixa ótima de pH para o seu crescimento está entre 5 e 7. A temperatura ótima para o crescimento de *Z. mobilis* encontra-se na faixa compreendida entre 25°C e 30°C, apesar de alguns autores também terem encontrado cepas crescendo bem entre 35°C e 38°C ou com crescimento limitado em temperaturas em torno de 40°C (SWINGS & DE LEY, 1977; SCHMIDT et al., 1986; ERZINGER & VITOLO, 2006; GUNASEKARAN et al., 1986; GONÇALVES DE LIMA et al., 1970; SPRENGER, 1996). Seu tempo médio de crescimento em meio líquido é de aproximadamente 12 a 24 horas, após o qual se observa grande densidade celular e a turvação do meio líquido com abundante formação de gás. Já em meio sólido, as primeiras colônias aparecem, em média, após 48 horas (SWINGS, DE LEY, 1977).

Z. mobilis possui vias metabólicas comparativamente simples, com poucas ramificações laterais, e a ausência de uma infinidade de vias metabólicas alternativas que comumente são encontradas em outros micro-organismos (VILKARI & GISLER, 1986). *Z. mobilis* é alternativamente apontada como candidata promissora para a produção de etanol em larga escala, uma vez que apresenta algumas vantagens em relação à fermentação de *S. cerevisiae* tais como taxas

superiores de absorção de glicose e de produção de etanol, além de um maior rendimento em etanol e maior tolerância ao etanol (LEE et al, 1979; ROGERS et al, 1979; BEAVEN et al., 1989; SPRINGER, 1996). Estas vantagens devem-se, sobretudo, à utilização de uma versão anaeróbia da via Entner-Doudoroff (Figura 3.11) comumente utilizada por micro-organismos estritamente aeróbios, que permite a esta bactéria fermentar glicose a etanol cerca de três a quatro vezes mais rapidamente que a *S. cerevisiae* com produtividade de até 97% do valor teórico máximo (SPRINGER, 1996; BEAVEN et al., 1989; SWINGS & DE LEY, 1977).

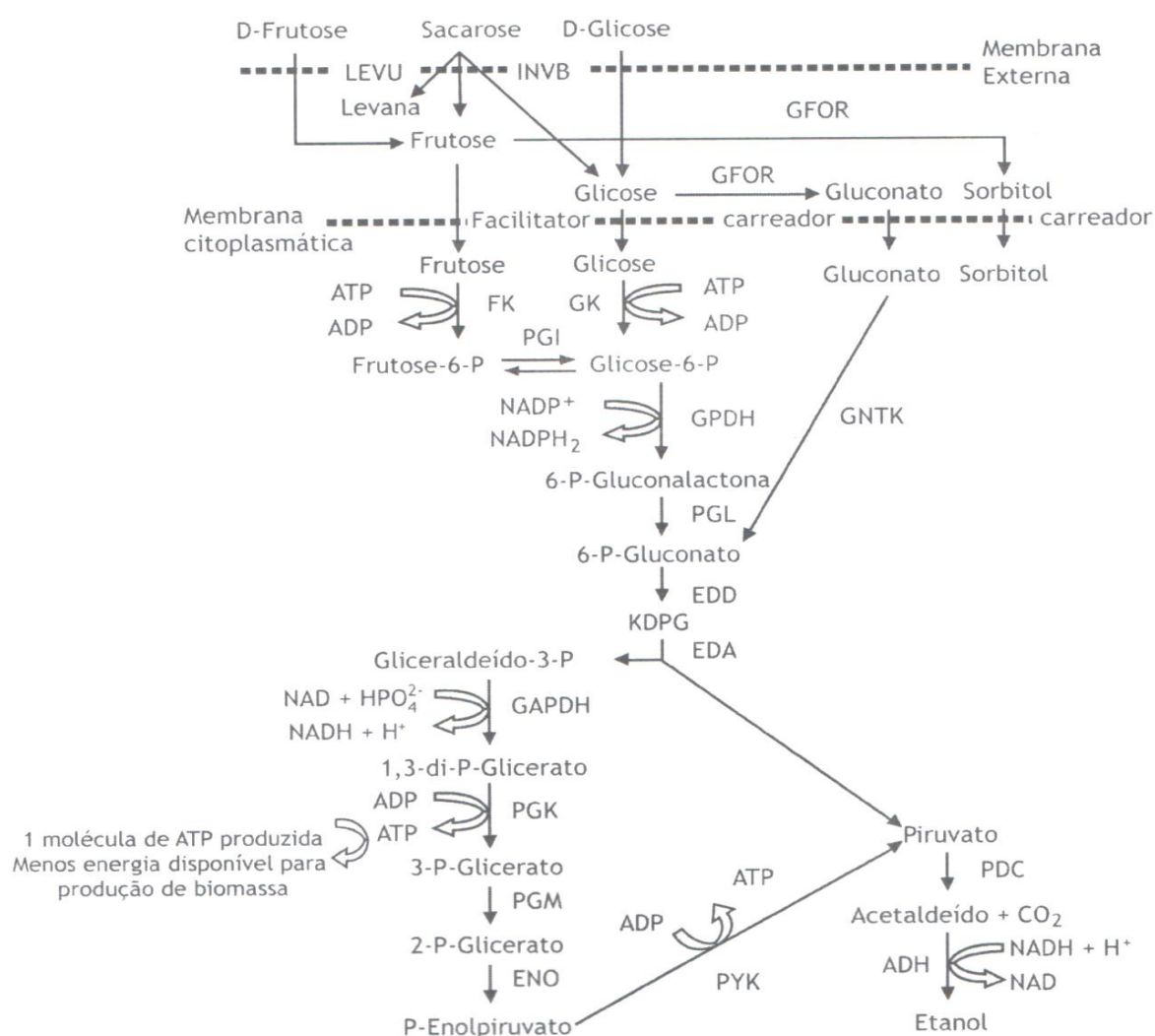


Figura 3.11: Vias metabólicas de carboidratos em *Z. mobilis*. Modificado de Sprenger (1996).

A via de Entner-Doudoroff é utilizada por *Z. mobilis* exclusivamente para o catabolismo da glicose, frutose ou sacarose, que são as únicas fontes de carbono e

de energia que suportam o crescimento desta bactéria (TOMA et al., 2003). No entanto, esta mesma via produz apenas um mol de ATP por mol de glicose ou frutose, o que faz com que *Z. mobilis* tenha que catabolizar o substrato a altas taxas específicas de modo a obter energia suficiente para o seu crescimento, resultando em baixos rendimentos em biomassa, uma vez que a maior parte do carbono presente no substrato é incluída no produto catabólico final: o etanol (SWINGS & DE LEY, 1977; TOMA et al., 2003). Sendo assim, *Z. mobilis* possui mecanismos adaptativos para suportar seu crescimento em concentrações de etanol na faixa entre 7% e 10%, através de mudanças na composição de sua membrana lipídica, impedindo sua dissolução e, em último caso, o extravasamento de material intracelular (SWINGS & DE LEY, 1977; MICHEL & STARKA, 1986; SCHMIDT et al., 1986).

Mas, se por um lado a utilização de *Z. mobilis* oferece vantagens em relação à fermentação de *S. cerevisiae*, por outro lado, a fermentação, por esta bactéria, de substratos ricos em sacarose acaba gerando subprodutos tais como a levana e o sorbitol, diminuindo, deste modo, o rendimento em etanol (TOMA et al., 2003; SPRINGER, 1996; ERNANDES & GARCIA-CRUZ, 2009). Mesmo assim, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas de modo a aproveitar ao máximo o potencial fermentativo de *Z. mobilis*, seja pelo desenvolvimento de linhagens mais tolerantes ao etanol, seja pela obtenção de linhagens capazes de fermentar carboidratos lignocelulósicos que suportem a toxicidade natural dos hidrolisados de lignocelulose ou pela obtenção de linhagens com tolerância a inibidores tais como furfural, hidroximetilfurfural, acetato, dentre outros (JOACHIMSTHAL et al., 1998; (ROGERS et al., 1997; RUANGLEK et al., 2006; MOHAGHEGHI & SCHELL, 2009; ROGERS et al., 2007; ADEN & FOUST, 2009; GUTIERREZ-PADILLA & KARIM, 2005; YANG et al., 2010). Tem-se também notícias de linhagens recombinantes, desenvolvidas para degradação pentoses como xilose ou arabinose, expandindo ainda mais o leque substratos para a fermentação desta bactéria (ZHANG et al., 1995; DEANDA et al., 1996; MOHAGHEGHI et al., 2002; SEO et al., 2005; YANG et al., 2009).

3.8. Desenvolvimento de Linhagens Robustas para Produção de Etanol de Segunda Geração

Manipulações genéticas de leveduras e bactérias têm sido realizadas ao longo do tempo com o objetivo de alterar as características genéticas da linhagem para obtenção de linhagens com propriedades desejáveis (SAUER, 2001; YANG et al., 2007).

Entre as formas de manipulações genéticas, pode-se citar a engenharia metabólica, definida como a melhoria das atividades celulares através da manipulação enzimática e regulação das funções da célula com o uso da tecnologia de DNA recombinante, e a engenharia evolutiva, designada como o cultivo constante de um organismo sob condições de estresse e seleção de linhagens evoluídas (SAUER, 2001; YANG et al., 2007).

Devido a enorme complexidade de interações dinâmicas em sistemas celulares, há muitas vezes um impedimento prático na aplicação de engenharia metabólica. Em contraste, a engenharia evolutiva segue a ‘engenharia’ da natureza pelo princípio de variação e seleção (SAUER, 2001). Engenharia evolutiva baseia-se em protocolos de seleção cuidadosamente projetados em relação ao meio e às condições de cultivo, podendo ser realizado através de plaqueamento, transferência em frascos ou experimentos em quimiostato, para o desenvolvimento de cepas com características industriais de interesse (Figura 3.12) (HAHN-HÄGERDAL et al., 2005).

Evolução é a descendência, com modificações, de diferentes linhagens ao longo das gerações, a partir de ancestrais comuns. A variação nas características dos organismos de uma população passa a existir por meio de mutação aleatória nas sequências de DNA (genes) que afetam tais características. Adaptação é um termo usado para designar características que evoluíram em decorrência da seleção natural. Essa adaptação pode ser entendida como uma melhoria da capacidade média dos membros da população de sobreviver e reproduzir no seu meio ambiente (FUTUYMA, 2002).

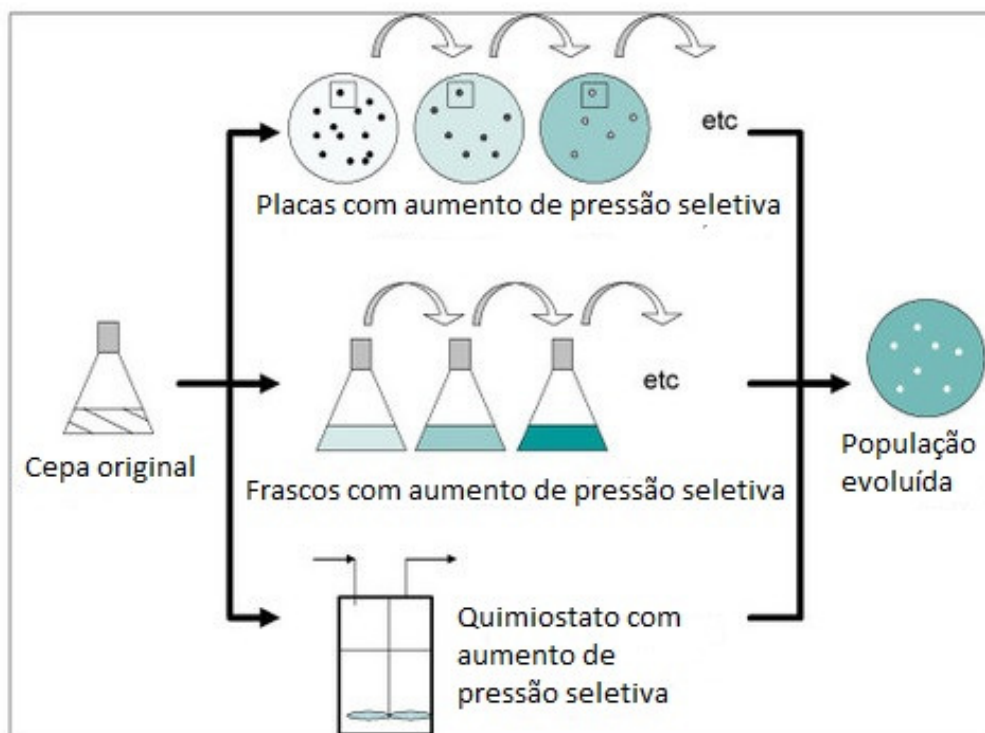


Figura 3.12: Princípio da Engenharia evolutiva. Modificado de Hahn-Hägerdal et al. (2005).

Estratégias fundamentadas na engenharia evolutiva são atraentes porque podem gerar linhagens melhoradas que, em curto prazo, podem ser usadas na indústria. Experimentos baseados em evolução têm evidências de serem valiosos tanto com ou sem a dependência da engenharia metabólica para a geração de novas linhagens com fenótipos específicos, tais como resistência a diversos estresses ou utilização eficiente de diversos substratos (BECKER & BOLES, 2003; ÇAKAR et al., 2005, 2009; KUYPER et al., 2004; HAHN-HÄGERDAL et al., 2005; SONDEREGGER et al., 2003, 2004).

Micro-organismos que têm sido utilizados em experiências de evolução incluem muitas bactérias e vírus, bem como algas unicelulares e fungos. Estes organismos são bem adequados para tais experiências por muitas razões práticas: são fáceis de propagar e quantificar; se reproduzem rapidamente, o que permite fazer experimentos por muitas gerações; permitem obter grandes populações em um curto espaço de tempo, o que facilita a replicação experimental; pode ser armazenado e mais tarde reativado, o que permite comparação direta dos ancestrais

com a linhagem evoluída; muitos micro-organismos reproduzem-se assexuadamente e os clones resultantes aumentam a precisão da replicação experimental; é fácil de manipular as variáveis ambientais, bem como a composição genética das populações fundadoras e existem abundantes dados moleculares e da genômica de muitas espécies, bem como técnicas precisas para suas análises e manipulação genética (ELENA & LENSKI, 2003).

A maioria das experiências em evolução microbiana é conceitualmente simples. Populações são estabelecidas (muitas vezes a partir de clones individuais), em seguida, propagadas em um ambiente controlado e reprodutível por muitas gerações (ELENA & LENSKI, 2003).

Uma amostra da população ancestral pode ser armazenada indefinidamente, a partir de vários pontos de tempo durante a experiência. Depois que uma população foi propagada durante algum tempo, os genótipos ancestrais e a população derivada podem ser comparados com respeito a qualquer melhoria de características genéticas ou fenotípica. Importante saber que a adaptação pode ser quantificada medindo-se mudanças na aptidão do organismo no ambiente experimental, em que, nesse caso, aptidão reflete a capacidade para deixar descendentes (ELENA & LENSKI, 2003).

As leveduras etanologênicas tolerantes tem demonstrado o potencial de detoxificar *in situ* numerosos inibidores derivados do pré-tratamento da biomassa de lignocelulósicos (LIU, 2011). A utilização de linhagens adaptadas ou que foram geneticamente modificadas para resistir às altas concentrações de inibidores pode diminuir os problemas com a fermentação na presença de inibidores (LARSSON et al., 2001).

