



UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ**

Tese de Doutorado

**Produção de ácido xilônico por fermentação
utilizando a cepa P1HL2 da *Komagataella phaffii*
modificada geneticamente**

Isabela Castro de Almeida

**Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.
Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.**

Brasília
2025



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

**Produção de ácido xilônico por fermentação
utilizando a cepa P1HL2 da *Komagataella phaffii*
modificada geneticamente**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Química.

Isabela Castro de Almeida

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

Coorientadora: Dra. Sílvia Belém Gonçalves, D.Sc.

Brasília

2025

DEDICATÓRIA

*À minha família, por sempre estar ao meu lado.
Aos meus orientadores, por todo apoio e confiança transmitidos.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar, fortalecer e sustentar nos momentos difíceis.

À minha filha Olívia, que nasceu durante o desenvolvimento deste trabalho, trazendo luz e renovando minha força a cada dia. A ela dedico todo o meu esforço, pois ela é minha maior alegria.

Ao meu esposo, Arilson Onésio Ferreira Filho, meu incentivador, cuja paciência e compreensão foram fundamentais para a conclusão deste doutorado. Sou grata por seu apoio incondicional e por celebrar comigo cada conquista.

À minha mãe, Márcia, e à minha irmã, Natália, que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida. Vocês são minha base e meu porto seguro. Mãe, obrigada por me erguer quando precisei e por me mostrar que, com dedicação, posso alcançar todos os meus objetivos. Natália, obrigada por valorizar os momentos simples e por sempre me fazer sorrir com seu jeito único, que me inspira diariamente.

Ao meu pai, Manoel, por me mostrar, que as dificuldades existem para serem superadas e que cada tropeço é uma oportunidade de crescimento e fortalecimento.

À minha avó Christina, que em vida me ensinou que o amor é a base de toda família. Sua ausência é profundamente sentida, mas levo comigo a certeza de que estaria orgulhosa desta conquista. Te amarei para sempre, vó.

Aos meus amigos e amigas, em especial a Rayssa Jericó, Fernanda Scheiner, Renata Cassé, Yndhira e Mayara, minhas melhores amigas. Sou grata por cada conversa, cada conselhos, e até pelos puxões de orelha quando necessários.

Ao meu orientador, Fabricio Machado, e à minha coorientadora, Sílvia Belém, pela confiança no meu trabalho, pela paciência ao longo desses anos e pelas inúmeras contribuições à redação desta tese. Sou profundamente grata pelos aprendizados que enriqueceram minha formação acadêmica e científica.

Agradeço aos membros do Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB) da Embrapa Agroenergia, em especial à querida amiga Raissa Gabriela, por todo apoio e colaboração que tornaram possível este estudo.

À Universidade de Brasília e à Unidade Embrapa Agroenergia, pela oportunidade e infraestrutura disponibilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, por fomentar minha pesquisa com bolsa que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

O ácido xilônico é um composto orgânico derivado da oxidação da xilose, um açúcar de cinco carbonos abundante em biomassas lignocelulósicas. Classificado entre os 30 principais produtos químicos de valor agregado oriundos de biomassa, apresenta aplicações relevantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química. A conversão biológica da xilose em ácido xilônico, catalisada pela enzima xilose desidrogenase, destaca-se por ser um processo seguro, ambientalmente sustentável e conduzido em condições moderadas de reação. Neste trabalho, avaliou-se a produção de ácido xilônico utilizando uma linhagem recombinante de *Komagataella phaffii* (P1HL2), iniciando-se pela seleção da fonte de carbono para o crescimento celular. O glicerol demonstrou melhor desempenho que a glicose, favorecendo maior crescimento e rendimento. A razão ótima entre os substratos glicerol:xilose foi determinada como 1:4, resultando em produção de $43,30 \pm 0,62$ g/L e produtividade de $0,45 \pm 0,01$ g ácido xilônico/L·h em sistema de batelada. Em etapa posterior, utilizou-se o sistema de batelada alimentada em biorreator com controle de pH (5,5), temperatura (30 °C) e fluxo de ar (0,800 L/min), obtendo-se $55,01 \pm 2,36$ g/L de ácido xilônico. Visando maior sustentabilidade, investigou-se o uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de carbono. A condição com 10% (v/v) de hidrolisado não detoxificado resultou em produção de 42,30 g/L e produtividade de 0,44 g ácido xilônico/L·h, evidenciando sua viabilidade técnica. Por fim, avaliou-se a recuperação e purificação do ácido xilônico produzido, por meio de dois métodos: troca iônica utilizando a resina Amberlite IRA-67 Cl⁻ e precipitação com etanol. Na purificação com EtOH, foram investigados parâmetros como a etapa de clarificação com carvão ativado, a razão etanol:concentrado de ácido xilônico e a concentração inicial do ácido no fermentado. A maior pureza ($74,38 \pm 7,77\%$) e recuperação ($91,90 \pm 13,99\%$) foram obtidas sem clarificação, com razão 3:1 (v/v) de etanol e maior concentração inicial do produto. Os resultados demonstram o potencial da plataforma biotecnológica desenvolvida para a produção sustentável de ácido xilônico em larga escala.

Palavras chaves: Fermentação. Ácido xilônico. *Komagataella phaffii*. Xilose. P1HL2. Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Xylonic acid is an organic compound derived from the oxidation of xylose, a five-carbon sugar abundantly found in lignocellulosic biomass. Recognized among the top 30 value-added chemicals obtainable from biomass, xylonic acid holds significant potential for applications in the food, pharmaceutical, and chemical industries. The biological conversion of xylose to xylonic acid, catalyzed by the enzyme xylose dehydrogenase, stands out as a safe and environmentally sustainable process, conducted under mild reaction conditions. In this study, we investigated the production of xylonic acid using a recombinant strain of *Komagataella phaffii* (P1HL2), beginning with the selection of a suitable carbon source for cell growth. Glycerol outperformed glucose, supporting higher biomass accumulation and acid yields. The optimal glycerol-to-xylose ratio was determined to be 1:4, resulting in a xylonic acid concentration of 43.30 ± 0.62 g/L and a productivity of 0.45 ± 0.01 g/L·h in batch cultivation. Subsequently, a fed-batch strategy was implemented in a bioreactor under controlled conditions (pH 5.5, 30 °C, and 0.800 L/min aeration), achieving a final titer of 55.01 ± 2.36 g/L. To enhance the process's sustainability, sugarcane bagasse hydrolysate was evaluated as an alternative carbon source. When using 10% (v/v) of non-detoxified hydrolysate, xylonic acid production reached 42.30 g/L, with a productivity of 0.44 g/L·h, demonstrating the technical feasibility of this feedstock. Finally, two downstream processing methods were assessed for xylonic acid recovery and purification: ion-exchange chromatography using Amberlite IRA-67 Cl⁻ resin and ethanol precipitation. In the ethanol-based method, key parameters such as the inclusion of a clarification step with activated carbon, the ethanol-to-xylonic acid concentrate ratio, and the initial acid concentration were systematically evaluated. The highest purity ($74.38 \pm 7.77\%$) and recovery yield ($91.90 \pm 13.99\%$) were achieved without clarification, using a 3:1 (v/v) ethanol-to-concentrate ratio and a higher initial product concentration. These findings underscore the potential of the developed biotechnological platform for the sustainable, large-scale production of xylonic acid.

Keywords: Fermentation. Xylonic acid. *Komagataella phaffii*. Xylose. P1HL2. Sugarcane bagasse hydrolysate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	4
3.2 BIOREFINARIAS.....	7
3.3 XILOSE EM BIOPROCESSOS	10
3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS	12
3.4.1 Ácido Glucônico	13
3.4.2 Ácido Cítrico	14
3.4.3 Ácido Lático	15
3.4.4 Ácido Succínico.....	16
3.5 ÁCIDO XILÔNICO	17
3.5.1 Produção pela rota química.....	17
3.5.2 Produção pela rota biológica - Fermentação.....	19
3.6 <i>KOMAGATAELLA PHAFFII</i>	23
3.7 PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO XILÔNICO	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 MATERIAIS	28
4.1.1 Microrganismo.....	28
4.1.2 Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	28
4.1.3 Equipamentos.....	28
4.1.4 Meios e Soluções	29
4.1.4.1 Preparo de Soluções de Eritrosina	29
4.1.4.2 Solução tampão ftalato de potássio.....	30
4.1.4.3 Meio de Cultura YPD/YPG.....	30
4.1.4.4 Meio de Cultura Líquido YP2X.....	30
4.1.4.5 Meio mineral para fermentações em biorreator com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (Meio mínimo).....	30
4.2. MÉTODOS.....	32
4.2.1 Preparo do inóculo da Linhagem recombinante de <i>Komagataella phaffii</i> no meio de cultura rico	32
4.2.2 Determinação peso seco da linhagem P1HL2 de <i>K. Phaffii</i>	33
4.2.3 Determinação da viabilidade celular	34
4.2.3.1 Contagem de Células Viáveis de Leveduras	34
4.2.4 Estudo da fonte de carbono disponível para crescimento celular durante o processo fermentativo em batelada.....	35
4.2.5 Estudo da fonte de carbono disponível para crescimento celular durante o processo fermentativo em batelada alimentada	35
4.2.6 Estudo da razão dos substratos glicerol/xilose durante o processo fermentativo.....	36
4.2.7 Avaliação da produção de ácido xilônico pela levedura P1HL2, com controle de pH e fluxo constante de ar comprimido na fermentação	37

4.2.8 Estudo do uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em fermentações com a linhagem recombinante P1HL2.....	38
4.2.9.2 Método de Precipitação com Etanol	41
4.2.9.3 Avaliação da razão EtOH e quantidade ácido xilônico que deve ser empregado na etapa de precipitação para purificação do ácido xilônico	43
4.2.9.4 Avaliação da concentração de ácido xilônico para o processo de purificação	43
4.2.10. Cálculo dos Parâmetros de Desempenho Fermentativo e de Purificação	43
4.2.11 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	44
4.2.12 Análise de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1 AVALIAÇÃO DA GLICOSE E DO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO PARA CRESCIMENTO CELULAR DURANTE A FERMENTAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO	47
5.1.1 Fermentação em batelada.....	47
5.1.2 Fermentação em batelada alimentada com a linhagem recombinante com P1HL2	51
5.2 AVALIAÇÃO DA RAZÃO ENTRE AS FONTES DE CARBONO GLICEROL, PARA O CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO, E XILOSE, PARA A PRODUÇÃO DO ÁCIDO XILÔNICO	56
5.3 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR COM A LINHAGEM P1HL2: BATELADA ALIMENTADA SOB CONTROLE DE PH E AERAÇÃO CONTÍNUA	62
5.4 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR COM USO DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE COMPLEMENTAR DE XILOSE: EFEITOS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO XILÔNICO	65
5.5 PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO XILÔNICO OBTIDO APÓS FERMENTAÇÃO COM A LINHAGEM RECOMBINANTE P1HL2 DA LEVEDURA <i>K. PHAFFII</i>	72
6. CONCLUSÕES.....	80
7 – REFERÊNCIAS	82
ANEXO	90
RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NO CORPO ORIGINAL DA TESE	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais constituintes da biomassa lignocelulósica (Fonte: Reshmy, et al, 2021). ⁴	4
Figura 2. a) Estrutura química do monômero de glicose presente na celulose; b) Estrutura química dos álcoois coniferílico, sinapílico e cumarílico presentes na lignina, c) Estrutura química das pentoses e hexoses presentes na hemicelulose.	7
Figura 3. Fluxograma geral de uma biorefinaria (Adaptada). ²³	8
Figura 4. Fórmula estrutural da xilose e de alguns compostos que podem ser obtidos a partir do seu uso como substrato.	11
Figura 5. Fórmula estrutural dos principais ácidos orgânicos obtidos por processo microbiano.....	13
Figura 6. Rota química de produção do ácido xilônico utilizando eletrodos de ouro (a) e platina (b), em meio alcalino (Adaptada) ⁴⁰	19
Figura 7. Rota microbiana de produção de ácido xilônico utilizando D-xilose e a enzima xilose desidrogenase (Adaptada) ⁵	20
Figura 8. Placa de Petri após crescimento celular da linhagem P1HL2 de <i>K. phaffii</i>	32
Figura 9. Gráfico de correlação de Peso Seco da linhagem recombinante P1HL2 com a densidade ótica.	34
Figura 10. Fermentação em frasco Erlenmeyer de 250 mL, conduzida em shaker orbital, com a linhagem recombinante P1HL2, variando-se a proporção dos substratos glicerol/xilose.....	35
Figura 11. Fermentação em batelada alimentada com linhagem recombinante P1HL2, em frascos aletados Erlenmeyer de 250 mL, conduzida em Shaker orbital.	36
Figura 12. Sistema de Fermentação Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock, utilizado para as fermentações em batelada alimentada com a linhagem recombinante P1HL2.	38
Figura 13. Bioreator Infors HT, modelo Multifors 2, utilizado para as fermentações com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.	39
Figura 14. Procedimento de purificação do ácido xilônico por troca iônica com resina Amberlite IRA-67 Cl ⁻	40
Figura 15. Adaptação do procedimento para purificação do ácido xilônico por precipitação com EtOH, segundo Buchert <i>et al.</i> ⁷²	42

- Figura 16.** Equipamento *UHPLC* utilizado para quantificação dos substratos (xilose, glicerol/glicose) e do produto das fermentações (ácido xilônico). . 46
- Figura 17.** Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 96 h de fermentação com glicerol como fonte de carbono, bem como os perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicerol (+), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●). 47
- Figura 18.** Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 96 h de fermentação com glicose como fonte de carbono, perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicose (▲), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●). 48
- Figura 19.** Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 190 h de fermentação com glicerol como fonte de carbono, bem como os perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicerol (+), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●). 51
- Figura 20.** Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 190 h de fermentação com glicose como fonte de carbono, bem como os perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicose (▲), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●). 53
- Figura 21.** Perfis de viabilidade (●) e concentração celular (■) da levedura P1HL2, durante as fermentações com diferentes razões dos substratos glicerol/xilose. 56
- Figura 22.** Perfis de concentração de xilose (■) e glicerol (●) durante as fermentações com a levedura P1HL2, em diferentes razões dos substratos glicerol/xilose. 57
- Figura 23.** Concentração de ácido xilônico durante as fermentações com a levedura P1HL2, em diferentes razões dos substratos glicerol/xilose. 59
- Figura 24.** Perfil de fermentações em biorreator utilizando sistema de batelada alimentada. Monitoramento das concentrações de xilose (■), glicerol (+), ácido xilônico (◆), concentração celular (●) e viabilidade da levedura P1HL2 (x) ao longo do tempo. 63
- Figura 25.** Perfis de concentração de xilose (■) e glicerol (●) durante fermentações controle (branco) e em meios contendo 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. 67

- Figura 26.** Perfil de concentração de ácido xilônico durante as fermentações realizadas em meio mínimo (branco) e em meios contendo 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar..... 68
- Figura 27.** Perfil de viabilidade (•) e concentração celular (■) durante as fermentações realizadas em meio mínimo (branco) e em meios contendo 10%, 20% e 30% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar 69
- Figura 28.** Curva obtida na etapa de eluição do ácido xilônico com NH_4HCO_3 73
- Figura 29.** Etapas do processo de purificação do ácido xilônico obtido após a fermentação: (a) evaporação da água e concentração dos compostos no fermentado; (b) produto fermentativo após evaporação em banho-maria; (c) filtração a vácuo após adição de carvão ativado; (d) precipitação do ácido xilônico com EtOH (3:1 v/v); (e) separação entre sobrenadante e precipitado; (f) secagem do precipitado a vácuo por liofilização..... 75
- Figura 30.** Cromatogramas obtidos por *UHPLC* utilizados para a quantificação do ácido xilônico (g/L) após os ensaios de purificação. A: amostra submetida à etapa de clarificação com carvão ativado; B: amostra sem clarificação. 76
- Figura 31.** Gráfico com a porcentagem de pureza obtidos com as os concentrados de ácido xilônico 279,80 g/L e 447,80 g/L..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina em alguns tipos biomassas (adaptada) ⁴	5
Tabela 2: Produtos de reação e porcentagem de conversão de d-xilose, utilizando eletrodos de platina e ouro (adaptada) ⁴⁰	18
Tabela 3: Produção de ácido d-xilônico a partir de d-xilose por alguns microrganismos (adaptada) ⁵⁴	21
Tabela 4: Produção de ácido d-xilônico a partir de d-xilose por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> (adaptada) ⁹	24
Tabela 5: Produção de ácido d-xilônico por linhagens recombinantes de <i>K. phaffii</i> usando hidrolisado lignocelulósico como substrato (adaptada) ¹⁰ ...	25
Tabela 6: Fermentações realizadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL com as diferentes proporções dos substratos glicerol: xilose.....	37
Tabela 7: Parâmetros obtidos após fermentações com glicose e fermentações com glicerol.	49
Tabela 8: Parâmetros obtidos após fermentações, em batelada alimentada, com glicose e com glicerol.....	54
Tabela 9: Parâmetros obtidos após fermentações com diferentes razões dos substratos glicerol/xilose.....	61
Tabela 10: Parâmetros obtidos após fermentações em biorreator, adotando sistema de batelada alimentada.	63
Tabela 11: Concentração de xilose, glicose e ácido acético presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.	66
Tabela 12: Parâmetros obtidos após fermentações com 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e fermentação controle.....	70
Tabela 13: Concentrações de glicerol, xilose e ácido xilônico antes da purificação, e percentuais de pureza e recuperação do ácido xilônico após os ensaios de purificação.	74
Tabela 14: Testes realizados para a purificação do ácido xilônico obtido via fermentação com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.....	77
Tabela 15: Percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico a partir de triplicatas experimentais com concentrados iniciais de 279,80 g/L e 447,80 g/L	Erro! Indicador não definido.8

Tabela 16: Percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico a partir de triplicatas experimentais com concentrado inicial de 136,35 g/LErro! Indicador não definido.

Tabela 17: Percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico a partir de triplicatas experimentais com concentrado inicial de 309,38 g/LErro! Indicador não definido.

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIações

°C	Graus Celsius
ABS	Absorbância
Ác. Xilônico	Ácido Xilônico
AIE	Agência Internacional de Energia
<i>A. succiniciproducens</i>	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacillus fragilis</i>
<i>B. succiniciproducens</i>	<i>Basfia succiniciproducens</i>
C5	Pentose - Açúcar de cinco carbonos
C6	Hexose - Açúcar de seis carbonos
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
DD	Diálise por Difusão
DO	Densidade ótica
ED	Eletrodiálise convencional
EDBM	Eletrodiálise com processos de membranas bipolares
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
EtOH	Etanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de ferro heptahidratado
g	Gramas
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>H. marismortui</i>	<i>Haloarcula marismortui</i>
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio Dibásico
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i>
Kg	Quilogramas
M	Molar
<i>M. succiniciproducens</i>	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>
mL	Mililitros
μL	Microlitros
MeOH	Metanol
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de Amônio
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de Amônio
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
OD%	Oxigênio dissolvido
<i>P. funiculosum</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>P. ovalis</i>	<i>Pseudomonas ovalis</i>
<i>P. sacchari</i>	<i>Pseudomonas sacchari</i>
PNNL	<i>Pacific Northwest National Laboratory</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>T. reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão
XDH	Xilose desidrogenase
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Y _{P/S}	Fator de conversão de substrato em produto
YPD	Meio para cultivo microbiano, composto por extrato de levedura, peptona bacteriológica e glicose
YPG	Meio para cultivo microbiano, composto por extrato de levedura, peptona bacteriológica e glicerol

1. INTRODUÇÃO

As preocupações com as mudanças climáticas e a poluição ambiental resultante do refino de petróleo fizeram com que o interesse pela utilização de matérias-primas renováveis na produção de combustíveis e de químicos de base biológica aumentasse ao longo dos anos.¹ Nesse cenário, a utilização de biomassa lignocelulósica se apresenta como uma fonte renovável bastante promissora e muito abundante. Sua utilização como matéria-prima pode ser direta ou indireta para a produção de bioprodutos ou de moléculas de interesse por meio de tratamentos químicos, físicos, microbianos ou enzimáticos, com aplicações nos setores de alimentos, energia, saúde, materiais e na indústria química.² Até o momento, já foram desenvolvidos mais de 200 compostos com potencial de mercado a partir da biomassa lignocelulósica, por meio de diversas técnicas de tratamento.³

Estudos mostram que anualmente são produzidos mais de 181,5 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica no mundo. Deste total, cerca de 8,2 bilhões de toneladas de biomassa são utilizadas. Tradicionalmente, a principal aplicação dessa biomassa tem sido voltada para finalidades como geração de calor, preparo de alimentos, produção de materiais de construção e uso na indústria de papel e celulose. Entretanto, no campo das pesquisas o foco tem sido a produção de biocombustíveis renováveis e outros bioprodutos de valor agregado. A biomassa utilizada é proveniente, em sua maior parte, de florestas, da agricultura e pastagens, correspondendo aproximadamente a 7 bilhões de toneladas, e 1,2 bilhão de toneladas oriundos de resíduos agrícolas.³

A biomassa lignocelulósica é formada pela macromolécula de lignina e por polímeros de carboidratos, com cinco (pentoses) ou seis (hexoses) carbonos. As hexoses podem ser usadas na produção de etanol e de ácidos orgânicos. As pentoses, por sua vez, podem ser usadas na produção de ácidos orgânicos com diferentes aplicações industriais, agregando valor à cadeia de produção de etanol.⁴