A técnica de engenharia evolutiva foi aplicada a um recombinante de *S. cerevisiae*, a linhagem TMB3001, que fermenta xilose a etanol, para se obter uma tolerância múltipla aos inibidores - compostos fenólicos, ácidos alifáticos e furaldeídos. O rendimento em etanol na cepa adaptada foi melhorado em 2 vezes ($0,38 \text{ g g}^{-1}$ em comparação com $0,18 \text{ g g}^{-1}$ na linhagem parental) (MARTÍN et al., 2007). A fermentação de madeira de pinheiro (*Pinus taeda*), contendo compostos inibitórios gerados durante o pré-tratamento e níveis de sólidos mais elevados do que os previamente relatados na literatura, foi possível usando uma linhagem evoluída de *S. cerevisiae* XR122N. Usando a cepa evoluída, a fermentação do

hidrolisado foi possível, mesmo com a redução do tamanho do inóculo e do tempo de processo desse modo pode ser possível superar o desafio do uso de um processo de conversão de biomassa lenhosa em etanol (HAWKINS et al., 2011).

É interessante se observar que a resposta ao estresse varia de acordo com a herança genética da levedura e do estado fisiológico resultante das diferentes condições da cultura, e a tendência mundial de realizar expressão gênica e análise proteômica em fermentação de pequena escala nos últimos anos fornece imagens mais confiáveis para a resposta ao estresse de várias cepas de leveduras. Mais dados moleculares serão disponíveis para a engenharia genética buscando melhorar ainda mais a tolerância ao estresse; como também a resposta para o diagnóstico de stress específico (por exemplo, toxicidade do etanol e compostos inibidores em hidrolisados lignocelulósicos) e, além disso, a obtenção de marcadores moleculares para seleção de linhagens robustas. Estudos de mecanismo de tolerância ao estresse e manipulação de leveduras tolerantes aos estresses são de grande importância para a produção eficiente de etanol combustível (ZHAO & BAI, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Foram utilizadas a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* N° UFPEDA 1238, registrada como IA 1238, e a linhagem *Zymomonas mobilis* N° UFPEDA 205, registrada como ZAP. Os micro-organismos utilizados pertencem à Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2. Meios de Cultura

4.2.1 Meio de manutenção

Para a manutenção dos micro-organismos, foram utilizados meios distintos para cada organismo. A manutenção da levedura foi realizada através de repiques em tubos de ensaios com meio sólido (Tabela 4.1) com pH 7,0, incubada a 30 °C por 24 h e estocada sob refrigeração (4 °C). A manutenção da bactéria foi realizada através de repiques em tubos contendo meio de manutenção líquido (Tabela 4.2) com pH 6,5, incubada a 30°C por 24h e estocada sob refrigeração (4 °C). Ambas as linhagem foram repicadas a cada três meses para novo meio de conservação.

Tabela 4.1: Composição do meio GLP de manutenção de *S. cerevisiae* (pH=7,0).

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	20,0
Extrato de Levedura	5,0
Peptona	3,0
Agar	12

Tabela 4.2: Composição do meio SSDL para manutenção de *Z. mobilis* (pH=6,5).

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	20,0
Extrato de Levedura	5,0

4.2.2 Meio de preparação do pré-inóculo e inóculo

Após o crescimento em seus respectivos meios de manutenção, a massa celular crescida era transferida para tubos de 15 mL contendo meio de inóculo (Tabela 4.3) com pH 6,0, incubados a 35°C por 24 h. Após esse período, o meio fermentado (10%, v/v) era transferido para frascos Erlenmeyer contendo meio de inóculo (Tabela 4.3) com pH 6,0, incubados a 35°C por 18 h em mesa agitadora, a 250 rpm para a levedura e 150 rpm para a bactéria,.

Tabela 4.3: Composição do meio de cultura utilizado para preparação de inóculos para ambas as linhagens (pH=6,0).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	100,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
KH ₂ PO ₄	1,2
Extrato de levedura	6,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,3

4.2.3 Meios de fermentação

Após o crescimento do micro-organismo em meio de inóculo (Tabela 4.3), para todas as fermentações, um volume de 10% era transferido para o recipiente final (tubo, Erlenmeyer ou Biorreator) contendo 90% do meio de fermentação a ser utilizado.

Nos procedimentos que utilizaram o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar como meio de fermentação, o hidrolisado não foi autoclavado, mas filtrado em um sistema de filtração estéril, e o líquido filtrado transferido para garrafas esterilizadas. Na figura 4.1, é apresentado um esquema de obtenção do meio de fermentação com hidrolisado estéril.



Figura 4.1: Sequência utilizada para a obtenção de meio de fermentação com hidrolisado estéril a base de glicose.

O meio de fermentação utilizado para a fermentação com reciclo está descrito na Tabela 4.4. Para esse, além do meio diluído normalmente em água destilada, os componentes também foram diluídos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 4.4: Composição do meio utilizado nas fermentações com reciclo (pH = 5,0).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	200
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
KH ₂ PO ₄	2,46
Extrato de Levedura	18,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	18,0

O meio de fermentação utilizado para a evolução das linhagens está descrito na Tabela 4.5. Os componentes foram diluídos em água destilada e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, com concentrações crescentes de hidrolisado a partir de 25% v/v.

Tabela 4.5: Composição do meio de fermentação utilizado para a evolução das linhagens (pH = 5,0).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)	
Glicose	200*	150**
Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	1,2	0,9
KH ₂ PO ₄	2,46	1,845
Extrato de Levedura	18,0	13,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	18,0	13,5

* *S.cerevisiae*

** *Z. mobilis*

O meio de fermentação utilizado para a caracterização das linhagens em biorreator instrumentado está descrito na Tabela 4.6. Os componentes foram diluídos normalmente em água destilada ou diluídos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 4.6: Composição do meio de fermentação para a caracterização das linhagens em biorreator instrumentado.

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose/Melaço	100,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
KH ₂ PO ₄	1,2
Extrato de Levedura	6,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,3

4.3. Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar

Para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar procedente da Usina Central Olho D'água, situada no município de Camutanga no Estado de Pernambuco. O material foi pré-tratado hidrotermicamente, à temperatura de 195 °C por 10 minutos, em reator descontínuo de 20 L (REGMED AU/E-20), apresentado na Figura 4.1. Para o tratamento, foi utilizado 1 kg de bagaço, em massa seca, e 10 L de água. Após o tratamento, duas frações foram obtidas: uma sólida (celulignina) e uma líquida (hidrolisado hemicelulósico), conforme o diagrama na Figura 4.2. O hidrolisado hemicelulósico foi separado por filtração e guardado em câmara fria a 4 °C até a utilização. Na Tabela 4.7, é apresentada a composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento hidrotérmico.

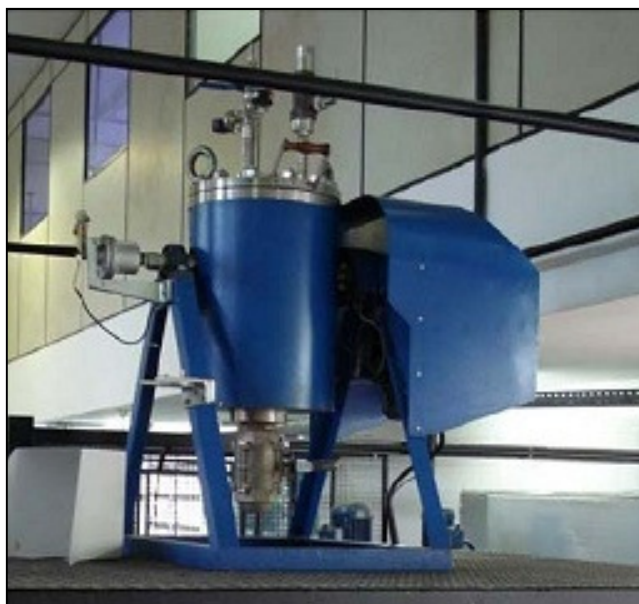


Figura 4.2:Reator de 20 L (REGMED AU/E-20) utilizado para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

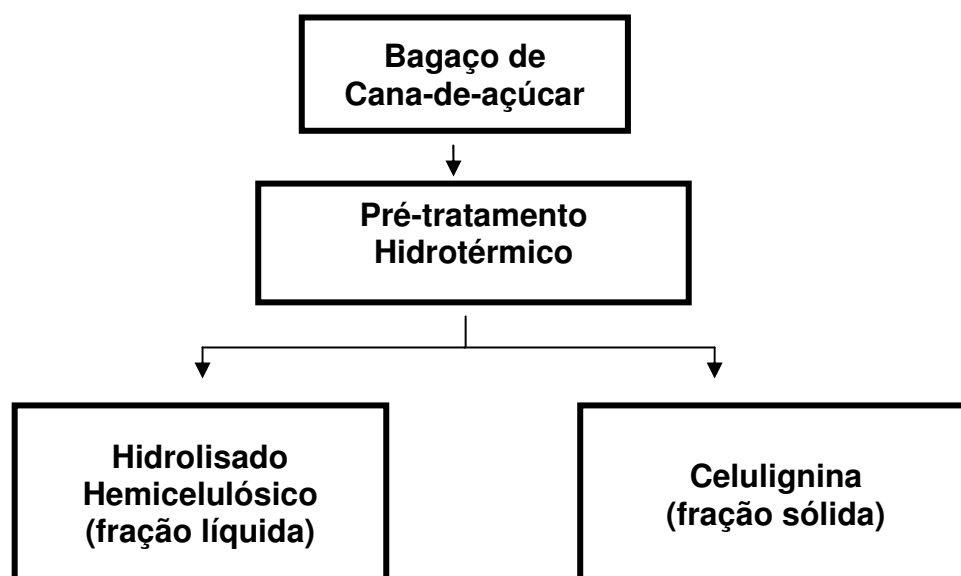


Figura 4.3: Fluxograma de obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 4.7: Composição e concentração de açúcares e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Arabinose	0,19 ± 0,02
Celobiose	0,44 ± 0,01
Glicose	1,20 ± 0,06
Xilose	5,40 ± 0,01
Ácido Fórmico	0,60 ± 0,02
Ácido Acético	3,80 ± 0,06
Furfural	1,70 ± 0,02
HMF	0,62 ± 0,02
Fenóis totais	2,74 ± 0,06

4.4. Procedimento Experimental

4.4.1 Fermentação com reciclo de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em meio de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Com a finalidade de se analisar o comportamento dos parâmetros fermentativos de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em alta concentração celular (30 g L⁻¹), na presença do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, foram realizadas fermentações descontínuas sequenciais com reciclo das células.

Para esse estudo, inicialmente, a linhagem *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 foi repicada em tubo de ensaio com meio de manutenção (Tabela 4.1) e mantida em estufa a 30 °C por 24 horas. Após esse período, toda a massa celular crescida no tubo foi transferida para 3 frascos Fernbach (Figura 4.4) , contendo 300 mL de meio da preparação de inóculo (Tabela 4.3). Os frascos foram colocados em mesa incubadora rotativa, por 16 horas, a 35 °C, com agitação de 400 rpm para manutenção da aeração garantindo um ótimo crescimento.

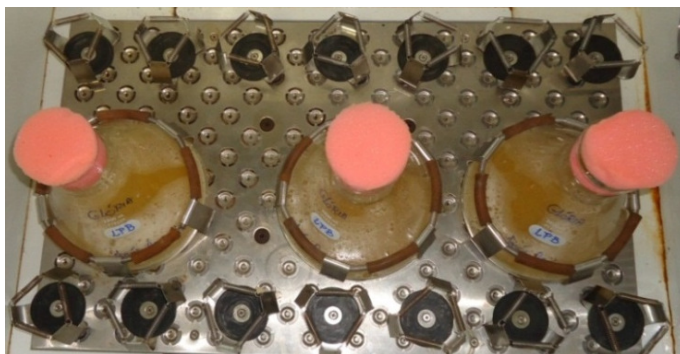


Figura 4.4: Cultivo do inóculo para uso no experimento de reciclo de células em mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, C25KC), em frascos Fernbach com 300 mL de meio de inóculo.

Após o crescimento, o conteúdo dos frascos foi transferido para apenas um frasco Fernbach e misturado, com o objetivo de utilizar micro-organismos com a mesma capacidade fisiológica. O inóculo foi obtido pela centrifugação ($1000 \times g$, 4°C , 5 min) do líquido contido no frasco Fernbach após ser transferido de modo estéril para tubos de 50 mL (Figura 4.5).



Figura 4.5: Inóculo obtido após a centrifugação em $1000 \times g$ por 5 minutos a 4°C .

Para análises de viabilidade celular e concentrações de glicose, etanol e coprodutos, foram retiradas amostras no início e ao final de cada ciclo de fermentação.

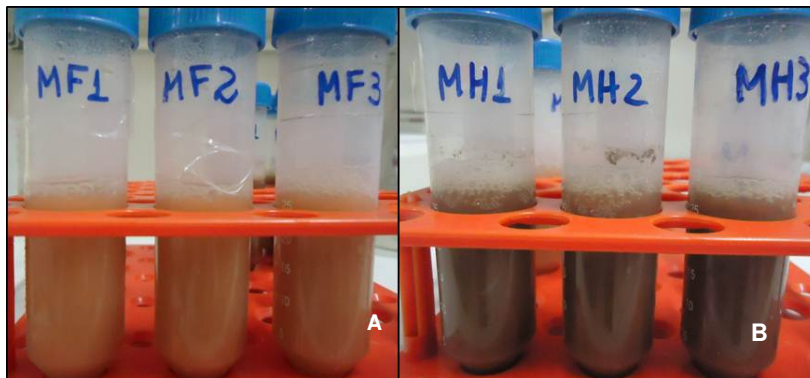


Figura 4.6: Fermentação de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em tubos Falcon contendo meio de fermentação a base de glicose sem hidrolisado (A) e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (B), após 8 horas.

4.4.2 Evolução das linhagens

4.4.2.1 Cultivos

Inicialmente, foi realizada uma raspagem das células da levedura crescida em meio de manutenção (Tabela 4.1) e pipetado 1 mL de suspensão de células da bactéria *Z. mobilis* crescida em meio líquido SSDL (Tabela 4.2) para o meio de inóculo (Tabela 4.3).

Após o crescimento do micro-organismo em meio de inóculo (Tabela 4.3), todo o volume do tubo (pré-inóculo) foi transferido para frascos Erlenmeyer contendo 45 mL de meio de inóculo, mantidos a 35°C por 18 horas em mesa agitadora, a 250 rpm para a linhagem de *S. cerevisiae* e 150 rpm para a linhagem de *Z. mobilis* (Figura 4.7). Depois do inóculo crescido, 10% (v/v) foram transferidos para tubos de ensaio com meio de fermentação a base de glicose (Tabela 4.5) contendo inicialmente 25% v/v de hidrolisado hemicelulósico, esterilizado de acordo com o procedimento descrito no Item 4.2.3, com pH 5,0 e mantidos em estufa a 35°C até apresentar crescimento.

A transferência dos micro-organismos ocorreu através de repiques sucessivos (Figura 4.7) em tubos de ensaio com tampa de rosca até a concentração de 100% v/v de hidrolisado hemicelulósico ou até a presença de crescimento do micro-organismo na atual concentração testada. A avaliação do crescimento, para ambas as linhagens, foi realizada através do CO₂ liberado, um dos compostos resultantes da atividade metabólica, através da pesagem em balança analítica.

A transferência para uma concentração maior de hidrolisado era realizada quando observada durante a 10ª transferência um aumento da turbidez do líquido ou uma diminuição ou permanência do peso do tubo causada pela produção de gás na cultura, confirmada pela variação do peso do tubo para valores acima de 0,6 g devido à liberação de CO₂, indicativo de absorvância com valor superior a 1,0 (Figura 4.8).