O interesse por ácidos orgânicos derivados de açúcares tem aumentado nos últimos anos, uma vez que eles possuem um grande potencial como produtos químicos e, podem ser utilizados como precursores na fabricação de plásticos derivados de

biomassa.⁵ Além disso, a produção de ácidos orgânicos via fermentação microbiana tem sido tradicionalmente utilizada na indústria de alimentos. Com o aumento no interesse do desenvolvimento de bioprocessos mais sustentáveis, o mercado de produção microbiana de ácidos orgânicos foi expandido ainda mais, uma vez que os ácidos orgânicos estão entre os principais componentes químicos que podem ser produzidos a partir de recursos renováveis.⁶

Entre os diversos ácidos orgânicos existentes, o ácido xilônico é um ácido de cinco carbonos, produzido a partir da xilose, e que apresenta muitas aplicações industriais, podendo ser utilizado como substituto do ácido glucônico nas indústrias alimentícias, química e farmacêutica.⁵ O ácido xilônico pode ser obtido por métodos químicos/eletroquímicos e por métodos enzimáticos. Entretanto, a biotransformação microbiana tem mostrado ser o método mais econômico e ecológico.⁷ Sua produção via fermentação pode ser feita por alguns tipos de bactérias, leveduras e fungos e ocorre por meio da enzima xilose desidrogenase. Entretanto, sua produção em escala industrial ainda não ocorre devido a demandas específicas de crescimento celular, principalmente para bactérias.⁵ Em escala laboratorial, linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii* já foram utilizadas na produção desse ácido.^{5,8} Mais recentemente, linhagens da levedura *Komagataella phaffii* foram geneticamente modificadas para serem capazes de produzir ácido xilônico a partir da xilose. A levedura *Komagataella phaffii* foi escolhida pelos autores por apresentar tolerância a baixos pHs, além de alcançar altas densidades celulares, além da facilidade de manipulação genética.⁹

Neste trabalho, a linhagem recombinante P1HL2 de *Komagataella phaffii* foi inicialmente empregada em fermentações em batelada e batelada alimentada, conduzidas em shaker orbital e frascos Erlenmeyer, para produção de ácido xilônico. Avaliaram-se parâmetros reacionais como tempo de fermentação, substrato para crescimento celular (glicerol ou glicose), razão inicial xilose/glicerol e meio fermentativo. Em seguida, as fermentações foram realizadas em biorreator de 1 L, com controle aprimorado de pH, agitação, temperatura e oxigênio dissolvido. Também foram testadas diferentes porcentagens de hidrolisado de bagaço de cana visando à produção de ácido xilônico a partir de biomassa lignocelulósica. Por fim, iniciou-se o estudo da purificação do ácido xilônico obtido por fermentação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de ácido xilônico com a linhagem recombinante P1HL2 de *K. phaffii*, em fermentações realizadas em Erlenmeyer e em biorreator. Também, realizar ensaios de purificação do ácido xilônico para que ele possa seja empregado como matéria-prima para síntese de novos polímeros.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da glicose e do glicerol como fonte de carbono para o crescimento celular e avaliar a influência deste crescimento na produção de ácido xilônico.
- Avaliar a razão dos substratos glicerol e xilose na produção do ácido xilônico em fermentações.
- Avaliar a utilização de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como matéria prima na produção de ácido xilônico em complemento a xilose comercial.
- Realizar ensaios de purificação do ácido xilônico obtido nas fermentações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é uma matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo, que contém altas quantidades de açúcares, os quais podem ser processados para produção sustentável de biocombustíveis e de compostos de origem biológica.³ Nesse contexto, a obtenção de produtos químicos renováveis a partir da biomassa lignocelulósica é considerada uma alternativa ao refino de petróleo.¹

Os resíduos florestais, resíduos agrícolas e resíduos industriais são as principais fontes de biomassa lignocelulósica.¹⁰ Estima-se que cerca de $1,8 \times 10^{11}$ toneladas de biomassas residuais são produzidas a cada ano no mundo, e uma grande quantidade de lignocelulose é descartada como lixo.³ Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 90% da palha de milho é descartada nos campos. Portanto, a utilização e aproveitamento de biomassas lignocelulósicas na produção de químicos de interesse é um caminho promissor e que tem ganhado destaque com o passar dos anos.¹¹

A biomassa lignocelulósica é formada por três componentes principais, sendo dois deles polímeros de carboidratos, celulose (40 - 50%) e hemicelulose (20 - 30%), e o terceiro corresponde a macromolécula de lignina (10 - 25%).^{4,10} Além desses componentes majoritários, a biomassa lignocelulósica também apresenta pequenas quantidades de pectina, proteína e extrativos, incluindo ceras de açúcares não estruturais e clorofila.^{12,13} Alcaloides, polifenóis e alguns metais também estão presentes em baixíssimas quantidades.⁴ A representação estrutural dos três principais constituintes da biomassa lignocelulósica é mostrada na Figura 1.

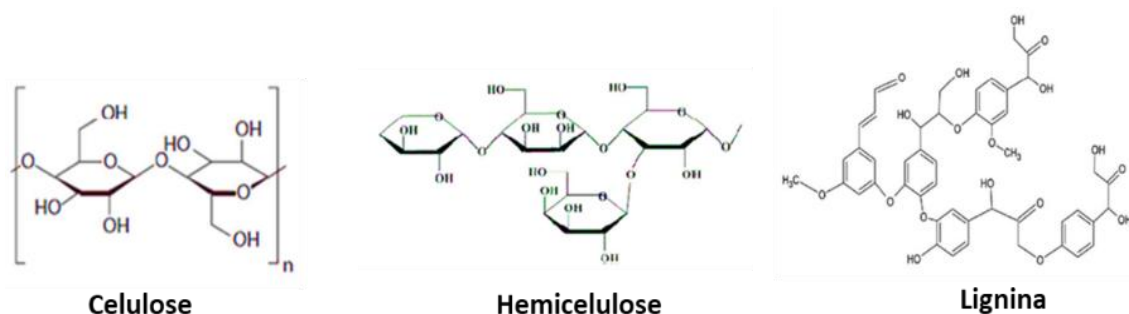


Figura 1. Principais constituintes da biomassa lignocelulósica (Fonte: Reshmy, et al, 2021).⁴

A quantidade de celulose, hemicelulose e lignina presente na parede celular varia de acordo com cada planta (Tabela 1) e cada um desses componentes apresenta características distintas.¹⁴ No caso do bagaço de cana-de-açúcar, sua constituição

típica inclui aproximadamente 44% de celulose, 28% de hemicelulose, 21% de lignina, além de 5% de cinzas e 2% de extrativos. Devido à sua estrutura lignocelulósica recalcitrante, o bagaço requer uma etapa de pré-tratamento fundamental para a desorganização da matriz polimérica e posterior liberação de açúcares fermentáveis, possibilitando sua conversão em produtos de alto valor agregado. Ressalta-se, ainda, que o aproveitamento do bagaço é altamente promissor, considerando-se que a produção mundial de cana-de-açúcar ultrapassa 1,6 bilhão de toneladas anuais, resultando em cerca de 279 milhões de toneladas métricas de bagaço como subproduto.^{1,3}

Tabela 1: Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina em alguns tipos biomassas (adaptada)⁴.

Biomassa Lignocelulósica	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Referências
Cana-de-açúcar (Bagaço)	21	28	44	Ashokkumar <i>et al.</i> (2022) ³
Sorgo doce (Bagaço)	14 - 21	18 - 27	34 - 45	Saini <i>et al.</i> (2015) ¹⁵
Palha de arroz	17 - 19	23 - 25	29 - 34	Brylev <i>et al.</i> (2001) ¹⁶
Palha de trigo	17 - 19	26 - 32	33 - 38	Rabemanolontsoa and Saka (2013) ¹⁷
Farelo de trigo	8 - 12	35 - 39	10 - 14	Miron <i>et al.</i> (2001) ¹⁸
Palha de cevada	14 - 19	27 - 38	31 - 45	Saini <i>et al.</i> (2015) ¹⁵

A celulose, principal polissacarídeo presente na parede celular das plantas, é o biopolímero mais abundante na natureza, sendo o componente majoritário da fração lignocelulósica da biomassa na maioria dos materiais vegetais.¹⁴ Estruturalmente, é um homopolímero linear formado por unidades de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, apresentando fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$.^{12,15} Cada unidade anidroglicosídica possui três grupos hidroxila, que conferem alta reatividade química e permitem a formação de múltiplas ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. Essas interações são determinantes para a organização estrutural da celulose, onde as ligações de hidrogênio intramoleculares promovem a linearidade das cadeias poliméricas, enquanto as ligações intermoleculares entre cadeias adjacentes são responsáveis pelas regiões cristalinas e amorfas da microfibrila celulósica. Essa estrutura altamente ordenada é um dos principais fatores que contribuem para a resistência e insolubilidade da celulose em condições naturais.⁴

A hemicelulose é um heteropolímero de estrutura amorfa, composto por pentoses (açúcares com 5 carbonos), hexoses (açúcares com 6 carbonos) e ácidos. Entre as pentoses, estão presentes na hemicelulose a D-xilose, a L-ramnose e a L-arabinose, enquanto entre as hexoses têm-se a D-galactose, D-manose e D-glucose. Os ácidos presentes na hemicelulose são os ácido 4-O-metil-D-glucurônico e galacturônico.¹³ Devido à presença de ramificações em sua cadeia, baixo grau de polimerização e grupos acetila, a hemicelulose não forma estruturas cristalinas, o que a torna termodinamicamente instável e mais suscetível à hidrólise química, especialmente sob ataque ácido. Funcionalmente, a hemicelulose exerce papel estrutural relevante na matriz da parede celular vegetal, atuando como um componente de ligação entre a celulose e a lignina. Essa interação contribui para a formação de uma rede tridimensional coesa, conferindo maior rigidez e integridade à estrutura da parede celular.⁴ As fórmulas estruturais dos principais monossacarídeos derivados da hemicelulose (pentoses e hexoses) estão representadas na Figura 2c.

A lignina é uma macromolécula de estrutura tridimensional altamente reticulada, composta por unidades derivadas do fenilpropano.¹² Trata-se do principal componente não carboidrato da biomassa lignocelulósica, sendo classificada como um polímero amorfo e heterogêneo, formado por monômeros aromáticos derivados de compostos propanoides, incluindo estruturas p-hidroxifenil e o-metoxiladas. Seus três principais precursores monoméricos são os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Essas unidades conferem rigidez, resistência mecânica e impermeabilidade às paredes celulares de tecidos vegetais lignificados (Figura 2b). A composição da lignina varia significativamente em função da origem botânica da biomassa, refletindo-se na proporção relativa das diferentes unidades monoméricas.⁴ Na matriz lignocelulósica, a lignina estabelece ligações covalentes com os carboidratos, predominantemente do tipo éster e éter, o que contribui para a complexidade estrutural do material vegetal e representa um dos principais desafios na etapa de fracionamento da biomassa para fins biotecnológicos e industriais.¹⁹

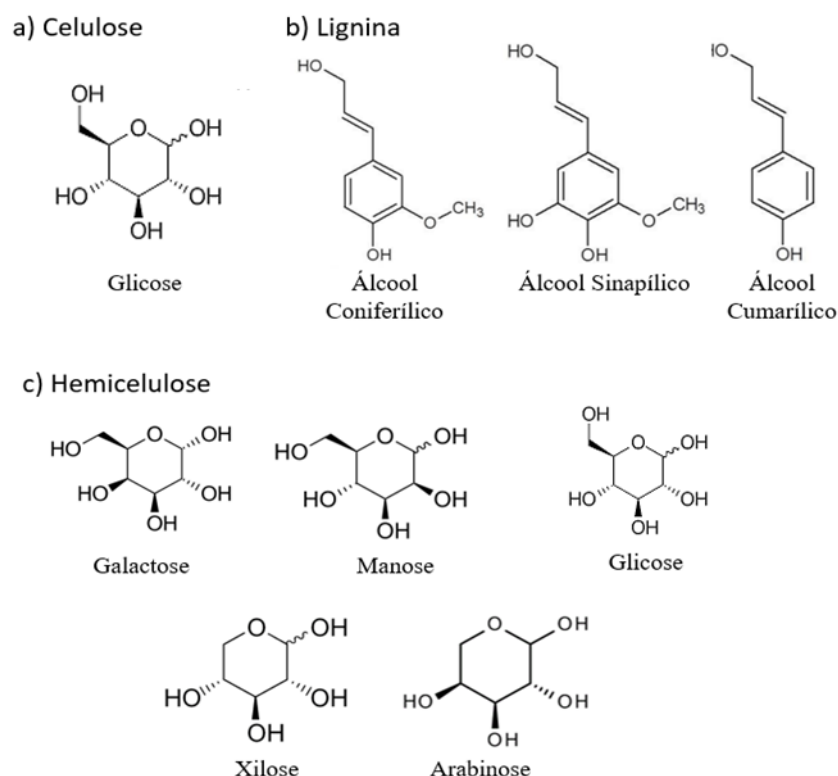


Figura 2. a) Estrutura química do monômero de glicose presente na celulose; b) Estrutura química dos álcoois coniferílico, sinapílico e cumarílico presentes na lignina, c) Estrutura química das pentoses e hexoses presentes na hemicelulose.

A composição e a concentração dos açúcares presentes na biomassa variam conforme sua origem vegetal. Entre os monossacarídeos, a glicose, uma hexose, é o açúcar mais abundante na natureza. No grupo das pentoses, a xilose destaca-se como o açúcar mais prevalente, podendo representar até 30% do total de açúcares em determinados resíduos agroindustriais, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar.²⁰

3.2 BIOREFINARIAS

De acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA), o conceito de biorefinaria está associado ao processamento sustentável de biomassa, levando à obtenção de produtos de base biológica comercializáveis, como produtos químicos e materiais, bem como de bioenergia, seja na obtenção de combustíveis, energia ou calor.^{21,22} Vale destacar que uma grande variedade de componentes químicos pode ser produzida a partir do uso de biomassa como matéria-prima.²³

As biorefinarias que utilizam matérias-primas de biomassa comestível são chamadas primeira geração e estão bem estabelecidas. Entretanto, o debate em se utilizar alimentos para produção de combustível deu origem às biorefinarias de segunda

geração, que empregam como matérias-primas biomassas não comestíveis e resíduos lignocelulósicos. Nas últimas duas décadas, ocorreu um aumento significativo na quantidade de pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de bioprocessos baseados em resíduos agroindustriais.²⁴

Os principais produtos que vêm à mente ao falar de biorefinarias são biocombustíveis líquidos. Entretanto, a produção de produtos químicos obtidos por meio de processos de biorrefino é considerada mais sustentável do que a produção de biocombustíveis. Os produtos químicos de plataforma não correspondem ao produto final, sendo considerados químicos intermediários, que são usados em processos subsequentes, para obtenção de materiais com valor de mercado, como plásticos, fibras e aditivos.²³

Com isso, as biorefinarias podem ser classificadas de acordo com a matéria-prima, com a plataforma e com os processos empregados. Outra classificação é de acordo com o produto obtido ao final de todo o bioprocessos. Elas podem ser produtoras de energia ou produtora de materiais.²¹

A matéria-prima pode ser gramínea, culturas ricas em amido, como trigo e milho, culturas de açúcar, como cana de açúcar e beterraba, cultura e resíduos lignocelulósicos, resíduos orgânicos, oleaginosas e biomassa aquática, como algas.²¹

De maneira geral, as biorefinarias operam de maneira similar, como o fracionamento de componentes da biomassa e sua utilização ou transformação no produto desejado. Como vários tipos de biomassas podem ser utilizadas, algumas tecnologias e processos específicos podem ser necessários, de acordo com a matéria-prima e com o produto final.²¹

A Figura 3 representa o fluxograma das etapas que ocorrem em uma biorefinaria. A biomassa é utilizada como matéria-prima e submetida às etapas de pré-tratamento, conversão e processamento, até a obtenção do produto de biorefinaria.



Figura 3. Fluxograma geral de uma biorefinaria (Adaptada).²³

Alguns processos podem ser empregados no fracionamento da biomassa e conversão em químicos de interesse.²¹ Trata-se do pré-tratamento da biomassa, o qual pode ser com emprego de métodos físicos/mecânico, químicos, bioquímicos e

termoquímicos. Os métodos de pré-tratamento comumente empregados são condicionamento de amônia, pré-tratamentos com ácidos diluídos, pré-tratamentos mecânicos (moagem) e explosão a vapor.²³

As moléculas bloco-construtoras de uma biorefinaria correspondem as moléculas intermediárias oriundas da biomassa, as quais serão utilizadas para conversão e obtenção do produto de interesse. Alguns exemplos de moléculas bloco-construtoras são: gás de síntese, açúcares de cinco e seis carbonos (C5 e C6) provenientes de biomassa lignocelulósica, lignina, biogás e óleo obtido de oleaginosas e algas.²¹

A conversão da biomassa em uma molécula bloco-construtora pode ser feita de três modos: (1) por meio de processos bioquímicos ou biológico; (2) por meio de processos termoquímicos ou (3) adotando-se a conversão híbrida. A conversão bioquímica e biológica utiliza de microrganismos na conversão da biomassa pré-tratada nos produtos desejados, adotando processos enzimáticos e de fermentação. A conversão termoquímica emprega processos químicos gerais, enquanto a conversão híbrida combina os pontos fortes das conversões anteriores e são frequentemente caracterizadas por uma etapa de pré-tratamento termoquímico e uma etapa de conversão biológica.²³

A etapa de processamento consiste na separação do produto de interesse de eventuais subprodutos e/ou do meio de fermentação. Os sólidos restantes do processo podem ser removidos por meio de filtrações, ou com emprego de centrífugas e tecnologia de membrana. Além disso, unidades de cristalização, secagem e moagem podem ser adicionadas a etapa de processamento.²³

A conversão de açúcares de cinco carbonos, presentes no bagaço e na palha da cana-de-açúcar, em etanol de segunda geração ou em compostos químicos apresenta um potencial significativo para aumentar a produtividade e o rendimento das biorefinarias brasileiras. Adicionalmente, o aproveitamento da xilose proveniente da fração hemicelulósica da biomassa pode impulsionar o desenvolvimento de novas rotas tecnológicas, contribuindo de forma estratégica para a expansão e consolidação da indústria química nacional.²⁵

3.3 XILOSE EM BIOPROCESSOS

A xilose é um monossacarídeo com cinco átomos de carbono em sua estrutura, cuja fórmula molecular é $C_5H_{10}O_5$. Como mencionado anteriormente, trata-se de um tipo de pentose encontrada na parede celular das plantas.²⁴ Está presente principalmente na forma de xilana, na fração de hemicelulose da biomassa. Com isso, é necessária uma etapa de hidrólise para liberá-la adequadamente para aplicações futuras.²⁶

Apesar da xilose ser o segundo açúcar mais abundante na natureza, sua valorização através de rotas biotecnológicas é frequentemente negligenciada. Isso porque a xilose raramente está presente no meio ambiente na forma livre, sendo utilizada por um número restrito de microrganismos. Em contrapartida, a glicose, que corresponde a uma hexose, está mais disponível e é amplamente utilizada por diversos organismos.^{24,27} Esse fato faz da xilose uma opção menos lucrativa como fonte de carbono explorável.²⁴

Para um maior aproveitamento da biomassa e aumento da viabilidade comercial das biorefinarias lignocelulósicas, surge como alternativa a utilização da xilose para a produção de combustíveis e de químicos de interesse, somando-se ao uso da glicose que já está bem estabelecido.^{9,24} As principais aplicações da xilose oriunda de biomassa são a conversão em furfural, através de rotas químicas, e o uso como fonte de carbono para produção de produtos químicos por rotas microbianas.²⁸

O furfural é um produto químico versátil que pode ser obtido a partir de resíduos agrícolas e florestais. O primeiro relato da produção comercial de furfural a partir da xilose data de 1921 e foi feito pela Quaker Oats company. A xilose e a xilana foram usadas como substratos em um processo químico no qual o ácido sulfúrico (H_2SO_4) foi o catalisador. Desde então, algumas melhorias no processo de produção ocorreram, empregando-se catalisadores homogêneos como ácidos minerais, ácidos orgânicos e ácidos de Lewis. Apesar das melhorias, a pouca reciclabilidade dos catalisadores homogêneos e a corrosão dos equipamentos que eles causam dificultam seu uso. Para superar esses obstáculos, muitas pesquisas estão sendo realizadas com catalisadores heterogêneos e ecológicos.²⁹

Como visto anteriormente, a principal levedura utilizada na produção de etanol é a *S. cerevisiae*. Entretanto, apesar da sua robustez e alta tolerância ao etanol, os tipos selvagens de cepas de *S. cerevisiae* não são capazes de fermentar a xilose, a menos

que sejam geneticamente modificadas.^{30,31} Apesar das cepas manipuladas serem capazes de fazer essa conversão, elas apresentam taxas de fermentação mais baixas e possuem menos tolerância aos inibidores da fermentação.³¹

Nos últimos 20 anos, vários estudos com foco na fermentação da xilose e produção de etanol foram feitos, uma vez que o catabolismo da xilose pelos microrganismos não ocorre tão facilmente.²⁸ Dessa forma, ficou clara a necessidade de isolar, identificar e caracterizar as leveduras nativas capazes de fermentar a xilose. Dentre as leveduras mais estudadas, a *Scheffersomyces stipitis* mostrou-se satisfatória na produção de etanol a partir da xilose. As leveduras *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Candida tenuis* também foram caracterizadas como leveduras capazes de fermentar a xilose.³¹