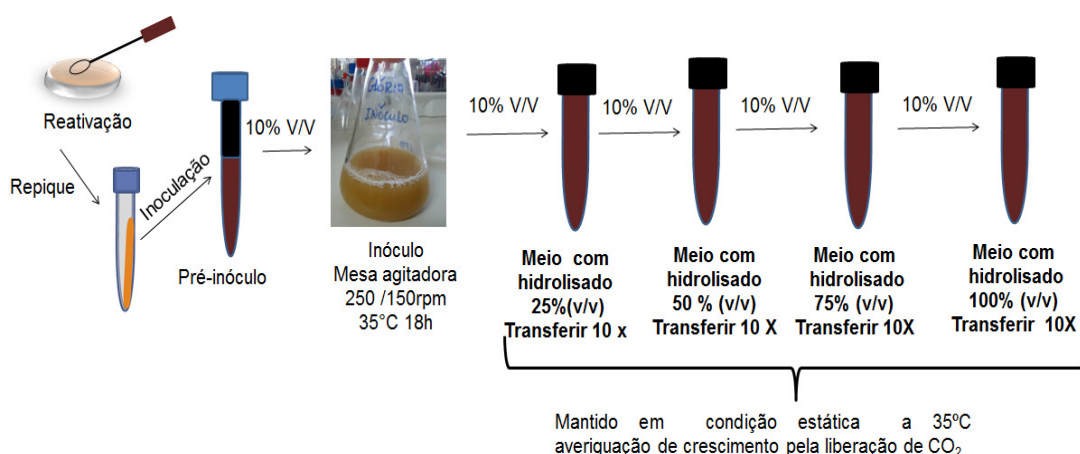


Figura 4.7: Sequência planejada para a realização da evolução de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 e *Z. mobilis* UFPEDA 205 em meio de fermentação a base de glicose e hidrolisado hemicelulósico .

O valor de referência (0,6 g), utilizado para a transferência do micro-organismo, foi obtido em testes prévios em meio sem hidrolisado nas mesmas condições (pH 5, 35 °C e modo estático).



Figura 4.8: Tubo inoculado com *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 apresentando produção de gás e turbidez à esquerda e tubo não inoculado (controle) à direita.

4.4.3 Isolamento e seleção de linhagens evoluídas

Após as transferências em meio de fermentação à base de glicose com hidrolisado hemicelulósico, até a concentração aceitável pelo micro-organismo, a população foi diluída 100 vezes, para a obtenção de colônias isoladas, em solução salina a 8% (v/v) e transferida para placas de Petri contendo meio de manutenção preparado com a mesma concentração de hidrolisado.

Linhagens isoladas da placa foram repicadas, transferidas para meio de inóculo (Tabela 4.3) e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas.

Posteriormente, para seleção da linhagem evoluída, foi transferida uma alíquota de 4 mL (10% v/v) de cada isolado para tubos Falcon contendo 36 mL de meio de fermentação (Tabela 4.6) diluído com hidrolisado. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C, por 24 horas, e amostras foram retiradas no início e no final da fermentação para análises de concentração celular, de glicose, de etanol e de

coprodutos. Os rendimentos e produtividades de etanol foram, então, calculados para comparação entre as linhagens.

4.4.4 Comparação entre a linhagem parental e evoluída

As linhagens evoluída e parental foram inicialmente repicadas para novo meio de manutenção (Tabelas 4.1 e 4.2) em tubos de ensaio e incubadas em estufa a 30°C por 24 horas. Posteriormente, foram transferidas, através da raspagem superficial da massa celular crescida, para tubos Falcon contendo 10 mL de meio de inóculo (Tabela 4.3), os quais foram então mantidos em estufa a 35°C. Após esse período, todo o conteúdo do tubo (pré-inóculo) foi transferido para frasco Erlenmeyer contendo meio de inóculo (Tabela 4.3). O crescimento do inóculo foi realizado em mesa agitadora a 35°C, por 18 horas, a 250 rpm e 150 rpm. O inóculo (10% v/v) foi então transferido ao biorreator contendo o meio de fermentação (Tabela 4.6.). Foi utilizado meio de fermentação à base de glicose, com e sem hidrolisado. A concentração de hidrolisado hemicelulósico utilizada para as fermentações foi fundamentada nos resultados obtidos pela etapa da evolução.

A fermentação dos micro-organismos ocorreu em um biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 110), apresentado na Figura 4.9. As variáveis controladas foram o pH 5,0, temperatura 35°C e agitação 500 rpm. O controle de pH foi realizado por sistema automático, com a adição de solução alcalina (NaOH 3 M) ou ácida (H₂SO₄ 3 M). Nitrogênio foi adicionado ao reator e a anaerobiose foi verificada por meio de eletrodo detector de oxigênio dissolvido.

Foram retiradas amostras durante a fermentação para análises de concentração celular, concentração de glicose e concentrações de etanol e coprodutos. Os rendimentos de substrato em biomassa e produto foram, então, calculados para as linhagens. Para a levedura, foi também determinada a viabilidade celular no início e final da fermentação.



Figura 4.9: Biorreator utilizado para as fermentações e comparação das linhagens (New BrunswickScientific, Bioflo 110).

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Determinação de concentração de biomassa

A determinação da concentração de biomassa foi realizada por peso seco, após filtração da amostra em membrana microporosa de 0,45 μm (para *S. cerevisiae*) e de 0,22 μm (para *Z. mobilis*) e secagem em estufa a 80°C por 24 h. Para as fermentações com melaço e hidrolisado, não foi possível se quantificar com exatidão a biomassa microbiana, visto que a quantidade de sólidos solúveis presente no melaço interferiu no resultado das pesagens. O material filtrado serviu para a quantificação de glicose, sacarose, frutose, ácido acético, glicerol e etanol.

4.5.2. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular das leveduras foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico. Primeiramente, as células foram coradas com solução de azul de metileno preparada com 0,025 g do corante adicionado a 2 g de citrato de sódio em 100 mL de água. A mistura da amostra com a solução de azul de metileno foi de 1:1. Em seguida, foi transferida uma alíquota da mistura para a câmara de Neubauer, procedendo-se a observação das células na objetiva de 40x.

Foi contado o número de células totais (n_t) e de células coradas (n_c) em 5 campos quadrados distintos de 0,2 mm de lado. Como a câmara tem profundidade de 0,1 mm, o volume total (V_t) dos campos contados foi 2×10^{-5} mL. A concentração de células totais foi dada por n_t/V_t . Como apenas as células não-viáveis são coradas pela solução corante, a concentração de células viáveis foi dada por $(n_t - n_c)/V_t$. A porcentagem de células viáveis foi dada por $100(n_t - n_c)/n_t$. Nos casos em que o número de células foi excessivo para ser contado (mais que 300 células por campo), as amostras passaram por diluições adequadas.

4.5.3. Determinação das concentrações de produtos e substrato.

A quantificação de carboidratos (glicose, sacarose, celobiose, arabinose e xilose), produto (etanol), coprodutos (glicerol, ácido acético) e inibidores (HMF, furfural e ácido fórmico) ocorreu através de cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por índice de refração (Agilent, Série 1100 - Figura 4.10). Para esta análise, foi utilizada uma coluna Aminex® HPX87H da Bio-Rad, com ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, a um fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 60°C. A fase móvel foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, filtrada em membrana de 0,22 µm.

A quantificação utilizou o método do padrão externo, através de uma curva de calibração, realizada sempre ao mesmo tempo das análises das amostras para, assim, evitar possíveis erros de análise, pois este método é sensível a erros de preparo das amostras e dos padrões, como também de injeção das soluções padrão e das amostras, sendo necessária a sua realização a cada análise (RIBANI et al.,

2004). As amostras e os padrões foram diluídos em fase móvel, filtrados e injetados automaticamente em um volume de 5 μ L.



Figura 4.10: Sistema para realização de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, Série 1100) pertencente ao Departamento de Antibióticos utilizado para a quantificação da concentração de substrato, produtos e inibidores.

A quantificação de compostos fenólicos totais foi realizada através de determinações espectrofotométricas utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Utilizou-se o procedimento proposto por Swain & Hillis (1959) e modificado por Nascimento et al. (2007). O procedimento foi realizado conforme as etapas a seguir.

- Inicialmente foi preparada uma solução padrão de ácido gálico a partir de 20 mg desse composto dissolvido em 50,0 mL de etanol a 95%, a partir da qual foram preparadas soluções diluídas nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 μ g. Uma alíquota, contendo 0,5 mL de cada solução de ácido gálico, foi transferida para tubos de ensaios adicionando-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2,0 mL de uma solução recém-preparada de carbonato de sódio a 7,5% (p/v). A mistura foi agitada e rapidamente transferida para o banho termostaticado, onde permaneceu por 5 minutos a uma temperatura de 50°C. As soluções foram então esfriadas em temperatura ambiente e fez-se a medida da absorbância a 760 nm em espectrofotômetro (Femto 700 Plus,) contra um branco

contendo todos os reagentes, exceto a solução de ácido gálico, sendo água destilada utilizada em seu lugar.

- Após a obtenção da curva padrão (Figura 4.12), a amostra de hidrolisado hemicelulósico foi diluída com etanol a 95%, e uma alíquota de 0,5 mL da solução obtida foi transferida para um tubo de ensaio. A esta alíquota foram acrescentados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL da solução de carbonato de sódio, totalizando 5,0 mL. Os conteúdos foram bem misturados e procedeu-se a análise, como anteriormente descrito. Segundo o método se a amostra apresentar turvação ou precipitado, a solução deve ser filtrada ou centrifugada para eliminação de interferentes. A amostra utilizada apresentou turvação e foi filtrada em membrana de 0,45 μm antes das leituras serem tomadas.

4.6. Parâmetros Fermentativos

4.6.1. Rendimento de biomassa microbiana ($Y_{X/S}$)

O coeficiente de rendimento ($Y_{X/S}$) relaciona a população microbiana obtida com a concentração do substrato consumido dado em (g g^{-1}).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

4.6.2 Rendimento de produto em substrato ($Y_{P/S}$)

O coeficiente de rendimento ($Y_{P/S}$) expressa a quantidade de etanol formada por unidade de açúcar consumido dado em (g g^{-1})

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

4.6.3 Rendimento de coproduto em substrato ($Y_{CP/S}$)

O coeficiente de rendimento ($Y_{CP/S}$) expressa a quantidade de coprodutos formada por unidade de açúcar consumido dado em (g g^{-1})

$$Y_{CP/S} = \frac{CP_f - CP_i}{S_i - S_f} = \frac{\Delta CP}{\Delta S}$$

Onde:

X = concentração de biomassa (g L^{-1})

S = concentração de substrato (g L^{-1})

P = concentração de produto (g L^{-1})

CP = concentração de co-produto (g L^{-1})

i = inicial

f = final

4.6.4 Eficiência do processo fermentativo

A eficiência das fermentações foi calculada pela relação entre $Y_{P/S}$ e o rendimento máximo teórico, 0,51 g g⁻¹, quando o substrato era a glicose, ou 0,54 g g⁻¹ quando o substrato era a sacarose:

$$\text{Eficiência (glicose)} = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100$$

$$\text{Eficiência (sacarose)} = \frac{Y_{P/S}}{0,54} \times 100$$

4.6.5 Produtividades

As produtividades foram calculadas como:

$$Q_X = \frac{X}{t}$$

$$Q_P = \frac{P}{t}$$

$$Q_{CP} = \frac{CP}{t}$$

Onde:

Q_X = produtividade de massa celular (g L⁻¹ h⁻¹)

Q_P = produtividade de produto (g L⁻¹ h⁻¹)

Q_{CP} = produtividade de coproduto (g L⁻¹ h⁻¹)

X = concentração de massa celular (g L⁻¹)

P = concentração de produto (g L⁻¹)

CP = concentração de coproduto (g L⁻¹)

t = tempo final

4.7 Análise Estatística

Nos experimentos onde houve réplica das amostras experimentais, a análise estatística foi realizada pelo método ANOVA (Análise de variância) do programa STATISTICA 6.0 para Windows da StatSoft. A análise de variância permite que o pesquisador compare qualquer número de médias. A diferença das médias foi comparada pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o mesmo software.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em trabalho anterior, realizado no Laboratório de Processos Biotecnológicos, Sá (2012) selecionou, entre 10 linhagens de *S. cerevisiae* e entre 10 linhagens de *Z. mobilis*, as linhagens *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 e *Z. mobilis* UFPEDA 205, pelas suas características fermentativas em meio de glicose, com e/ou sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Neste trabalho, além da aplicação da engenharia evolutiva para obtenção de linhagens resistentes aos inibidores presentes em hidrolisados, a partir das duas linhagens previamente selecionadas, fermentações com reciclo foram também realizadas com *S. cerevisiae* UFPEDA 1238. O objetivo foi se investigar o comportamento fermentativo da levedura em alta concentração celular, já que Sá (2012) observou que *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, diferentemente de *Z. mobilis* UFPEDA 205, era capaz de utilizar glicose e produzir etanol, quando em presença de meio de fermentação com hidrolisado hemicelulósico, embora com forte inibição do crescimento.

5.1. Fermentação com Reciclo de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238

Na Figura 5.1, encontram-se os resultados obtidos para o consumo de glicose por *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 para cada ciclo de fermentações com reciclo, na ausência e presença de hidrolisado. Observa-se que a glicose foi quase totalmente consumida pelo micro-organismo durante as 8 horas de fermentação em meio sem hidrolisado. No entanto, no mesmo intervalo de tempo, a levedura UFPEDA 1238, quando em presença do hidrolisado, consumiu aproximadamente a metade da glicose que foi consumida na condição sem hidrolisado.

Sá (2012) observou que a linhagem UFPEDA 1238 foi capaz de assimilar a glicose presente no meio com hidrolisado, no entanto a concentração utilizada ficou abaixo de 20 g L^{-1} de glicose enquanto no presente estudo a mesma linhagem assimilou acima de 100 g L^{-1} do mesmo substrato como apresentado na Figura 5.1.

Na Figura 5.2, observa-se que as maiores concentrações de etanol foram obtidas em meio de fermentação contendo apenas a glicose. O maior valor da concentração de etanol ocorreu na 1ª fermentação em meio de fermentação a base

de glicose ($P_f = 81,72 \text{ g L}^{-1}$) e o menor valor na 3ª fermentação em meio de hidrolisado hemicelulósico ($P_f = 30,54 \text{ g L}^{-1}$).

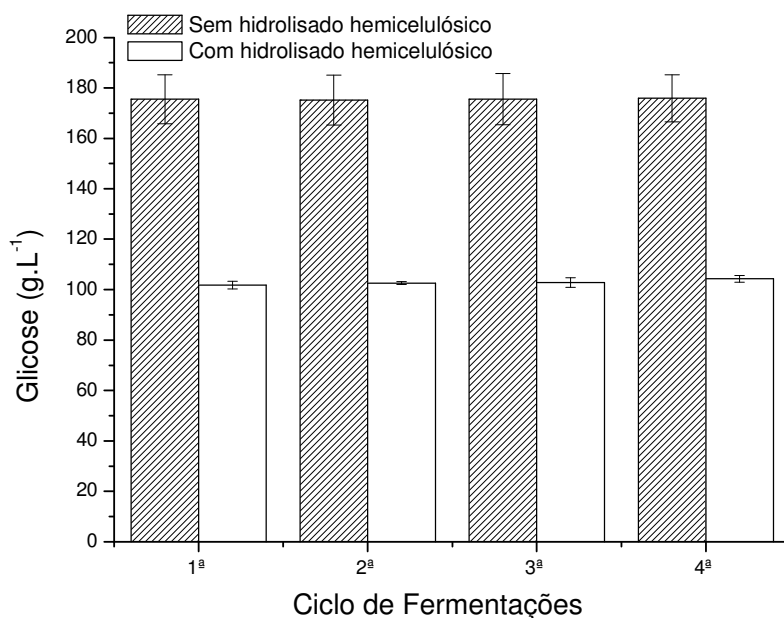


Figura 5.1: Consumo de glicose (200 g L^{-1}) durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.

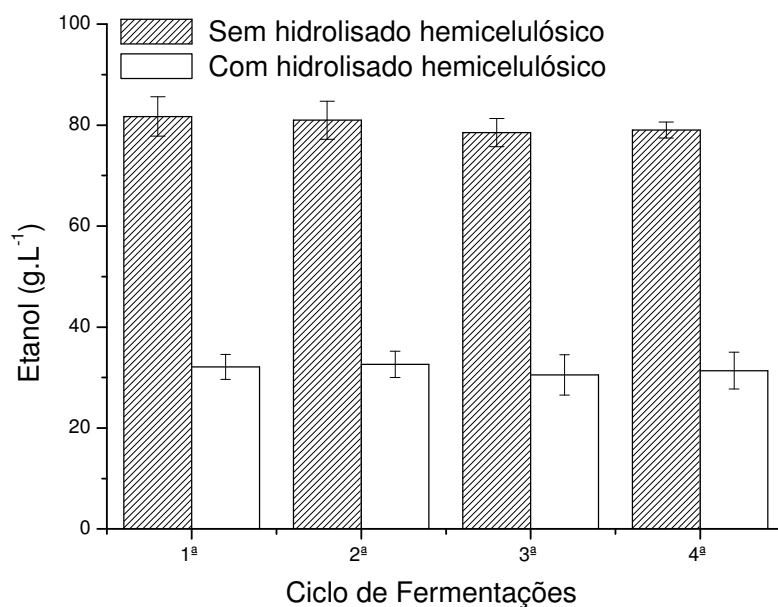


Figura 5.2: Concentração de etanol produzido durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.

O resultado para o etanol produzido pela linhagem UFPEDA 1238, quando em meio de fermentação com hidrolisado hemicelulósico, obtido por Sá (2012), foi baixo ($0,94 \text{ g L}^{-1}$) após 22 horas de fermentação. No entanto, quando em meio sem hidrolisado hemicelulósico, após 24 horas de fermentação, o mesmo autor observou uma produção de $86,9 \text{ g L}^{-1}$ de etanol pela linhagem UFPEDA 1238. Esse valor obtido por Sá (2012) para o etanol em meio sem hidrolisado está próximo do maior valor obtido no presente trabalho ($81,7 \text{ g L}^{-1}$), porém, alcançado em apenas 8 horas de fermentação.

Na Tabela 5.1, pode-se avaliar que as maiores produtividades foram obtidas em meio de fermentação sem hidrolisado, sendo a 1ª fermentação a de maior produtividade ($Q_P = 10,21 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), enquanto a 3ª fermentação, com hidrolisado hemicelulósico, apresentou a menor produtividade ($Q_P = 3,81 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Houve diferença significativa entre os valores obtidos para a fermentação sem hidrolisado e com hidrolisado, no entanto, não ocorreu diferença dentro das amostras com fermentações sem hidrolisado e com hidrolisado.

Tabela 5.1: Produtividade de etanol de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L^{-1} de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.

Ciclo	$Q_P \text{ (g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	
	Sem hidrolisado	Com hidrolisado
1º	10,2 ^a	4,0 ^b
2º	10,1 ^a	4,1 ^b
3º	9,8 ^a	3,8 ^b
4º	9,9 ^a	3,9 ^b

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Sá (2012) obteve uma produtividade de etanol de $3,29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em meio de fermentação com 200 g L^{-1} , sem hidrolisado, e de $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com hidrolisado. Os

valores encontrados por esse autor foram baixos se comparados com o resultado do experimento de fermentação com reciclo apresentado no presente trabalho

Na Tabela 5.2, são apresentados os rendimentos de etanol obtidos, para cada fermentação, em meio de fermentação sem e com hidrolisado hemicelulósico. O maior rendimento obtido foi na 1ª fermentação com meio de fermentação a base de glicose ($Y_{P/S} = 0,46 \text{ g g}^{-1}$) e o menor valor obtido foi na terceira fermentação com hidrolisado hemicelulósico ($Y_{P/S} = 0,33 \text{ g g}^{-1}$). No entanto, não houve diferença significativa entre os rendimentos das fermentações sem hidrolisado e entre os rendimentos com hidrolisado. O rendimento em etanol obtido por Sá (2012) foi ($Y_{P/S} = 0,39 \text{ g g}^{-1}$) quando em meio sem hidrolisado e ($Y_{P/S} = 0,06 \text{ g g}^{-1}$) quando em meio com hidrolisado hemicelulósico.

Tabela 5.2: Rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em meios contendo 200 g L^{-1} de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.

Ciclo	$Y_{P/S} (\text{g g}^{-1})$	
	Sem hidrolisado	Com hidrolisado
1º	0,47 ^a	0,30 ^a
2º	0,46 ^a	0,35 ^a
3º	0,45 ^a	0,27 ^a
4º	0,45 ^a	0,28 ^a

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação à eficiência da fermentação (Tabela 5.3), o maior valor obtido foi de 91%, sem hidrolisado, e o menor de 65%, com hidrolisado. Houve diferença significativa entre as eficiências das fermentações sem hidrolisado.

Sá (2012) obteve, em meio de fermentação sem hidrolisado, uma eficiência de 76% a qual atribuiu à formação de biomassa celular e glicerol em altas quantidades. Já em meio de fermentação com hidrolisado, o mesmo autor obteve uma eficiência

de 11%. No presente trabalho foi possível obter valores mais altos de eficiência se comparados aos resultados obtidos por Sá (2012).

Tabela 5.3: Eficiência da produção de etanol por *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.

Ciclo	Eficiência (%)	
	Sem hidrolisado	Com hidrolisado
1º	91,16 ^a	69,62 ^b
2º	90,61 ^a	69,71 ^b
3º	87,70 ^a	65,76 ^b
4º	88,14 ^a	66,79 ^b

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma ou em ambas colunas, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Nas Figuras 5.4 e 5.5, estão apresentados, respectivamente, os resultados das concentrações de glicerol e de ácido acético produzido durante as 8 horas de fermentação. Em meio de fermentação sem hidrolisado, houve uma maior produção tanto de glicerol quanto de ácido acético. O maior valor médio de glicerol foi observado no primeiro ciclo sem hidrolisado (7,64 g L⁻¹), enquanto, para o de ácido acético, foi observado no quarto ciclo (1,10 g L⁻¹), também sem hidrolisado. O menor valor médio de glicerol foi observado no terceiro ciclo com hidrolisado (1,78 g L⁻¹), enquanto, para o de ácido acético, foi observado no quarto ciclo (0,22 g L⁻¹), também sem hidrolisado. As concentrações de glicerol foram em média de 5,91% em relação as de etanol para todas as fermentações. Sá (2012) obteve uma relação de 17% em meio contendo 200 g L⁻¹ de glicose. Esse valor mais alto indica que houve um desvio no metabolismo do micro-organismo para a produção de glicerol visto que não foi utilizado altas concentrações celulares pelo autor acima citado e as leveduras utilizam o glicerol principalmente como um osmorregulador.

Já em relação às concentrações de ácido acético, estas foram em média de 0,92% em relação ao etanol para todas as fermentações.

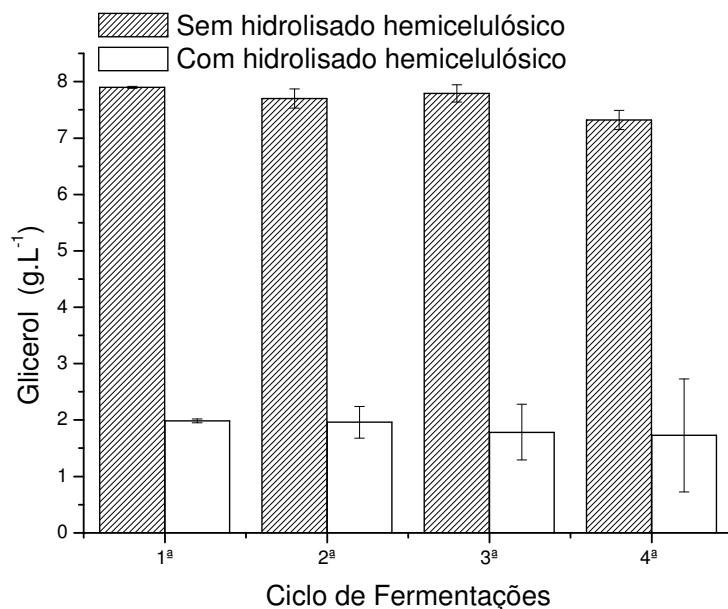


Figura 5.3: Concentração de glicerol produzido durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.

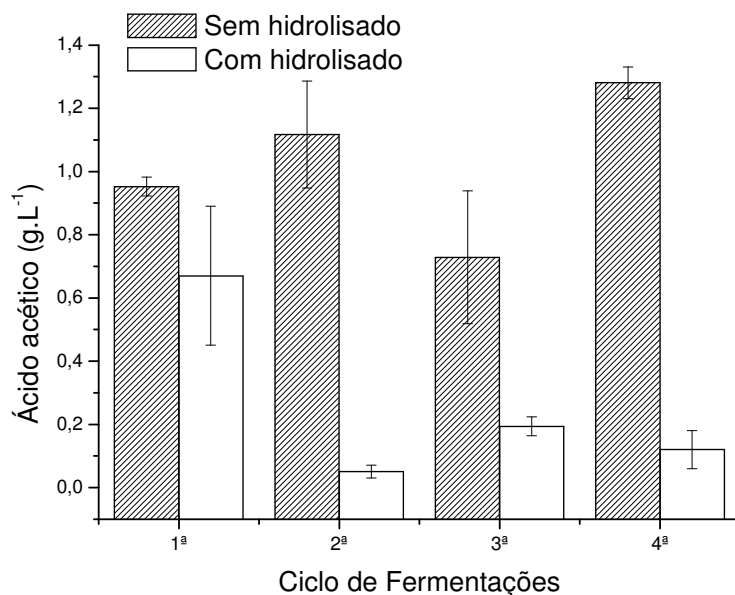


Figura 5.4: Concentração de ácido acético produzido durante 8 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.

Na Tabela 5.4, é apresentado o rendimento em co-produtos para cada fermentação após 8 horas. Foi observado que apenas a primeira fermentação teve diferença no rendimento de ácido acético quando em presença de hidrolisado em relação às demais. Em relação ao rendimento em glicerol, houve diferença em relação as fermentações em presença e ausência de hidrolisado, não ocorrendo diferença dentre as fermentações em mesma condição.

Tabela 5.4: Rendimento em co-produtos de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.

Ciclo	$Y_{CP/S}$ (g g ⁻¹)			
	Ácido acético		Glicerol	
	Sem hidrolisado	Com hidrolisado	Sem hidrolisado	Com hidrolisado
1º	0,0046 ^{abc}	0,0050 ^{abcd}	0,0435 ^a	0,0213 ^b
2º	0,0056 ^{abc}	0,0024 ^{bcd}	0,0428 ^a	0,0208 ^b
3º	0,0035 ^{abc}	0,0026 ^{bcd}	0,0414 ^a	0,0189 ^b
4º	0,0062 ^{abc}	0,0023 ^{bcd}	0,0427 ^a	0,0187 ^b

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pelas mesmas letras, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Na Figura 5.5, são apresentados os resultados das concentrações dos inibidores furfural e HMF durante as 8 horas de fermentação em meio de fermentação com hidrolisado hemicelulósico.

O furfural e o HMF foram totalmente biotransformados durante as 8 horas de fermentação do primeiro e segundo ciclo de fermentação. No entanto, por fatores desconhecidos não foram detectadas concentrações significativas de furfural no início da terceira e da quarta fermentação. Sá (2012) observou que o furfural também foi degradado em apenas 16 horas, enquanto o HMF apresentou pequena variação não sendo totalmente degradado no período estudado.

Na Figura 5.6, encontram-se os valores da viabilidade celular (%) do inóculo da primeira fermentação e após o término de cada fermentação. A viabilidade para todas as fermentações ficou abaixo de 90% e acima de 85%.

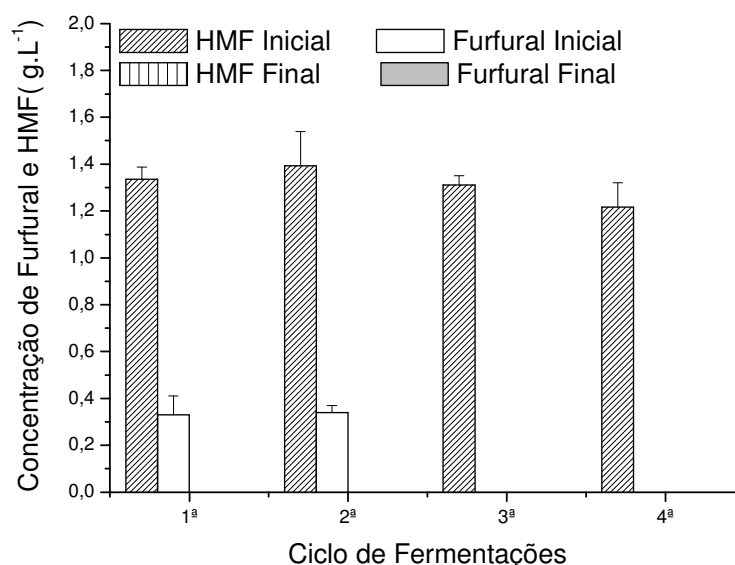


Figura 5.5: Concentração de furfural e hidroximetil furfural (HMF) durante 8 horas de fermentação, em meio com hidrolisado hemicelulósico, para cada ciclo de fermentação.

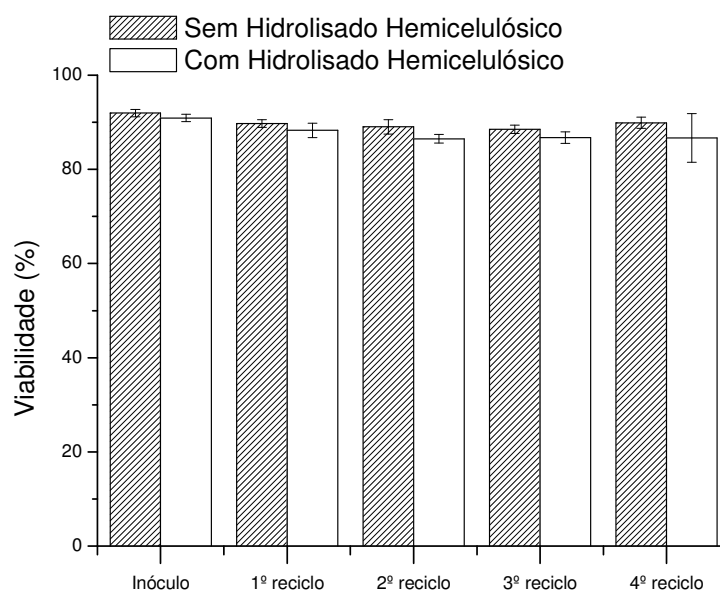


Figura 5.6: Viabilidade celular obtida ao final de cada 8 horas de fermentação.

Na Tabela 5.5, é apresentada a média dos resultados obtidos para a viabilidade celular. Foi observado que estatisticamente não houve diferença entre as amostras para todas as fermentações.