A Figura 4 mostra os principais produtos obtidos a partir da xilose. Além do furfural, destacam-se o etanol, os polióis d-arabitol e o d-xilitol, 2,3-butanodiol e alguns ácidos orgânicos como por exemplo o ácido xilônico.^{5,20,28,32,33}

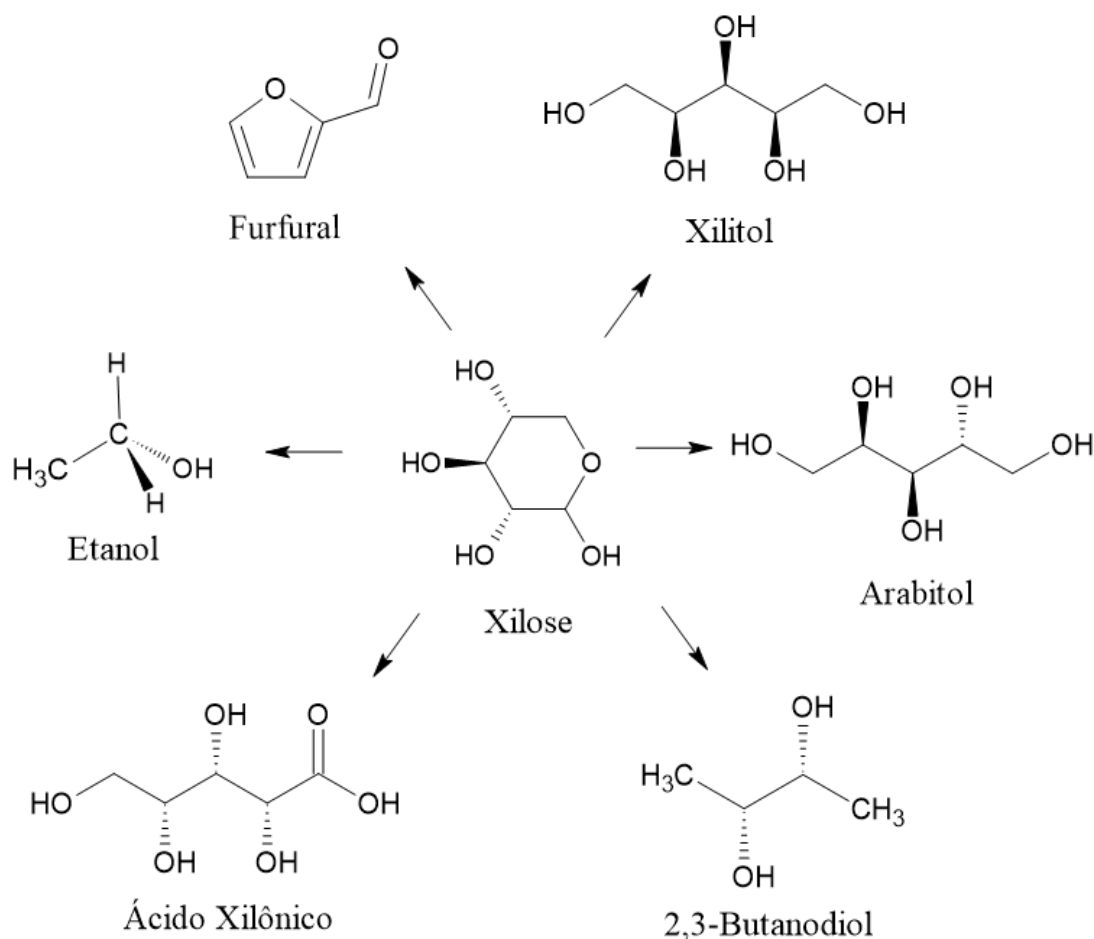


Figura 4. Fórmula estrutural da xilose e de alguns compostos que podem ser obtidos a partir do seu uso como substrato.

O xilitol e o arabitol pertencem ao grupo dos polióis, ou seja, apresentam vários grupos hidroxilas em sua estrutura. Ambos podem ser formados utilizando a xilose como substrato. Esses polióis possuem várias aplicações, principalmente nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, onde podem ser usados como adoçantes e estabilizantes.³² As principais leveduras utilizadas para produção do xilitol e do arabitol são *Debaryomyces nepalensis*, *Candida entomeae* e *Pichia guilliermondii*.³⁴

O composto orgânico biodegradável 2,3-butanodiol é utilizado como matéria-prima na produção de solventes e combustíveis líquidos. Além disso, ele é precursor de muitos produtos sintéticos como polímeros e resinas.^{33,35} A produção desse álcool pode ser feita por rotas químicas, porém o processo é considerado caro e requer altos insumos energéticos. Com isso, houve um aumento no interesse de utilização de processos biotecnológicos, em escala industrial, para sua produção.³³ Dessa forma, o 2,3-butanodiol também pode ser obtido utilizando a xilose como substrato, com a ação de alguns microrganismos. A levedura *S. cerevisiae* modificada geneticamente levou a obtenção desse químico a partir da xilose.³⁶ A engenharia genética também foi utilizada com a bactéria *Enterobacter aerogenes*, que se mostrou eficaz na conversão da xilose em 2,3-butanodiol.³⁵

O ácido xilônico também pode ser produzido utilizando a xilose como substrato em processos fermentativos e tem ganhado destaque nos últimos anos devido às inúmeras aplicações industriais. Ele pode ser usado como substituto do ácido glucônico nas indústrias químicas, alimentícias e de construção.⁵ Sua produção por rota biológica já foi relatada com o uso de microrganismos geneticamente modificados, como as leveduras *S. cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii* e a bactéria *Escherichia coli*.^{5,8,37,38} Estudos recentes de modificação genética com a levedura *Komagataella phaffii* a tornaram apta na produção de ácido xilônico a partir da xilose.⁹

3.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Há cerca de 20 anos o Departamento de Energia dos EUA (DOE) identificou 12 produtos químicos básicos. Vale destacar que cerca de 70% dos compostos listados são ácidos orgânicos, que tem um mercado anual global de ácidos orgânicos está projetado para crescer para 35 bilhões de euros em 2027.³⁹

O maior grupo é o dos ácidos carboxílicos, os quais são identificados pela presença do grupo funcional carboxila (COOH). Além disso, a maioria dos ácidos

orgânicos, são ácidos fracos.⁴⁰

O interesse por ácidos orgânicos derivados de açúcares tem aumentado nos últimos anos, uma vez que possuem um grande potencial para produção de produtos químicos e são precursores na fabricação de plásticos derivados de biomassa.⁵ São bastante empregados na obtenção de poliéster, poliamida, plastificante e solvente. Na indústria alimentícia, são usados como conservantes, pois podem evitar o acúmulo de espécies reativas, que são prejudiciais para o metabolismo celular.^{39,41}

Comercialmente, ácidos orgânicos podem ser produzidos por rotas químicas ou biológicas.⁴⁰ Entretanto, a busca por novos bioprocessos, que sejam mais sustentáveis, fez com que o mercado de produção de ácidos orgânicos por ação microbiana se expandisse cada vez mais. Os principais ácidos orgânicos produzidos por fermentação são: ácido glucônico, ácido cítrico, ácido láctico e ácido succínico (Figura 5).⁶ Alguns deles já são produzidos como produtos químicos a granel com ampla gama de aplicações, como o ácido glucônico (80 kton.ano^{-1}) e o ácido cítrico ($1600 \text{ kton.ano}^{-1}$).⁸

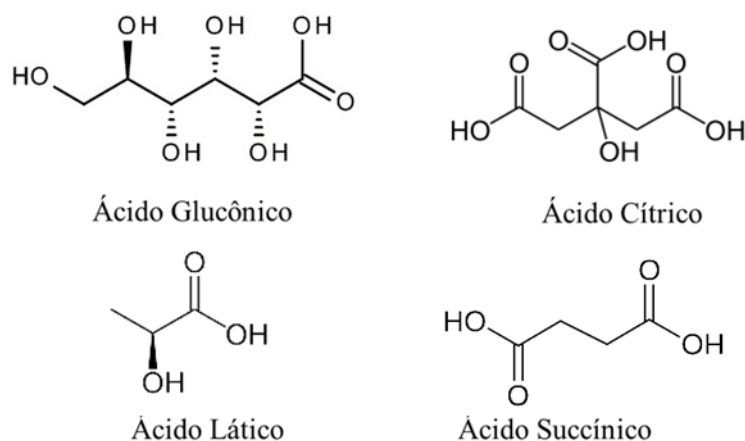


Figura 5. Fórmula estrutural dos principais ácidos orgânicos obtidos por processo microbiano.

3.4.1 Ácido Glucônico

O ácido glucônico, também chamado de ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanóico, foi descoberto em 1870 por Hlasiwetz e Habermann. Em 1880, Boutroux fez sua primeira produção microbiana, com o emprego da bactéria *Acetobacter aceti*.⁴² Trata-se de um aditivo de base biológica, que tem sido amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, médica, têxtil e de construção civil. É um ácido orgânico versátil, não corrosivo, inodoro, não tóxico e facilmente degradável.⁴³

O ácido glucônico pode ser encontrado naturalmente em humanos e outros organismos como plantas, frutas e mel ou produzido por diferentes microrganismos

como *Pseudomonas ovalis*, *Gluconobacter oxydans*, *Penicillium funiculosum* e *Aspergillus niger*.^{42,44}

Nas últimas décadas, sua principal forma de produção foi por meio da fermentação microbiana, usando várias fontes de carbono contendo hidrolisados de glicose como substrato, e obtendo altos rendimentos ao final do processo. Atualmente sua produção em escala industrial é feita por meio de um processo de fermentação submersa, usando glicose como substrato e a enzima glicose oxidase, com ação do fungo *A. niger*.^{43,44}

O ácido glucônico também pode ser produzido por métodos químicos, eletroquímicos ou enzimáticos. Entretanto a produção microbiana tem sido considerada um método mais ecológico e econômico quando comparada com a produção por rotas químicas e eletroquímicas.⁴⁵

3.4.2 Ácido Cítrico

O ano de 1920 foi um marco para os processos fermentativos por ter sido feita a primeira produção em grande escala. Realizou-se fermentação com microrganismo para produção de ácido cítrico.⁶ Esse ácido orgânico foi o primeiro produzido industrialmente por processo fermentativo.³⁹ Esse fato foi a base para a produção de produtos químicos em escala industrial, utilizando a fermentação microbiana.⁶

O ácido cítrico possui várias aplicações industriais, como aditivo aromatizante, acidificante e conservante em alimentos e bebidas.⁴⁶ Também tem sido usado em fármacos, em cosméticos, como estabilizador para óleos e gorduras vegetais, e como componente formador de complexos e branqueador em muitos detergentes de lavagens.⁴⁷

Embora o ácido cítrico possa ser obtido por processos de extração de frutas cítricas e por meio de síntese química, a fermentação tem sido amplamente selecionada para sua produção comercial devido à maior produtividade e rendimentos, bem como a menores custos operacionais.⁴⁶