Tabela 5.5: Análise estatística da viabilidade celular de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, em meios contendo 200 g L⁻¹ de glicose, na presença e ausência de hidrolisado, após 8 horas de fermentação com reciclo de células.

Ciclo	Viabilidade celular (%)	
	Sem hidrolisado	Com hidrolisado
1 ^o	89,74 ^a	88,30 ^a
2 ^o	89,03 ^a	86,52 ^a
3 ^o	88,53 ^a	86,75 ^a
4 ^o	89,93 ^a	86,67 ^a

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

A análise dos resultados apresentados pela fermentação com reciclo demonstrou que a linhagem UFPEDA 1238 foi capaz de fermentar glicose em meio com hidrolisado hemicelulósico quando em alta concentração celular. No entanto, os resultados quando confrontados com a fermentação sem hidrolisado, realizada nas mesmas condições, mostraram a necessidade da melhoria do desempenho fermentativo da levedura na presença do hidrolisado.

5.2. Obtenção de Linhagens Resistentes aos Inibidores Através da Engenharia Evolutiva

De acordo com os resultados obtidos pelo estudo do reciclo da levedura UFPEDA 1238, em meio sem e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, foi observada a inibição da fermentação em hidrolisado, diferentemente do desempenho apresentado em meio de fermentação com glicose. Esse fato contribui para a abordagem principal do presente trabalho, a utilização da engenharia evolutiva para a obtenção da melhoria da capacidade fermentativa das linhagens UFPEDA 1238 e UFPEDA 205 em presença de hidrolisado hemicelulósico.

5.2.1. Evolução de *Zymomonas mobilis* UFPEDA 205

Para a evolução de *Z. mobilis* UFPEDA 205 em meio de fermentação com hidrolisado, o experimento seguiu o procedimento abordado no Item 4.4.2. Após as transferências em 25% (v/v) de hidrolisado por 10 vezes, essa foi transferida para 50 % de hidrolisado e incubada em estufa a 35°C, após 5 dias, não apresentou crescimento. A concentração do hidrolisado foi, então, reduzida para 35% e mantida nas mesmas condições. Contudo, *Z. mobilis* também não apresentou crescimento nessa condição, sendo encerrado o processo de evolução da bactéria na concentração de 25%. A linhagem apresentou problemas de isolamento em meio sólido com hidrolisado não sendo possível obter micro-organismos isolados da população originada pela UFPEDA 205.

5.2.2. Evolução de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238

Para a evolução da linhagem *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em meio de fermentação com hidrolisado, o experimento seguiu o procedimento apresentado no Item 4.4.2. As transferências ocorreram inicialmente em hidrolisado 25% (v/v), sendo observado que nessa concentração a linhagem não teve seu crescimento inibido. Após as sequências de aumento da concentração de hidrolisado, a linhagem foi transferida para meio com 100% (v/v) de hidrolisado e, como não houve crescimento após 6 dias de incubação, a concentração foi reduzida para 90%(v/v), no entanto, não houve crescimento, também, nessa concentração. Desse modo, a linhagem foi cultivada em 75% (v/v), última concentração tolerável pelo micro-organismo testado.

Das transferências da linhagem parental UFPEDA 1238, realizadas em hidrolisado até 75% (v/v), foi possível o isolamento de duas linhagens diferentes, denominadas L1 e L2. (Figura 5.8). Essas foram, então, submetidas a uma avaliação da evolução, confrontando-se os desempenhos fermentativos com a linhagem parental UFPEDA 1238.

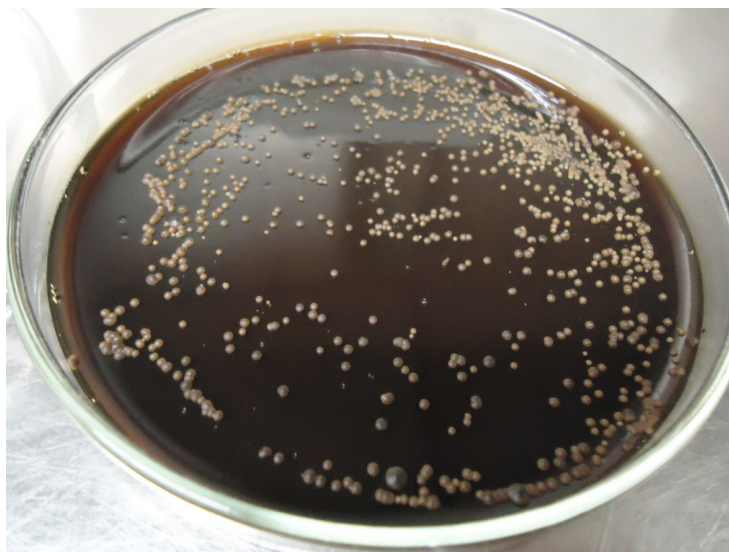


Figura 5.8: Placa de Petri contendo meio de manutenção com hidrolisado hemicelulósico a 75%(v/v) apresentando o crescimento de colônias na superfície após 9 dias em estufa a 35°C.

5.2.3. Comparação das linhagens parental e evoluídas

Os experimentos para a comparação entre as linhagens foram realizados de acordo com o Item 4.4.3.

O pH inicial do meio foi ajustado para 5,0, e, após 24 horas de fermentação, a média dos valores do pH final do meio estava em torno de 4,9, 4,7 e 4,6 para os meios fermentados pelas linhagens UFPEDA 1238, L1 e L2, respectivamente.

Na Figura 5.9, encontra-se os resultados obtidos para as absorbâncias em 24 horas de fermentação, para as linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2. As linhagens L2 e L1 apresentaram as maiores concentrações celulares após 24 horas em meio de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Entre as duas linhagens, a L2 apresentou um crescimento quase duas vezes maior que a linhagem L1.

Assim como no presente trabalho, em um estudo recente, usando a estratégia de engenharia evolutiva, KOPPRAM et al. (2012) cultivaram a linhagem TMB3400 modificada geneticamente e conseguiram isolar duas linhagens evoluídas em batelada e uma em quimiostato, que exibiram uma melhor tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado do vegetal abeto quando comparado com a linhagem parental.

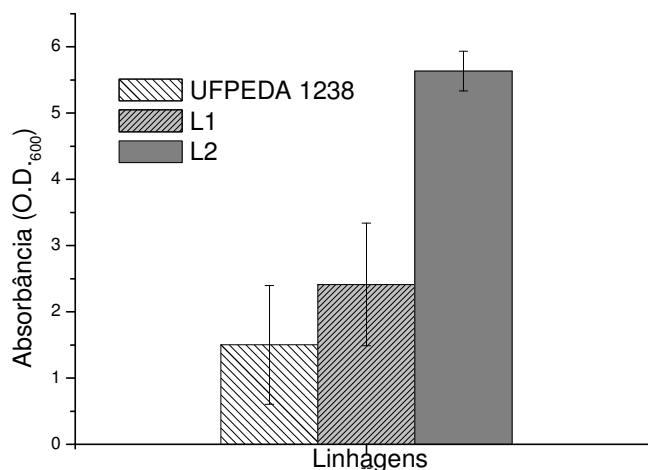


Figura 5.9: Absorbância das linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em presença de meio de fermentação com glicose e hidrolisado.

A glicose consumida é apresentada na Figura 5.10. Pode-se observar que houve uma maior assimilação pela linhagem L2, seguida pela linhagem L1. A linhagem UFPEDA 1238 apresentou o menor consumo de glicose.

A produção de etanol pelas linhagens testadas está apresentada na Figura 5.11. A linhagem L2 apresentou o maior valor médio de etanol produzido ($16,87\text{ g L}^{-1}$) em 24 horas; nesse mesmo período, a linhagem UFPEDA 1238 produziu menos etanol ($7,23\text{ g L}^{-1}$).

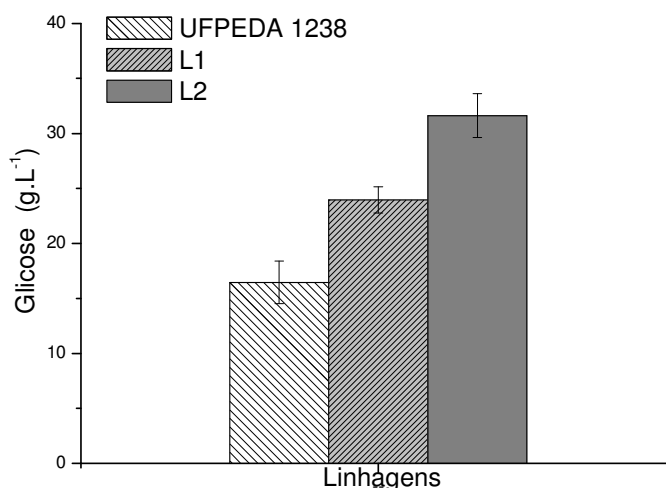


Figura 5.10: Consumo da glicose pelas linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas, em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

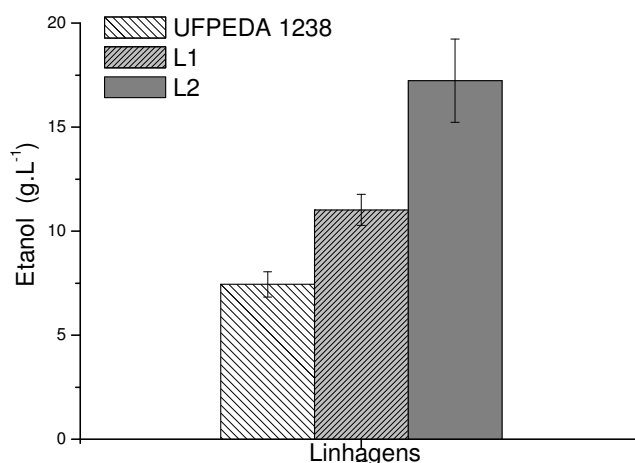


Figura 5.11: Produção de etanol pelas linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas, em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

Em relação à produtividade de etanol (Tabela 5.6), a linhagem L2 apresentou o maior valor ($0,7 \text{ g L}^{-1}$) e a linhagem UFPEDA 1238 o menor valor ($0,3 \text{ g L}^{-1}$). Houve diferença significativa entre todas as linhagens com relação à produtividade de etanol. Quanto ao rendimento (Tabela 5.7), o maior valor ($0,46 \text{ g g}^{-1}$) foi observado para a linhagem L2 e o menor valor ($0,34 \text{ g g}^{-1}$) para a linhagem UFPEDA 1238. Nesse caso, não houve diferença significativa entre os valores obtidos pela linhagem L1 e L2, mas a linhagem UFPEDA 1238 diferiu significativamente em relação às duas linhagens anteriormente citadas.

Tabela 5.6: Produtividade e rendimento em etanol para as linhagens *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 de fermentação em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

Linhagem	$Q_P \text{ (g.L}^{-1} \cdot \text{h)}$	$Y_{p/s} \text{ (g g}^{-1})$
UFPEDA 1238	$0,30^a$	$0,35^a$
L1	$0,46^b$	$0,45^b$
L2	$0,70^c$	$0,46^b$

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Os rendimentos em biomassa e as produtividades celulares, calculados para as linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2, estão apresentados na Tabela 5.7. Em relação ao rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$), as linhagens testadas não apresentaram diferença significativa entre elas. Quanto à produtividade celular, apenas a L2 apresentou diferença entre a UFPEDA 1238 e a L1, enquanto, entre essas duas, não houve diferença significativa.

Tabela 5.7: Rendimento de biomassa e produtividade celular para as linhagens *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 de fermentação em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

Linhagem	$Y_{x/s}$	Q_x (g.L ⁻¹ .h)
UFPEDA 1238	0,02 ^a	0,014 ^a
L1	0,02 ^a	0,017 ^a
L2	0,03 ^a	0,040 ^b

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto à eficiência da fermentação (Tabela 5.8), a linhagem L2 apresentou o maior valor (90%) e a linhagem IA1238 o menor valor (68%). Nesse caso, não houve diferença significativa entre os valores obtidos pela linhagem L1 e L2, mas a linhagem UFPEDA 1238 diferiu significativamente em relação às demais linhagens.

Tabela 5.8: Eficiência da fermentação pelas linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

Linhagem	Eficiência (%)
UFPEDA 1238	68 ^b
L1	88 ^a
L2	90 ^a

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

A produção de glicerol (Figura 5.12) pelas linhagens testadas foi baixa quando comparada a uma fermentação sem hidrolisado. O maior valor médio ($2,12 \text{ g. L}^{-1}$) foi produzido pela linhagem L2 e o menor valor pela linhagem UFPEDA 1238 ($1,18 \text{ g. L}^{-1}$). Estatisticamente, não houve diferença significativa de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância. A média da relação das concentrações de glicerol produzido em relação ao etanol produzido para as linhagens UFPEDA 1238, L1 e L2 foram, respectivamente, de 16, 14 e 13%. Sá (2012) obteve, com a fermentação de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, a relação entre a concentração de glicerol e etanol de 17% quando em meio de fermentação com alta concentração de glicose e 14% quando em meio com baixa concentração. Valores semelhantes aos encontrados pela linhagem parental e evoluídas no presente trabalho, para uma concentração intermediária de glicose (100 g L^{-1}), visto que o autor citado utilizou concentrações de 200 e 50 g L^{-1} de glicose.

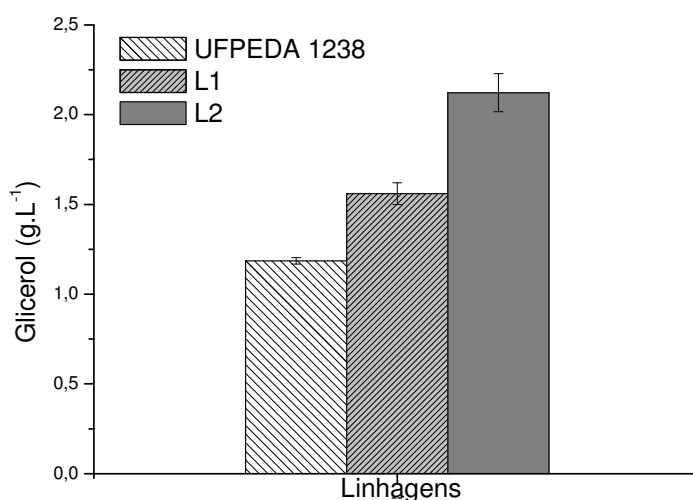


Figura 5.12: Produção de glicerol pelas linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas em meio de fermentação com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

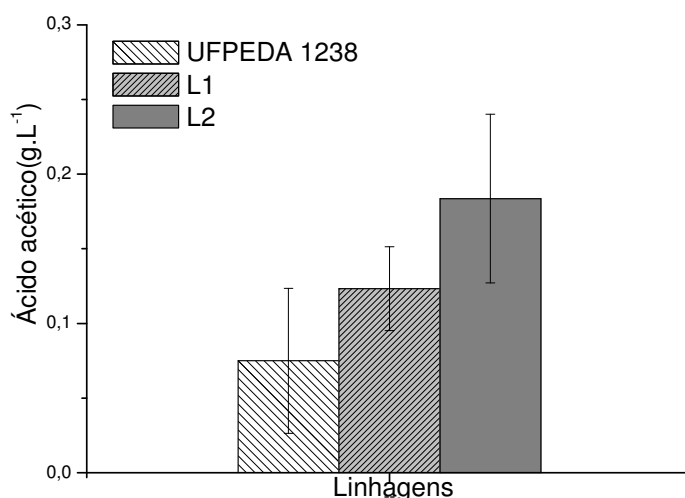


Figura 5.13: Produção de ácido acético pelas linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2, após 24 horas, em, meio de fermentação com glicose e hidrolisado.