Atualmente, a produção industrial do ácido cítrico consiste em uma fermentação submersa de sacarose, melaço, ou xarope de glicose, com o fungo *A. niger*.⁶ A produção de ácido cítrico empregando esse fungo leva a um rendimento de 0,88 g/g_{glicose} e uma concentração de 240 g/L desse ácido. Entretanto, este processo causa alguns problemas ambientais, como a formação de resíduos sólidos e orgânicos, e de

resíduos líquidos carregados com metais pesados. Nesse último caso, ocorre a presença de ferrocianeto em esgoto e lamas.⁴⁷

Com isso, alguns estudos de bioprocesso para a produção de ácido cítrico foram desenvolvidos. Alguns deles, mostraram vantagens quando a levedura *Yarrowia lipolytica* foi utilizada, em comparação a produção de ácido cítrico usando *A. niger*. Entre as principais vantagens temos a utilização de uma maior variedade de substrato, a sensibilidade menor a baixas concentrações de oxigênio dissolvido e metais pesados, permitindo o uso de substratos menos refinados, maiores rendimentos do produto e modificação genética mais fácil por técnicas moleculares.⁴⁷

3.4.3 Ácido Láctico

O ácido láctico foi isolado pela primeira vez em 1780, a partir de leite azedo, pelo químico sueco Karl Wilhelm Scheele. No entanto, somente em 1857 sua origem biológica foi atribuída à ação de microrganismos, em estudos conduzidos pelo químico e microbiologista Louis Pasteur. A produção comercial de ácido láctico foi iniciada posteriormente, em 1950, no Japão, marcando o início de sua aplicação em escala industrial.³⁹

O ácido láctico é um potencial bloco construtor na síntese de polímeros derivados do ácido láctico (PLA). Além disso, possui várias aplicações em diferentes setores, incluindo indústrias cosméticas, farmacêuticas, alimentícias e químicas.⁴⁸ Também é utilizado na fabricação de cerveja com o objetivo de diminuir o pH e aumentar o corpo da cerveja.^{49,50}

Atualmente, o ácido láctico pode ser obtido por síntese química ou fermentação microbiana. Entretanto, sua obtenção por ação microbiana se destaca, uma vez que explora a possibilidade de usar recursos renováveis como substratos fermentativos. Dependendo da cepa selecionada para o processo, pode-se obter os isômeros puros L(+)-ácido láctico ou D(-)-ácido láctico.⁴⁸ Na síntese química, obtêm-se a mistura racêmica dos isômeros. Outra desvantagem no processo químico é o uso de substâncias poluentes, como a lactonitrila e o altamente tóxico cianeto de hidrogênio. Atualmente, mais de 90% do ácido láctico é produzido por processos de fermentação.³⁹

Tradicionalmente sua produção era feita utilizando bactérias lácticas. Entretanto, este processo não é economicamente viável para fermentações em grande escala industrial devido às necessidades de meio nutricionalmente rico e condições de pH

moderado. Com isso, outros microrganismos foram explorados para a produção de ácido láctico.⁶ A produção de ácido láctico também pode ser feita utilizando o fungo filamentoso *Rhizopus oryzae* ou levedura recombinante e *E. coli*.^{6,49}

O fungo *R. oryzae* possui algumas vantagens frente aos outros microrganismos, uma vez que esse fungo requer apenas uma composição de meio sintético simples contendo alguns minerais inorgânicos e sal de amônio como única fonte de nitrogênio. Além disso, utiliza principalmente a glicose para produção desse ácido, levando a um rendimento em peso de 70 a 90% dependendo das condições de cultura. Ele também é capaz de fermentar a xilose, aumentando o rendimento na produção do ácido láctico.⁴⁹

3.4.4 Ácido Succínico

O ácido succínico é um ácido dicarboxílico, ou seja, apresenta dois grupos funcionais carboxila em sua fórmula estrutural (Figura 5).³⁹ Sua principal aplicação é como intermediário para a produção de produtos químicos finos, como ésteres de perfume ou como agente neutralizante usado na indústria de alimentos.⁶

Predominantemente, a sua produção é feita a partir de petroquímicos, em uma escala de 30.000 a 50.000 toneladas por ano.⁶ O processo consiste na hidrogenação de anidrido maleico, de origem fóssil. Entretanto, devido a emissão de gases de efeito estufa e consumo de energia não renovável associados à produção petroquímica, a rota fermentativa tem sido preferida para sua produção.³⁹

Os primeiros microrganismos reconhecidos como produtores de ácido succínico foram bactérias isoladas do rúmen, como *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens*, *Bacillus fragilis* e alguns fungos como as espécies *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.³⁹

Atualmente, a produção de ácido succínico está passando por uma transição. Isso porque a fermentação microbiana já está sendo usada para produção em larga escala. Com essa nova forma de produção, espera-se que o ácido succínico se torne mais barato e possa servir como um bloco construtor para muitos produtos químicos, como 1,4-butanodiol, tetra-hidrofurano, ou os polímeros biodegradáveis succinato de polibutileno e polióis de poliéster.⁵¹

3.5 ÁCIDO XILÔNICO

O ácido xilônico começou a ser estudado em 1990 e atualmente é considerado um dos 30 principais produtos químicos de alto valor que pode ser obtido a partir de biomassa, segundo o relatório do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) e do *Pacific Northwest National Laboratory* (PNNL).^{7,52}

O ácido xilônico é um açúcar-ácido de cinco carbonos, oriundo da oxidação da xilose, e tem se tornado objeto de muitos estudos e pesquisas nos últimos anos.^{10,28} Por apresentar excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade térmica, possui diversas aplicações industriais.⁵³ Ele pode ser utilizado na indústria alimentícia para conservação dos alimentos e para realçar sabor. Outra aplicação é como precursor de outros químicos de interesse, como o 1,2,4-butanotriol, usado na produção de polímeros.^{5,9,53} Na indústria farmacêutica pode ser empregado como antimicrobiano e como metabólito da vitamina C.^{9,53} Além disso, o ácido xilônico pode ser um substituto para o ácido glucônico, um importante bloco construtor empregado como um produto de dispersão de concreto na indústria de construção civil.^{5,9}

Uma das principais vantagens na substituição do ácido glucônico pelo ácido xilônico é que a xilose não é utilizada como alimento pelos seres humanos, enquanto a glicose, precursora do ácido glucônico, é um carboidrato de uso alimentar. Ademais, o ácido xilônico possui um alto valor de mercado, podendo agregar valor à produção do bioetanol nas biorefinarias, tornando o processo como um todo mais economicamente viável.⁵

O ácido xilônico é um ácido orgânico fraco, que pode ser obtido por via química ou por via microbiana com ação da enzima xilose desidrogenase.⁵

3.5.1 Produção pela rota química

Existem poucos relatos sobre a síntese química do ácido xilônico. Os processos atuais utilizam altas temperaturas ou adotam sistemas alcalinos (orgânicos) juntamente com catalisadores de metais nobres, tornando o processo mais complexo, caro e prejudicial ao meio ambiente.¹⁰ Apesar dessas desvantagens, as principais vantagens em se empregar a rota química são a fácil separação do produto e alta eficiência e reciclagem do catalisador. Além disso, a eletrocatalise e a fotocatalise também são formas de produção desse ácido orgânico.⁵³

O método de produção do ácido xilônico pela via química que já está consolidado envolve a eletro-oxidação da D-xilose por meio de eletrodos de platina ou ouro em meio

alcalino. Essa reação química também pode ser empregada para síntese de outros ácidos orgânicos, em menor escala, como ácido glicérico, fórmico e glicólico.⁴⁰

Segundo estudo realizado por Governo A. T., *et al.* (2004), a reação de eletrólise prolongada, com potenciais controlados em 1,0 V para o eletrodo de platina e 1,1 V para o eletrodo de ouro, mostrou que a conversão da D-xilose em ácido xilônico foi maior ao se utilizar eletrodo de ouro. Obteve-se 98% de conversão, enquanto ao se utilizar eletrodo de platina a conversão obtida foi de 26 %. Além disso, apesar do ácido xilônico ser identificado como o principal produto de reação, outros ácidos carboxílicos também puderam ser formados.⁴⁰

A Tabela 2 apresenta os produtos obtidos na reação de eletro-oxidação da D-xilose em meio alcalino, utilizando eletrodos de platina e ouro, bem como os respectivos percentuais de conversão da D-xilose. O principal composto identificado em ambas as condições foi o ácido xilônico. No entanto, também foram detectadas quantidades significativas de ácidos orgânicos de baixo peso molecular como subprodutos da eletrólise. Destaca-se que o ácido tartárico (4,0%) foi identificado exclusivamente na eletrólise realizada com eletrodos de ouro, enquanto o ácido glioxílico (14%) foi observado apenas na eletrólise com eletrodo de platina. Além disso, o rendimento de ácido xilônico obtido com eletrodos de ouro foi superior a três vezes aquele alcançado com platina.⁴⁰

Como visto, a maior produção de ácido xilônico ocorre ao se utilizar eletrodo de ouro. As reações químicas que demonstram sua obtenção, em meio alcalino são descritas a seguir:

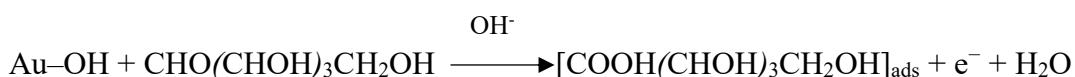
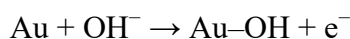


Tabela 2: Produtos de reação e porcentagem de conversão de d-xilose, utilizando eletrodos de platina e ouro (adaptada)⁴⁰

Eletrodo	Ác. Xilônico (%)	Ác. Glioxílico (%)	Ác. Tartrônico (%)	Ác. Glicérico (%)	Ác. Oxálico (%)	Ác. Glicólico (%)	Ác. Fórmico (%)	Ác. Tartárico (%)	Conversão D-xilose (%)
Pt/ 1.0 V, tempo = 4h	18,5	14	1,8	9,5	1,8	12,1	9,1	-	26
Au/ 1.1 V, tempo = 6h	62,6	-	3,9	5,5	7,4	6,2	2,5	4,6	98

A Figura 6 mostra a via química de produção do ácido xilônico e os demais produtos que também podem ser formados em menor quantidade. Os produtos secundários são mostrados após a seta 2. Apesar do mecanismo já estar bem descrito e as reações serem bem elucidadas, a produção de ácido xilônico quimicamente ainda está em escala laboratorial.

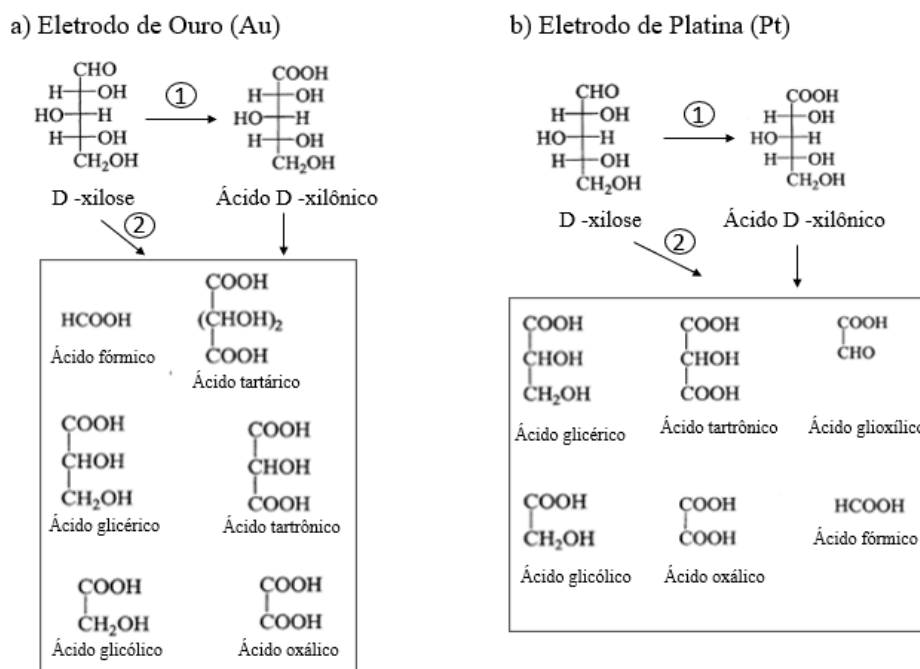


Figura 6. Rota química de produção do ácido xilônico utilizando eletrodos de ouro (a) e platina (b), em meio alcalino (Adaptada)⁴⁰

3.5.2 Produção pela rota biológica - Fermentação

O método biológico de produção do ácido xilônico refere-se à conversão do hidrolisado de lignocelulose, xilano hemicelulose ou xilose em ácido xilônico por ação microbiana.⁵³ A conversão biológica da xilose em ácido xilônico vem recebendo destaque nos últimos anos por se tratar de um processo mais sustentável e com condições suaves de reação.¹⁰ Mas, como todo processo, também existem algumas desvantagens como tempo prolongado de reação e complicações na purificação do produto de interesse.⁵³

Biologicamente, o ácido xilônico é produzido por bactérias, leveduras e fungos, mas a produção em larga escala ainda não foi desenvolvida devido a demandas específicas de crescimento celular, principalmente para bactérias.⁵ Além disso, quando se empregam leveduras, é necessário o uso de peptona e extrato de levedura como

fontes de nitrogênio, geralmente não econômicos para a produção em escala industrial de ácido D-xilônico.³⁸

Na via microbiana, o ácido xilônico é produzido com a ação da enzima xilose desidrogenase. As desidrogenases são enzimas oxirredutoras, ou seja, fazem a transferência de íons de hidrogênio para uma molécula aceptora. Dessa forma, a xilose desidrogenase atua na D-xilose oxidando-a a xilolactona, usando $\text{NAD}^{(+)}$ ou $\text{NADP}^{(+)}$ como cofatores da reação. Em uma segunda reação a xilolactona é hidrolisada, obtendo-se o ácido xilônico (Figura 7). Essa segunda etapa da reação ocorre de maneira espontânea, ou também pode ser realizada pela enzima xilolactanase.⁵

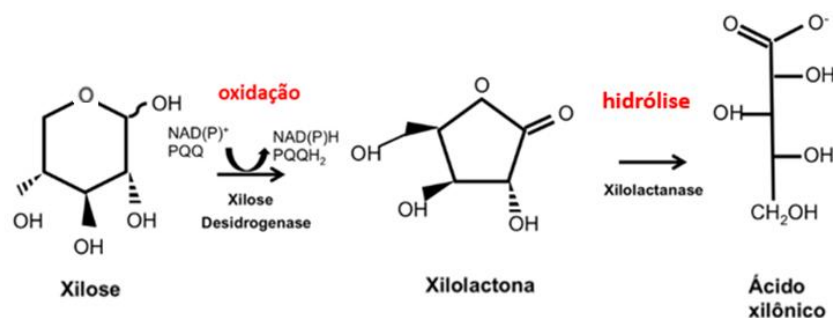


Figura 7. Rota microbiana de produção de ácido xilônico utilizando D-xilose e a enzima xilose desidrogenase (Adaptada)⁵

A produção de ácido D-xilônico pela ação de microrganismos foi percebida pela primeira vez em 1946, por Lockwood e Nelson. O microrganismo em questão se tratava de *Pseudomonas* e, atrelado a esse fato, foi descoberta a xilose desidrogenase (XDH), que catalisa a conversão de D-xilose em ácido D-xilônico.⁵⁴ Dessa forma, a produção de ácido xilônico pela rota biológica é possível pois alguns microrganismos apresentam naturalmente a via metabólica de assimilação de xilose, sendo capazes de utilizar esse açúcar com fonte de carbono.⁵ A via de oxidação da xilose é mais comumente encontrada em *Archaea* e *Pseudomonas*, mas também pode ser encontrada em algumas bactérias como *Haloarcula marismortui* e *Caulobacter crescentus*.^{10,55}

Desde os primeiros relatos da produção bacteriana de ácido xilônico vários microrganismos foram identificados como produtores naturais. Isso inclui *Erwinia*, *Enterobacter cloacae*, *Gluconobacter oxydans*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas sacchari*, *Kliebsiella pneumoniae* e *Pichia kudriavzevii*.^{10,52} Dentre esses microrganismos, as *G. oxydans*, *Pseudomonas fragi* e *P. sacchari* mostraram ser as melhores produtoras de ácido xilônico. Além disso, as bactérias do gênero *Gluconobacter* se mostraram mais tolerantes aos inibidores de hidrolisados de biomassa do que *Pseudomonas*.¹⁰

Como visto, alguns microrganismos mostraram ser capazes de converter naturalmente xilose em ácido xilônico. Apesar disso, novas linhagens recombinantes foram desenvolvidas para se obter um microrganismo mais robusto e eficiente para a produção industrial de ácido xilônico.⁵ Espécies como *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* foram modificadas para expressar xilose desidrogenase heteróloga de *Caulobacter crescentus* ou *Trichoderma reesei*.⁵²

Nesse contexto, o primeiro microrganismo modificado geneticamente para a produção desse ácido orgânico foi a levedura *S. cerevisiae*. O processo consistiu na introdução do gene de xilose desidrogenase, *XYD1*, proveniente do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. A levedura foi capaz de produzir 3,8 g/L de ácido xilônico.⁵

Visando obter uma maior concentração de ácido xilônico após fermentação, realizou-se um estudo, ainda com *S. cerevisiae*, no qual foi introduzido o gene *xylB*, que codifica para uma xilose desidrogenases da bactéria *Caulobacter crescentus*. A levedura foi capaz de produzir 17 g/L de ácido xilônico. Ainda com objetivo de se obter uma maior produção desse ácido, o gene *GRE3*, natural da levedura, foi deletado e o gene de xilolactanase *xylC*, também de *C. crescentus*, foi expresso. Com isso a produção final de ácido xilônico foi de 43 g/L com um rendimento de 0,8 g/g.⁵⁶

As condições reacionais que levam a uma melhor produção de ácido xilônico ainda não estão definidas. Entretanto, utilizando cepas modificadas de *S. cerevisiae*, a melhor produção foi obtida com pH 5,5. Com pH 3, a produção e a viabilidade celular foram reduzidas em comparação com o observado em pH 5,5.⁵ A Tabela 3 mostra alguns microrganismos já relatados em estudos que foram utilizados na conversão de xilose a ácido xilônico, bem como o rendimento, a produtividade a concentração final obtida desse ácido.⁵⁴

Tabela 3: Produção de ácido d-xilônico a partir de d-xilose por alguns microrganismos (adaptada)⁵⁴

Microrganismo	Genes expressos	Organismo doador	Rendimento (g _{ax} /g _s)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Ácido xilônico (g/L)	pH	Modo de reação
<i>S. cerevisiae</i>	<i>XYD1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	0,4	0,03	3,8	5,5	Batelada
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xylB</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	0,8	0,23	17	5,5	Batelada
<i>S. cerevisiae</i>	<i>xylB</i> e <i>xylC</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	0.8	0,44	43	5,5	Batelada
<i>E. coli</i> W3110	<i>xylB</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	0.98	1.09	39	7,0	Batelada
<i>K. pneumoniae</i>	<i>gag</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,11	1,3	103	5,5	Batelada alimentada
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>xylB</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	1.0	1.40	171	5,5	Batelada alimentada

A primeira bactéria geneticamente modificada para ser capaz de produzir ácido xilônico foi *E. coli* W3110. O gene *xylB* de *C. crescentus*, que codifica a xilose desidrogenase, foi introduzido na *E. coli*. Uma melhoria adicional desta cepa foi feita interrompendo suas vias metabólicas nativas para xilose e ácido xilônico. Após isso, a produção de ácido xilônico foi de 39 g/L de a partir de 40 g/L de xilose, com rendimento de 0,98 g/g.¹⁰

Outra bactéria que também foi modificada para ser capaz de produzir esse ácido orgânico foi a *Klebsiella pneumoniae*. Vale ressaltar que esse microrganismo passou pelo processo de modificação genética para a coprodução de ácido xilônico e ácido glucônico. A bactéria já possuía a via de oxidação de xilose, sendo capaz de produzir o ácido xilônico. O gene *gag*, que codifica para gluconato desidrogenase, foi deletado, fazendo com que a bactéria acumulasse os ácidos xilônico e glucônico produzidos. Após fermentação com hidrolisado de bambu, a linhagem recombinante de *K. pneumoniae* foi capaz de produzir misturas de 33 g/L de ácido glucônico e 14 g/L de ácido xilônico. Além disso, o rendimento de ácido xilônico obtido foi de 1.0 g/g, equivalente ao máximo teórico.²⁸

A engenharia genética também foi empregada com a levedura *Pichia kudriavzevii* para produção de ácido xilônico. O processo consistiu no mesmo empregado e descrito anteriormente para a *E. coli*, onde o gene *xylB* de *C. crescentus* foi introduzido. O pH do meio fermentativo mostrou ser importante com relação à produtividade ao final do processo. Com pH 5,5, o rendimento obtido foi 1.0 g/g de ácido xilônico e produtividade de 1.4 g.L⁻¹.h⁻¹. Com pH 3, a produtividade foi de 1.2 g.L⁻¹.h⁻¹.⁸

Em todos os estudos já realizados para produção de ácido xilônico com linhagens recombinantes, os únicos genes usados para tornar o microrganismo geneticamente produtor desse ácido orgânico foram *xylB* (*C. crescentus*) e *XYD1* (*T. reesei*).¹⁰