O maior valor do ácido acético produzido ($0,18 \text{ g L}^{-1}$) foi obtido pela linhagem L2 e o menor valor ($0,07 \text{ g L}^{-1}$) pela linhagem UFPEDA 1238 (Figura 5.14). A relação entre a concentração de ácido acético produzido em relação ao etanol produzido, para as linhagens UFPEDA 1238, L1 e L2, foram, respectivamente, 1,0, 1,13 e 1,1%. Estatisticamente, não houve diferença significativa de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância. Os rendimentos de co-produtos (Tabela 5.9) também não apresentaram diferença significativa entre as linhagens.

Tabela 5.9: Rendimento de coprodutos glicerol e ácido acético pelas linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em presença de meio de fermentação com glicose e hidrolisado.

Linhagem	$Y_{CP/S} \text{ (g g}^{-1}\text{)}$	
	Glicerol	Ácido acético
UFPEDA 1238	0,0566 ^a	0,0036 ^a
L1	0,0642 ^a	0,0051 ^a
L2	0,0582 ^a	0,0050 ^a

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância

Todas as linhagens foram capazes de biotransformar o HMF e o furfural presentes no hidrolisado, pois, após as 24 horas de fermentação, não foi detectada a presença desses compostos no hidrolisado fermentado. Pela análise dos resultados do percentual remanescente dos inibidores, apresentados na Figura 5.15, pode-se observar que apenas o furfural e o HMF foram totalmente degradados durante as 24 horas de fermentação. O ácido acético teve uma pequena produção por todas as linhagens acima dos valores já encontrados normalmente no hidrolisado e o ácido fórmico não sofreu alteração com relação às concentrações iniciais.

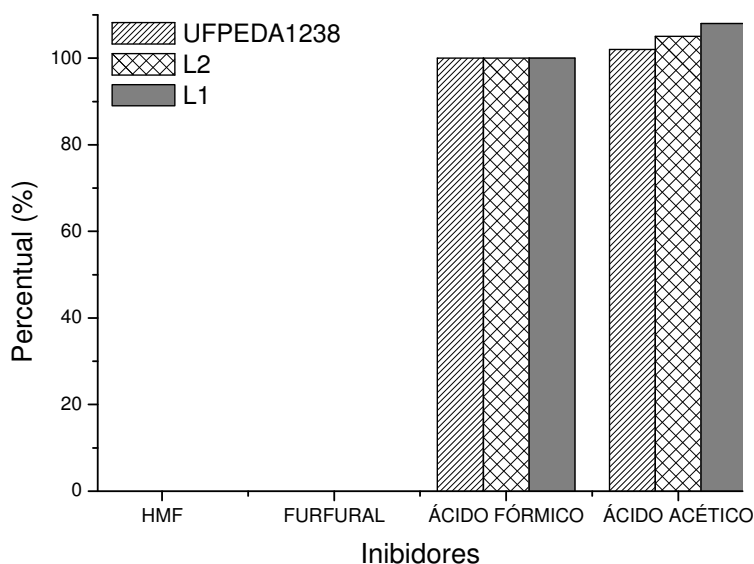


Figura 5.14: Percentual remanescente das concentrações dos inibidores, após 24 horas de fermentação em meio de glicose e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Em relação à viabilidade celular (Tabela 5.10), não houve diferença significativa entre os valores observados para todas as linhagens.

Após a avaliação dos resultados, seguidos pela análise estatística dos valores obtidos, foi possível constatar que a linhagem que apresentou as melhores características desejáveis para uma fermentação etanólica foi a linhagem L2. Como foi mostrada anteriormente, a mesma apresentou a maior produtividade de etano ($Q_p = 0,7 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$), o maior rendimento de etanol ($Y_{P/S} = 0,46 \text{ g g}^{-1}$) e, conseqüentemente, a melhor eficiência de fermentação (90%).

Tabela 5.10: Viabilidade celular das linhagens de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, L1 e L2 após 24 horas em presença de meio de fermentação com glicose e hidrolisado.

Linhagem	Viabilidade celular (%)	
	Inicial	Final
IA1238	98 ^a	93 ^a
L1	99 ^a	97 ^a
L2	99 ^a	98 ^a

Nota: As médias (de triplicata) seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Tukey a 5% de significância.

Como discutido por Larsson et al. (2001), a utilização de linhagens adaptadas, ou que foram geneticamente modificadas para resistir às altas concentrações de inibidores, pode diminuir a necessidade de medidas mais amplas tais como a detoxificação de hidrolisados.

5.3. Fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 e L2

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* parental (UFPEDA 1238) e evoluída (L2) foram caracterizadas em biorreator instrumentado, como descrito no Item 4.4.4, para avaliação e comparação dos parâmetros fermentativos em meios de glicose, na presença e ausência de hidrolisado hemicelulósico.

5.3.1. Caracterização da linhagem UFPEDA 1238

Na Figura 5.15, são apresentados os resultados de fermentação da linhagem parental UFPEDA 1238 em meio sem hidrolisado. Pode-se observar o perfil de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol, em meio com 100 g L⁻¹ de glicose. A fermentação ocorreu por 16 horas, com $X_f = 4,92$ g L⁻¹ e $P_f = 38,8$ g L⁻¹. A produtividade de etanol foi igual a 2,43 g L⁻¹ h⁻¹ e a produtividade de biomassa a 0,27

$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$. O rendimento de biomassa foi de $0,05 \text{ g g}^{-1}$ e o rendimento de etanol foi de $0,37 \text{ g g}^{-1}$, correspondendo a uma eficiência de fermentação de 74 %.

Sá (2012) obteve o mesmo rendimento em biomassa microbiana ($0,05 \text{ g g}^{-1}$) em alta concentração de glicose 200 g L^{-1} . A produtividade $2,57 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, o rendimento em etanol $0,39 \text{ g g}^{-1}$ e a eficiência 76% também foram próximos aos valores obtidos no presente trabalho.

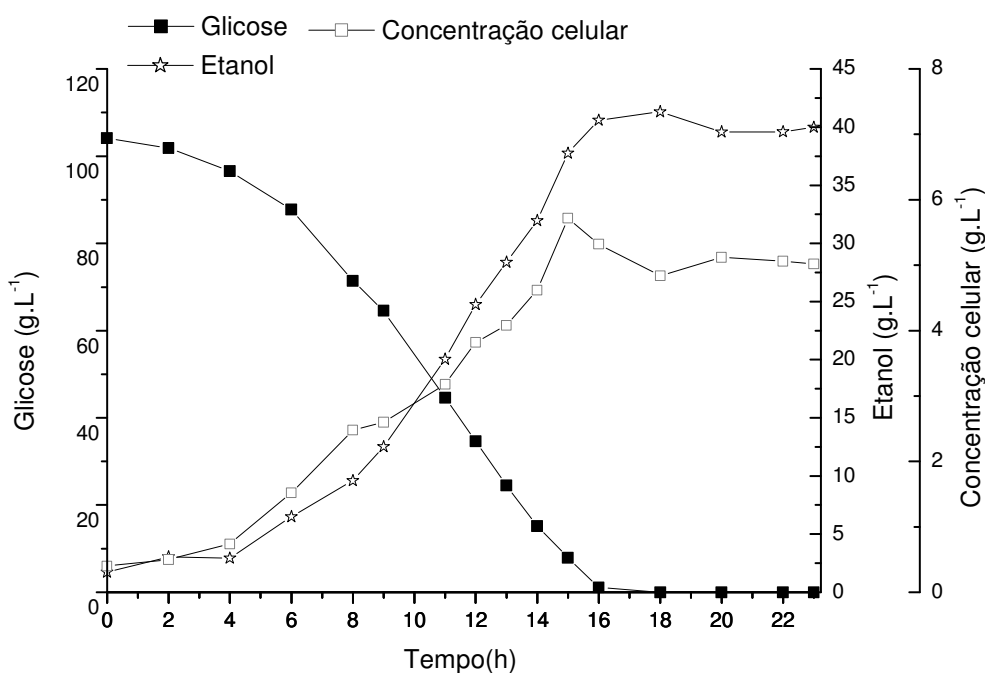


Figura 5.15: Perfil de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em meio de glicose (100 g L^{-1}).

Na Figura 5.17, mostra-se o perfil de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol e glicerol, em meio com aproximadamente 100 g L^{-1} de glicose em presença de hidrolisado hemicelulósico. Após 20 horas de fermentação, ocorreu pouca variação nas concentrações ($\Delta S = 14,02 \text{ g L}^{-1}$, $\Delta P = 0,942 \text{ g L}^{-1}$, $\Delta X = 0,74 \text{ g L}^{-1}$, $\Delta CP_{\text{glicerol}} = 0,05 \text{ g L}^{-1}$ e $\Delta CP_{\text{ácido acético}} = 0,00 \text{ g L}^{-1}$). O rendimento de biomassa foi de $0,05 \text{ g g}^{-1}$ e o rendimento de etanol foi de $0,07 \text{ g g}^{-1}$. A eficiência da fermentação foi de apenas 13 %. A produtividade de etanol foi $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ e a produtividade de biomassa foi de $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Sá (2012), após uma fermentação de 22 horas em meio à base de glicose com hidrolisado, observou que houve pouca variação nas concentrações ($\Delta X = 0,26 \text{ g L}^{-1}$

¹, $\Delta S = 14,5 \text{ g L}^{-1}$ e $\Delta P = 0,94 \text{ g L}^{-1}$), as produtividades também foram baixas ($Q_X = 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $Q_P = 0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). O rendimento de etanol em glicose foi $Y_{P/S} = 0,06 \text{ g g}^{-1}$, correspondendo apenas a uma eficiência de 11%.

Os valores dos parâmetros obtidos por Sá (2012) são coerentes com os encontrados no presente trabalho.

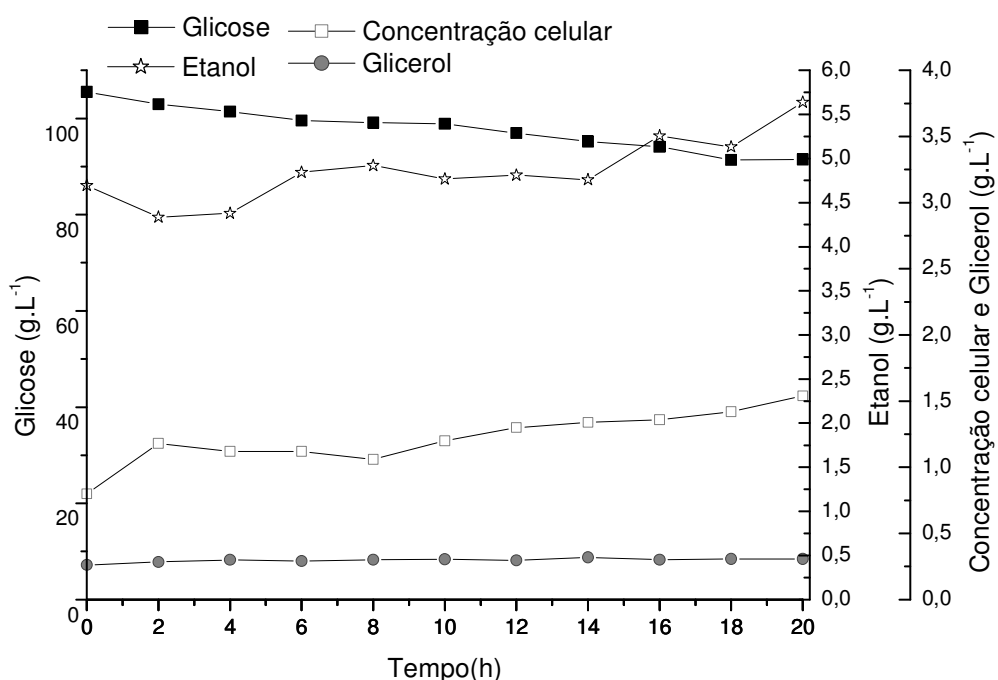


Figura 5.17: Perfil de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e coprodutos por *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

Na Figura 5.18, estão apresentadas as variações de concentração de inibidores encontrados no meio com glicose e hidrolisado. Pode-se observar que o ácido fórmico, ácido acético e HMF permaneceram com as concentrações praticamente constantes durante as 20 horas de fermentação. No entanto, o furfural apresentou uma redução de $1,8 \text{ g L}^{-1}$ na concentração durante a fermentação, enquanto o HMF sofreu uma menor variação ($0,32 \text{ g L}^{-1}$).

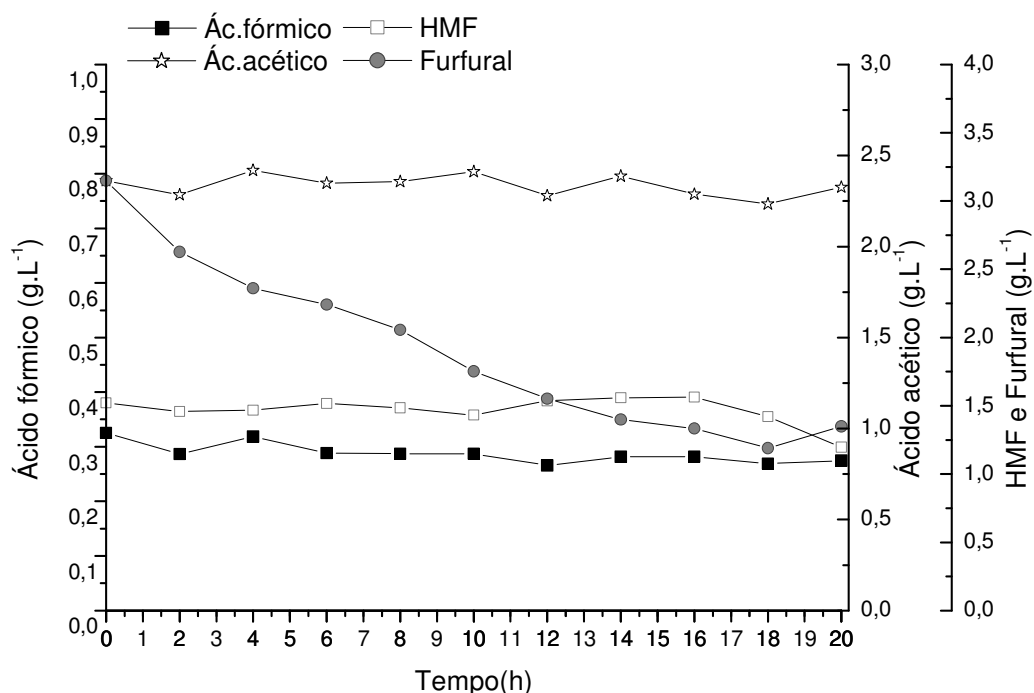


Figura 5.18: Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 em meio com glicose e hidrolisado hemicelulósico.

5.3.2. Caracterização da linhagem *S. cerevisiae* L2

Na Figura 5.21, observa-se o perfil de crescimento, consumo de glicose, produção de etanol, e produção de glicerol da linhagem evoluída L2, em meio com aproximadamente 100 g L⁻¹ de glicose. Após 20 horas de fermentação, foram obtidas as seguintes variações nas concentrações: $\Delta S = 91,75$ g L⁻¹, $\Delta P = 35,02$ g L⁻¹, $\Delta X = 4,18$ g L⁻¹, $\Delta CP_{\text{glicerol}} = 5,07$ g L⁻¹ e $\Delta CP_{\text{ácido acético}} = 0,34$ g L⁻¹. A produtividade de etanol foi de 1,75 g L⁻¹ h⁻¹ e a produtividade de biomassa foi de 0,21 g L⁻¹ h⁻¹. O rendimento de biomassa foi de 0,04 g g⁻¹, o rendimento em etanol foi de 0,38 g g⁻¹ e a eficiência da fermentação foi de 75 %. Já em relação ao rendimento em coprodutos, o rendimento de glicerol foi de 0,05 g g⁻¹ e o do ácido acético de 0,00 g g⁻¹.

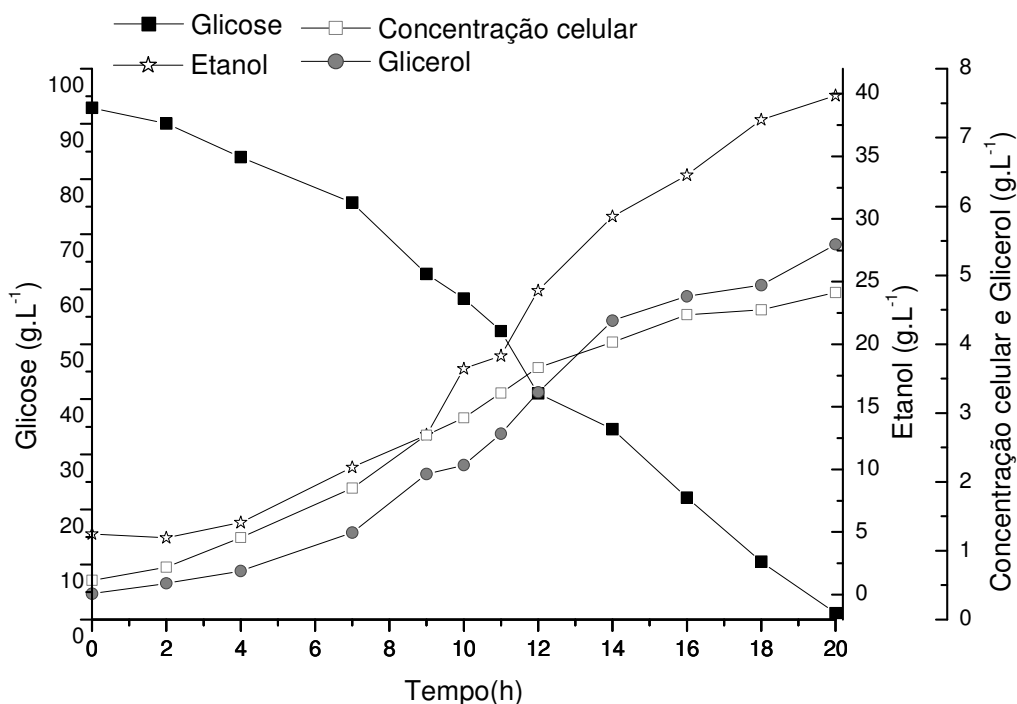


Figura 5.21: Perfil de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e coproduto por *S. cerevisiae* L2 em meio de fermentação com glicose.

Foi possível observar diferenças entre as linhagens UFPEDA 1238 e L2 em meio de fermentação à base de glicose, sendo a produtividade o principal parâmetro destacado.

Na Figura 5.22, é apresentado o perfil de crescimento, consumo de glicose e produção de etanol e glicerol, em meio com 100 g L⁻¹ de glicose e hidrolisado hemicelulósico para a linhagem evoluída L2. Após 22 horas de fermentação, ocorreu pouca variação nas concentrações ($\Delta S = 18,13$ g L⁻¹, $\Delta P = 3,6$ g L⁻¹, $\Delta X = 3,45$ g L⁻¹, $\Delta CP_{\text{glicerol}} = 0,16$ g L⁻¹ e $\Delta CP_{\text{ácido acético}} = 0,05$ g L⁻¹). A produtividade de etanol foi 0,16 g L⁻¹ h⁻¹ e a produtividade de biomassa foi 0,16 g L⁻¹ h⁻¹. O rendimento de biomassa foi de 0,19 g g⁻¹, o rendimento de etanol foi de 0,20 g g⁻¹ e a eficiência da fermentação foi de 39 %. Já em relação ao rendimento em coprodutos, o rendimento de glicerol foi de 0,01 g g⁻¹ e o de ácido acético de 0,00 g g⁻¹.

De acordo com os dados obtidos pela fermentação de *S. cerevisiae* L2 em meio de fermentação com glicose e hidrolisado e comparação com a linhagem UFPEDA 1238, observa-se que houve um aumento de aproximadamente 4 vezes do crescimento celular em relação à linhagem mãe. Também houve um expressivo

acréscimo de quase quatro vezes na produção e produtividade de etanol e na produtividade em biomassa.

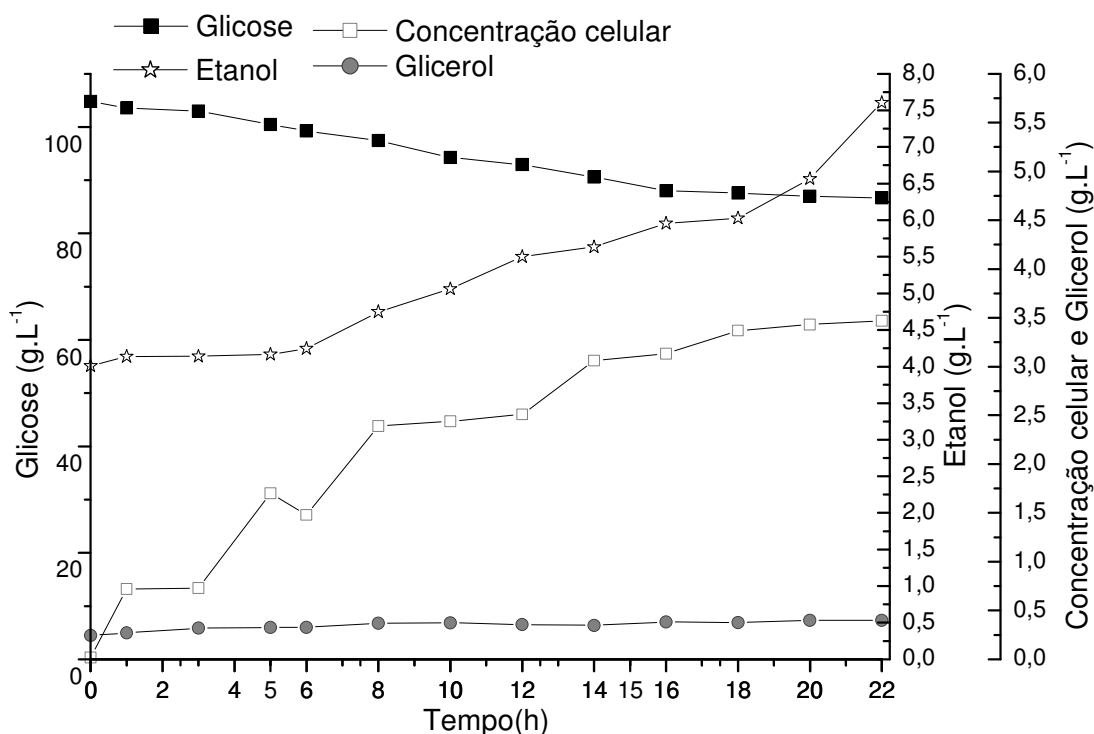


Figura 5.22: Perfil de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e coproduto por *S. cerevisiae* L2 em meio de fermentação com glicose e hidrolisado.

Na Figura 5.23, estão apresentadas as variações de concentração de inibidores. Pode-se observar que os ácidos fórmico e ácido acético permaneceram com as concentrações praticamente constantes durante as 22 horas de fermentação. No entanto, o HMF apresentou uma variação de $0,28 \text{ g L}^{-1}$ em 22 horas e, nesse mesmo período, o furfural foi biotransformado (sofreu redução) com uma variação de $1,67 \text{ g L}^{-1}$. Assim como na fermentação com melaço e hidrolisado pela linhagem UFPEDA 1238, nessa fermentação também houve uma rápida queda da concentração do furfural nas primeiras horas da fermentação, com uma variação de $0,64 \text{ g L}^{-1}$.

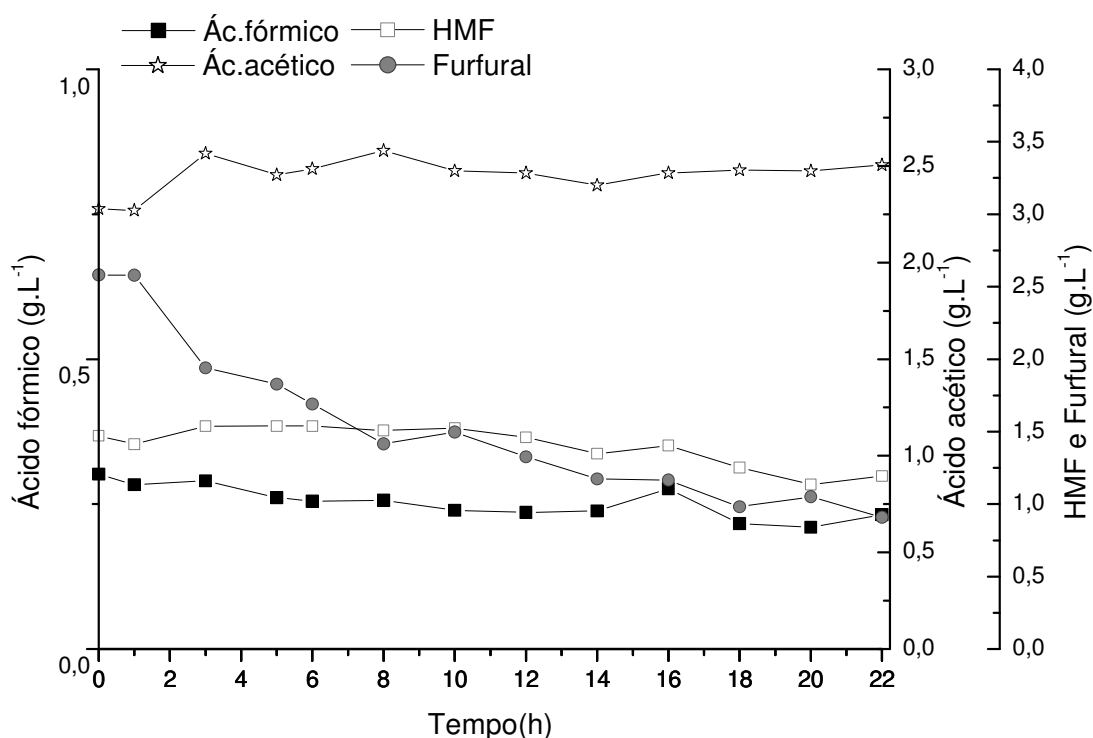


Figura 5.23: Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de *S. cerevisiae* L2 em meio com glicose (100 g L⁻¹) e hidrolisado hemicelulósico.

De acordo com a literatura, a queda apresentada pelo furfural, durante as primeiras horas das fermentações com hidrolisado, deve está relacionada com a diferença nas atividades das enzimas redutoras envolvidas pois, segundo Liu (2006), a redução do furfural, requer NADH, enquanto o HMF tem uma preferência diferente, pois o cofactor NADPH é necessário para a sua redução. No entanto, o NADPH também é necessário para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos. Sendo assim, a redução do HMF pode competir com a síntese de biomassa microbiana e crescimento celular. Esse deve ser o motivo pelo qual esse inibidor persiste por mais tempo no meio de fermentação enquanto o furfural é rapidamente reduzido.

Na tabela 5.11, são apresentados, resumidamente, os resultados de produtividades e rendimentos das linhagens UFPEDA 1238 e L2 para uma melhor observação dos seus desempenhos em meios de fermentação com glicose na presença e ausência de hidrolisado.

Tabela 5.11: Comparação dos parâmetros cinéticos da fermentação de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 e *S. cerevisiae* L2 em meio de fermentação com glicose e hidrolisado.

Parâmetros cinéticos	Linhagem	
	UFPEDA 1238	L2
$Q_x (g L^{-1} h)$	0,04	0,16
$Q_p (g L^{-1} h)$	0,05	0,16
$Y_{X/S} (g g^{-1})$	0,05	0,19
$Y_{P/S} (g g^{-1})$	0,07	0,20
$Y_{CP/S \text{ glicerol}} (g g^{-1})$	0,00	0,01
$Y_{CP/S \text{ ac. acético}} (g g^{-1})$	0,00	0,00

De acordo com a tabela 5.11, houve uma melhora nas produtividades e rendimentos em etanol e biomassa microbiana para a linhagem L2, embora não se tenha observado nenhuma diferença em relação aos coprodutos para ambas as linhagens. Os resultados apresentados indicam o potencial do uso da evolução como uma ferramenta capaz de melhorar a tolerância da levedura a inibidores presentes em hidrolisados.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÃO

Os crescimentos das linhagens *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 e *Z. mobilis* UFPEDA 205 foram severamente inibidos por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por tratamento hidrotérmico. Cultivo de *S. cerevisiae* UFPEDA 1238 na presença do hidrolisado, com alta densidade e reciclo celular, resultou na utilização de açúcares e produção de etanol, mas com redução de rendimento e produtividade.

Através de engenharia evolutiva, foi possível se isolar duas linhagens provenientes da linhagem parental UFPEDA 1238 para a realização de fermentações em hidrolisado. Por outro lado, *Z. mobilis* não foi capaz de crescer na presença de mais de 25% (v/v) de hidrolisado após aproximadamente 30 dias .

Em fermentação com glicose, na presença de 75% (v/v) de hidrolisado, uma das linhagens, denominada L2, apresentou valores bem melhores de rendimento e produtividade de etanol que a linhagem parental.

Os valores dos parâmetros obtidos em meio de fermentação com hidrolisado para a linhagem de levedura evoluída, embora melhores do que os da linhagem parental são ainda baixos se comparados com os parâmetros obtidos em meio de fermentação sem hidrolisado.

Desse modo, sugere-se que a linhagem seja submetida a mutações induzidas por agentes físico e/ou químico e, posteriormente, submetida a mais etapas de evolução.

REFERÊNCIAS

- ADEN, A.; FOUST, T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. *Celulose*, v. 16, p. 535 – 545, 2009.
- ALMEIDA, J. R. M.; KARHUMAA, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3674–3677, 2009.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HAGERDAL, B.; LINDER, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 340-349, 2007.
- ALMEIDA, J. R.M.; MODIG, T.; RÖDER, A. LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, MARIE-F. *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels*, v.1, 2008.
- ALRIKSSON, B.; CAVK, A.; JÖNSSON, L J. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. *Bioresource Technology*, v.102, p.1254–1263, 2011.
- AMIDON, T. E.; LIU S. Water-based woody biorefinery. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 542–550, 2009.
- AMORIM, H. V.(Org.). *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. Piracicaba, SP: Fermentec, 2005, 434 p.
- ANDO, S.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Identification of Aromatic Monomers in Steam-Exploded Poplar and Their Influences on Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation Technology*, v. 64, n. 6, p. 567-570, 1986.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. *MultiCiência*. Campinas, n. 7, out. 2006.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 89–105, 2008.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. v. 52, p. 858-875, 2011.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). *Química Nova*, v.31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.

BEAVEN, M. J.; ZAWADZKI, B.; BRONIUK, R.; LAWFORD, H.; FEIN, J., Comparative performance trials with yeast and *Zymomonas* for ethanol production from corn. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.20/21, p. 219-326, 1989.

BECKER, J.; BOLES, E. A Modified *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Consumes L-Arabinose and Produces Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4144 – 4150, 2003.

BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPOPORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, v. 55, p.147–150, 2000.

BNDES e CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável / organização BNDES e CGEE. 1ª edição, Rio de Janeiro 316 p, 2008.

ÇAKAR, Z.P.; ALKIM, C.; TURANLI, B.; TOKMAN, N.; AKMAN, S. SARIKAYA, M.; TAMERLER, C. BENBADIS, L.; FRANÇOIS, J.M. Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo evolutionary engineering approach. *Journal of Biotechnology*, v.143, p. 130–138, 2009.

ÇAKAR, Z.P.; SEKER, U.O.S.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, v. 5, p. 569–578, 2005.

CALAZANS, G. M. T. Fermentação Etanólica por *Zymomonas mobilis* (Cepa ZAP). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 1987.

CAO, G.; REN, N.; WANG, A.; LEE, DUU-JONG.; GUO, W.; LIU, B.; FENG, Y. ZHAO, Q. Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34p. 7 1 8 2 – 7 1 8 8, 2 0 0 9.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, v.101, p.4754-4766, 2010.

CAZETTA, M.L.; CELLIGOI, M.A.P.C.; BUZATO, J.B.; SCARMINO, I.S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, v.98, p.2824–2828, 2007.

CGEE (Centro de gestão e estudos estratégicos). Química verde no Brasil: 2010-2030, Brasília, 2010.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A. KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, v.98, p.1947–1950, 2007.

CHANDEL, A. K. SINGH, O. V.; RAO, L. V.; CHANDRASEKHAR, G.; NARASU, M. L. Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into

ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. *Bioresource Technology*, v. 102, p.1709–1714, 2011.

CNI (Confederação Nacional da Indústria). Matriz energética: cenários, oportunidades e desafios. Brasília: CNI, 82 p. 2007.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). O etanol como um novo combustível universal: Análise estatística e projeção do consumo doméstico e exportação de etanol brasileiro no período de 2006 a 2011. Técnico Responsável: Ângelo Bressan Filho. 2008.

COOPER, T. F.; ROZEN, D. E.; LENSKI, R. E. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 100, p.1072–1077, 2003.

COOPER, V. S.; LENSKI, R. E. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, v.407, p.736-739, 2000.

DEANDA, K., ZHANG, M., EDDY, C.; PICATAGGIO, S. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4465–4470, 1996.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.19 p.220-225, 1996.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology Biotechnology* v.63, p. 258 -266, 2003.

DING, J.; HUANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, N.; YANG, D.; ZHANG, K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.85, p. 253 – 263, 2009.

ELENA, S. F.; LENSKI, R. E. EVOLUTION EXPERIMENTS WITH MICROORGANISMS: The Dynamics And Genetic Bases Of Adaptation. *Nature Reviews. GENETICS*, v. 4 p.457-469, 2003.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética (Brasil). Balanço Energético Nacional 2013: Ano base 2012 / Empresa de Pesquisa Energética. – Rio de Janeiro : EPE, 2013.

EMBRAPA. Plano Nacional de Agroenergia 2006 - 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Produção e Agroenergia. 2. ed. rev. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 110 p. 2006.

ERNANDES, F. M. P. G. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura a base de glicoses e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar). Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Engenharia e Ciências de alimentos da Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2006.

ERNANDES, F.M.P.G., GARCIA-CRUZ, C.H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. Semina: Ciências Agrária. V. 30, n.2, p.361-80, 2008.

ERZINGER, G. S.; VITOLO, M. *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 129-13, p. 787-794, 2006.

FALCÃO DE MORAIS, J. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. Revista do Instituto de Antibióticos, n. 1/2, p. 169-182, 1983.

FUTUYMA, D. J. *Biologia evolutiva*. 2.ed. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, [Brasília]: CNPq, 2002. xiii, 631 p.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology Biotechnology, v.59,p. 618–628,2002.

GLAZER, A. N., NIKAIDO, H. *Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology*. Cambridge University Press, New York, United States of America. 2nd edition. 2007.

GONÇALVES DE LIMA, O. Sobre uma interessante e pouco conhecida publicação de Paul Lindner acerca do emprego terapêutico de *Zymomonas mobilis* Kluver e Van Niel, 1936(= *Pseudomonas lindneri*). Rev InstAntib. V.1:2, p.119-124. 1968.

GONÇALVES DE LIMA, O., ARAÚJO, J. M., SCHUMACHER, I. E., SILVA, E. C. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. RevInst Antib.V.10, p.3-15, 1970.

GUNASEKARN, P.; KARUNAKARAN, T.; KASTHURIBAI, M. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. Journal Bioscience, India, v. 10, p. 181-186, 1986.

GUTEIRREZ-PADILLA, M. G. D.; KARIM, M. N. Influence of furfural on the recombinant *Zymomonas mobilis* strain CP4 (pZB5) for ethanol production, The Journal of American Science, v.1, n.1, p. 24-27, 2005.

HAHN-HÄGERDA, L. B.; KARHUMAA, K.; LARSSON, C. U.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GÖRGENS, J.; H VAN ZYL, W. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. Microbial Cell Factories, v. 3, 2005.

HASUNUMA T.; KONDO A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. Biotechnology Advances, v. 30 p. 1207–1218, 2012.

JEFFRIES, T. W.; SHI, NIAN-QING. Genetic Engineering for Improved Xylose Fermentation by Yeasts. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 65, 1999.

JOACHIMSTHAL, E.; HAGGETT, K. D.; JANG J. H.; ROGERS, P. L. A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. *Biotechnology Letters*, v. 20, p. 137–142, 1998.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66, p. 10-26, 2004.

KOPPRAM, R.; ALBERS, E.; OLSSON, L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnology for Biofuels*, v.5, 2012.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

KUYPER, M.; WINKLER, A. A.; DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research* v.4, p. 655–664, 2004.

LAADAN,B.; ALMEIDA, J.R.M.; RADSTRÖM, P. ; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND,M. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.25, p.191–198. 2008.

LARSSON, S.; PALMQVIST,E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG,C.;

LEE, Kye Joon; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L.. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. *Biotechnology Letters*. October 1979, Volume 1, Issue 10, pp 421-426.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.90, p. 809–825, 2011.

LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, v.282, p. 233–244, 2009.

LU, Y.; WARNER,R.; SEDLAK, M.; HO, N.; MOSIER, N. S. Comparison of Glucose/Xylose Cofermentation of Poplar Hydrolysates Processed by Different Pretreatment Technologies. *Biotechnology Progress*, v. 25, n^o 2, 2009.

LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 22, p.125–138, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, v.20,p.372–380, 2009.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B. JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* .v.31, p. 274–282, 2002.

MARTÍN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O.; JÖNSSON, L. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, v. 98, p.1767–1773, 2007.

MATANO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Cell recycle batch fermentation of high-solid lignocellulose using a recombinant cellulase-displaying yeast strain for high yield ethanol production in consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 403-409, 2013.

MICHEL, G. P. F.; STARKA, J. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 165, n.3, p. 1040-42, 1986.

MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, v.26, 2009.

MOHAGHEGHI, A., EVANS, K., CHOU, Y. C.; ZHANG, M. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101 *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 98, n. 100, p.885–898, 2002.

MOHAGHEGHI, A.; SCHELL, D. J. Impact of recycling stillage on conversion of dilute sulfuric acid pretreated corn stover to ethanol. *Biotechnology Bioenergy*, v.105, n. 5, p. 992-996, 2009.

MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. *Energy Policy*, v.27,p. 229-245. 1999.

MOSIER, N. ; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER , R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE ,M.; LADISCH, M. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p.673–686, 2005.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* , v.93, p. 1–10, 2004.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES P. M.R.; SILVA, J. P. A.; LÍVIA M., ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 817–830, 2010.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; CHANG, R.; REIS, D. C. Atividade Antioxidante de Própolis verde, marrom e avermelhada de regiões que contém alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/92/artigo2.htm> Acesso em: 13 de dezembro de 2011.

NELSON, DAVID L.; LEHNINGER, ALBERT L.; COX, MICHAEL M. LEHNINGER. Princípios de bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

NIGAM, J.N.. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, v.87, p.17–27, 2001.

NILSSON A.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G. Cofactor Dependence in Furan Reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in Fermentation of Acid-Hydrolyzed Lignocellulose. *Applied and environmental microbiology*, p. 7866–7871. v. 71, N^o. 12, 2005.

NILSSON, A.; TAHERZADEH, M. J. ; LIDÉN, G. Use of dynamic step response for control of fed-batch conversion of lignocellulosic hydrolyzates to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 41–53, 2001.

OCTAVE S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*. v. 91, p. 659–664, 2009.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; B. HAHN-HÄGERDAL. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *S. cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62, p. 447-454, 1999.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.B. HAHN-HÄGERDAL. Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and p-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*.v.63, p. 46–55, 1999.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource. Technology*, v.74, p.17–24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource. Technology*, v.74, p.17–24, 2000b.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19 p. 470-476, 1996.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; LEMOS, S. A. Isolamento e análise estrutural de ligninas. *Química Nova*, v.16, p. 435-44, 1993.

REE, R. V.; ANNEVELINK, B. Status Report Biorefinery 2007. *Agrrotechnology and Food Sciences Group*. November 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química. Nova. São Paulo*, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

RICHARD J. ULBRICHT, SHARON J. NORTHUP, AND JOHN A. THOMAS. A Review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Parenteral Solutions. *FUNDAMENTAL AND APPLIED TOXICOLOGY*, v. 4, p.843-853, 1984.

ROGERS, P. L., Lee, K. J. and Tribe, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high suger concentrations. *Biotechnol. Lett.*, 1 (4): 165-170. (1979).

ROGERS, P. L.; JEON, Y. J.; LEE, K. J.; LAWFORD, H. G. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, v. 108, p. 263-288, 2007.

ROGERS, P. L.; JOACHIMSTHAL, E. L.; HAGGETT, K. D. Ethanol from lignocellulosics: potential for a *Zymomonas*-based process. *Australasian Biotechnology*, v. 7, n. 4, p. 304-309, 1997.

RUANGLEK, V.; MANEEWATTHANA, G.; TRIPETCHKUL, S. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1432-1437, 2006.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzymeand Microbial Technology*, v.37, p.195–204, 2005.

SÁ, C. B. C. Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para aplicação na produção de bioetanol. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S, A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. POTENCIAL DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. *Química Nova*, v. 35, n.5, 1004-1010, 2012.

SAUER, U. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes. *Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology*, v. 73, 2001.

SCHMIDT, A; BRINGER-MEYER, S.; PORALLA, K.; SAHM, H. Effect of alcohols and Temperature on the Hopanoid Content of *Zymomonas mobilis*. *Chem. Eng. Technol.*, v. 17, n. 10-20, 1986.

SEO, J. S.; CHONG, H.; PARK, H. S.; YOON, K.O, JUNG, C.; KIM, J. J.; HONG, J. H.; KIM, H.; KIM J. H.; KIL, J. I.; PARK, C. J.; OH, H. M.; LEE, J. S.; JIN, S. J.; UM, H. W.; LEE, H. J., OH, S. J., KIM, J. Y.; KANG, H. L.; LEE, S. Y.; LEE, K. J.; KANG, H. S. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnol.*, v. 23, p.63–68.18, 2005.

SILVA, R; HARAGUCHI, S.; MUNIZ, E. ; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. Química. Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p. 152-177, 1999.

SNIEGOWSKI, P. D.; GERRISH, P. J.; LENSKI, R. E. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *NATURE*, v. 387 p. 703-705, 1997.

SNOEK, I .Identification and regulation of genes involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis of Universite it Leiden. 2007.

SOCCOL, C. R. VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.,KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK,L. M. F.; FERRARA, M. A. BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P. , ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, v.101, p.4820–4825, 2010.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; COSTA, B.; WOICIECHOWSKI, A.L.; CARVALHO, J.C. MEDEIROS, A.B.P.; FRANCISCO, A.M.;BONOMI, L.J. Brazilian biofuel program: an overview. *Journal Of Scientific and Industrial Research*, v.64, p.897–904, 2005.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 145, p. 301–307, 1996.

STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, p.151–159, 1999.

STOUTENBURG, R. M.; PERROTTA, J. A.; NAKAS, J. P. Overcoming inhibitors in a hemicellulosic hydrolysate: improving fermentability by feedstock detoxification and adaptation of *Pichia stipitis*. *Journal Industrial Microbiology. Biotechnology Society for Industrial Microbiology*, 2011.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, A.C.M. Transformação genética em espécies florestais. *Ciência Florestal*, v.13, n.1, p.167-178, 2003.

SWINGS, J; DE LEY. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, v. 41, p. 1-46, 1977.

TAHERZADEH, M. J. Ethanol from Lignocellulose: Physiological Effects of Inhibitors and Fermentation Strategies. Chalmers University of Technology. Department of Chemical Reaction Engineering. Thesis For The Degree of Doctor of Philosophy. Sweden, 1999.

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C. ; LIDÉN, G. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ? Chemical Engineering Science, v. 52, N°. 15, p. 2653-2659, 1997.

TIAN, S.; ZHU, J.; YANG, X.; Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. Applied Energy v.88 p.1792–1796, 2011.

TIAN, S; ZHOU, G; YAN, F; YU, Y.; YANG, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. Biotechnology Advances v.27, p. 656–660, 2009.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI R. MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA: Uma prospectiva. Novos estudos. 79, NOVEMBRO 2007.

TOMA, M.M., KALNENIEKS, U. BERZINS, A., VIGANTS, A., RIKMANIS, M., VIESTURS, U., 2003, “The Effect of Mixing on Glucose Fermentation by *Zymomonas mobilis* Continuous Culture”, Process Biochemistry, v. 38, pp. 1347-

ÚNICA (União da indústria de cana-de açúcar). <http://english.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=%7BB6F7067D-DF2A-4CFD-B1A2-8FFAA32E6D60%7D>. Acesso online em 28.09.2011.

UNICA (União da indústria de cana-de-açúcar). Produção e uso do etanol combustível no Brasil.2007.

VIKARI, L.; KORHOLA, M. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 24, n. 6, p. 471–476, 1986.

VILLARREAL, M. L. M.; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p.17–24, 2006.

X.Q. Zhao, F.W. Bai. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. Journal of Biotechnology, v.144, p.23–30, 2009.

YANG, S., PAPPAS, K. M., HAUSER, L. J., LAND, M. L., CHEN, G.-L., HURST, G. B., PAN, C.; KOUVELIS, V. N.; TYPAS, M. A.; PELLETIER, D. A.; KLINGEMAN, D. M.; CHANG, Y. J.; SAMATOVA, N. F.; BROWN, S. D. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. Nature Biotechnology, v. 27, p. 893–894, 2009.

YANG, S.; LAND, M. L.; KLINGEMAN, D. M.; PELLETIER, D. A.; LU, T. Y.; MARTIN, S. L.; GUO, H. B.; SMITH, J. C.; BROWN, S. D. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 23, p. 10395-400, 2010.

YANG, S.; PELLETIER, D. A.; LU, T.-Y.; BROWN, S. D. The *Zymomonas mobilis* regulator Hfq and related *Saccharomyces cerevisiae* proteins contribute to tolerance

against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors, *BMC Microbiology*, v. 10, n. 135, p. 1-11, 2010.

YANG, SHANG-TIAN.; LIU, X.; ZHANG,Y. Chapter 4. Metabolic Engineering – Applications, Methods, and Challenges. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. 2007.

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

ZHANG, J.; ZHU,Z.; WANG, X.; WANG, N.; WANG, W.; BAO, JIE. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, v.26, 2010.

ZHANG, M., EDDY, C., DEANDA, K., FINKESTEIN, M.; PICATAGGIO, S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, v. 267, p. 240–243, 1995.