Os maiores rendimentos de produção de ácido xilônico relatados foram alcançados com o uso de meios sintéticos. A composição definida do meio minimiza a variabilidade e garante a reprodutibilidade experimental. Nutrientes essenciais (por exemplo, nitrogênio e minerais) são otimizados para maximizar a conversão de xilose, enquanto a ausência de impurezas previne a inibição microbiana e reações colaterais indesejadas. Consequentemente, os meios sintéticos servem como sistema de controle

ideal e padrão de referência na avaliação de hidrolisados lignocelulósicos em processos de fermentação.^{10,57}

3.6 *Komagataella phaffii*

Komagataella phaffii é uma levedura que anteriormente era classificada como *Pichia pastoris*. Após análise filogenética de sequências de genes, houve uma reclassificação e, atualmente, esse microrganismo pertence ao gênero *Komagataella*. Desde então, além da *K. pastoris*, outras duas espécies foram descritas, *K. pseudopastoris* e *K. phaffii*.⁵⁸

Taxonomicamente, essa levedura é pertencente do reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Ascomycotina*, classe *Hemoascomycetes*, ordem *Endomycetales*, família *Saccharomycetaceae* e subfamília *Saccharomycetoideae*.¹³

As três espécies de *Komagataella* relatadas, não apresentam diferenças visíveis nos testes de fermentação e assimilação, comumente usados em taxonomia de leveduras. Entretanto, a identidade de *K. pastoris* foi determinada a partir de análises de sequência multigênica. Os resultados mostraram que a cepa de *Pichia pastoris*, comumente usada em estudos de expressão gênica, corresponde, na verdade, a *K. phaffii*.⁵⁸

Uma característica encontrada nas espécies de *Komagataella* é o fato dessas leveduras possuírem a capacidade de crescer utilizando metanol como substrato, classificando-as como metilotróficas.⁵⁹ Somada com a capacidade de utilizar o metanol como fonte de carbono, *K. phaffii* também consegue usar, além da glicose, o glicerol de maneira eficiente para o seu crescimento.⁶⁰ Nesse contexto, alguns estudos demonstraram que a levedura *K. phaffii* é capaz de utilizar, de forma eficiente, glicerol bruto e/ou purificado como fonte de carbono para a produção de proteínas heterólogas, enzimas de interesse industrial e compostos de alto valor agregado.^{61–64}

Essa cepa é geralmente considerada segura, com fundo genético bem definido, vias metabólicas e redes reguladoras e pode crescer até altas densidades celulares em um meio simples. Essas características fizeram da *K. phaffii* um sistema alvo para expressar genes heterólogos em altos níveis.⁵⁹

Apesar de possuir em seu genoma os genes necessários para o metabolismo de xilose, a levedura *K. phaffii* não consegue utilizar a xilose como fonte de carbono para o seu crescimento.⁶⁵ Entretanto, a cepa *K. phaffii* apresenta alto rendimento e produtividade de proteínas heterólogas, boa capacidade de crescimento em altas

densidades celulares e com baixo pH, não diverge os fluxos de carbono por vias competitivas, apresenta rápido crescimento em meios quimicamente definidos e facilidade de manipulação genética. Essas características tornam-na interessante para produção de ácido xilônico, após modificação genética.^{9,65}

Recentemente, no Laboratório de Genética Microbiana e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia, a levedura *K. phaffii* foi geneticamente modificada para viabilizar a produção de ácido xilônico a partir da xilose. Essa espécie foi escolhida por sua capacidade de tolerar baixos valores de pH, alcançar altas densidades celulares e ser altamente suscetível à engenharia genética.⁶⁶ No estudo 11 sequências proteicas putativas que codificam xilose desidrogenases foram identificadas e, em seguida, foram superexpressas na levedura *K. phaffii*. Após a construção e avaliação das cepas, as linhagens recombinantes resultantes, portadoras de genes de bactérias (*xylB*-BS, *xylB*-HL, *xylB*-AM, *xylB*-MN, onde BS, HL e assim por diante representam a abreviação do nome bacteriano) e fungos (XYD1-FM e XYD1-CO), foram capazes de produzir ácido xilônico. As quatro melhores cepas de *K. phaffii* expressando os genes XDH, da bactéria *C. crescentus*, produziram de 23,0 a 37,0 g L⁻¹ de ácido xilônico em um meio definido com xilose. As duas melhores cepas *K. phaffii* kXDH-BS e kXDH-HL produziram 33,9 e 37,1 g L⁻¹ de ácido xilônico com rendimentos de 0,92 e 0,96 g/g¹ (Tabela 4).^{9,10}

Tabela 4: Produção de ácido d-xilônico a partir de d-xilose por linhagens recombinantes de *K. phaffii* (adaptada)⁹

Microrganismo	Genes expressos	Rendimento (g _{ax} /g _x)	Produtividade (g/L.h)	Ácido Xilônico (g/L)	pH	Modo de reação
<i>K. phaffii</i> kXDH-BS	<i>xylB</i> -BS	0,92	0,35	33,9	5,5	Batelada
<i>K. phaffii</i> kXDH-HL	<i>xylB</i> -HL	0,96	0,41	37,1	5,5	Batelada
<i>K. phaffii</i> kXDH-AM	<i>xylB</i> -AM	0,63	0,26	24,8	5,5	Batelada
<i>K. phaffii</i> kXDH-MN	<i>xylB</i> -MN	0,59	0,24	23	5,5	Batelada

As cepas recombinantes kXDH-BS e kXDHHL de *K. phaffii* mostraram ser capazes de produzir ácido xilônico na presença de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.⁹ Após 96 h de fermentação, a linhagem kXDH-BS produziu 10,2 g.L⁻¹ de ácido xilônico com rendimento de 0,37 g.g⁻¹, enquanto a cepa kXDHHL levou à produção de 11,7 g.L⁻¹ desse ácido orgânico com rendimento de 0,43 g.g⁻¹ (Tabela 5).⁹ Vale ressaltar que, no estudo realizado, o hidrolisado de bagaço de cana utilizado continha 3 g.L⁻¹ de ácido acético, inibidor de crescimento celular já relatado em outros trabalhos.^{10,67,68}

Tabela 5: Produção de ácido d-xilônico por linhagens recombinantes de *K. phaffii* usando hidrolisado lignocelulósico como substrato (adaptada)¹⁰

Microrganismo	Modificação genética	Substrato	Rendimento (g _{av} /g _s)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Ácido Xilônico (g/L)	pH	Modo de reação
<i>K. phaffii</i> kXDH-BS	<i>xykB-BS</i>	Hidrolisado Bagaço cana-de-açúcar	0,37	0,14	10,2	5,5	Batelada; frasco em shaker orbital
<i>K. phaffii</i> kXDH-HL	<i>xykB-HL</i>	Hidrolisado Bagaço cana-de-açúcar	0,43	0,16	11,7	5,5	Batelada; frasco em shaker orbital

Em resposta aos inibidores presentes em hidrolisados, a levedura *K. phaffii* altera seu padrão global de expressão gênica, tornando-se apta a consumir a glicose e o ácido acético presentes no meio e de utilizar a xilose como substrato na produção do ácido xilônico.^{9,10,67}

Dessa forma, as linhagens recombinantes de *K. phaffii* mostraram ter potencial para serem utilizadas na produção do ácido xilônico em altas concentrações, com hidrolisado de biomassa.⁹ Entretanto, esse foi o primeiro estudo no qual a levedura *K. phaffii* foi utilizada para a produção de ácido xilônico. Uma avaliação dos parâmetros de reação para otimizar o processo e levar a uma maior produção de ácido xilônico e aumento da produtividade se faz necessário, bem como utilização do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar em fermentações conduzidas em biorreator, aumentando a escala, e com maior controle reacional.

3.7 PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO XILÔNICO

Como visto anteriormente, muitos ácidos orgânicos podem ser obtidos por fermentação. Após a produção do ácido de interesse, etapas de recuperação e purificação são necessárias.⁵³ Entretanto, não existe um único método de purificação, uma vez que as condições do processo fermentativo podem variar e cada ácido orgânico possui suas propriedades físicas. Com isso, vários princípios e configurações de recuperação e purificação são usados na produção industrial, dependendo do ácido em questão.⁶⁹

Além disso, dependendo de qual aplicação será dada ao ácido orgânico, uma pureza muito maior é necessária, especialmente quando empregado no campo da síntese de polímeros. Atualmente, para atingir a pureza necessária, a indústria utiliza

de processos como destilação, esterificação e cristalização. Entretanto, esses métodos consomem muita energia e têm taxas de recuperação relativamente pequenas.⁷⁰

Segundo López-Garzón *et al.* (2014), a recuperação de um ácido carboxílico se inicia com a remoção das células do meio fermentativo e, para isso, o método mais empregado é a centrifugação. A etapa seguinte corresponde a recuperação primária, que pode ser feita por meio de extração líquido-líquido, adsorção, precipitação ou por eletrodialise convencional. Vale ressaltar que, dependendo do ácido em questão, o íon carboxilato pode ser formado ao invés do ácido carboxílico. Quando isso ocorre, uma etapa para remoção do cátion do carboxilato formado se faz necessária. Métodos térmicos para separação de sais podem prevenir que sais inorgânicos residuais sejam produzidos. Por fim, a purificação do ácido requer uma etapa de destilação ou cristalização, onde geralmente ocorre a evaporação da água.⁶⁹

Alguns processos bastante utilizados na recuperação de ácidos orgânicos e eliminação de resíduos ou sais utilizam membranas, como nanofiltração, diálise por difusão (DD), eletrodialise convencional (ED) e eletrodialise com processos de membranas bipolares (EDBM).⁷¹

Quando uma mistura de ácidos orgânicos está presente no caldo de fermentação, como por exemplo na produção de ácido succínico, o qual leva a formação dos subprodutos lactato e acetato, as tecnologias de membrana tradicionais não apresentam alta seletividade entre esses diferentes ânions orgânicos. Nesses casos, o uso direto do ácido orgânico recuperado por esses processos não é possível, sendo necessárias outras etapas de processamento para aumentar a pureza do ácido de interesse. A cromatografia, a extração por solvente e a filtração acionada por pressão foram métodos propostos para esse fim. Como qualquer processo, esses métodos apresentam algumas desvantagens. A extração por solvente, por exemplo, pode ocorrer com o uso de solventes perigosos e muitas vezes tóxicos e de técnicas e etapas a mais para recuperação de solvente.⁷¹

O processo de *downstream* tem se destacado como uma alternativa promissora para a separação e purificação de compostos, especialmente por meio do uso da cromatografia preparativa. Originalmente desenvolvida para a extração e purificação de misturas complexas de origem vegetal, essa técnica tem sido progressivamente incorporada em aplicações biotecnológicas, com destaque para seu uso crescente na indústria açucareira.⁷⁰

Buchert *et al.* (1986) descreveram um protocolo para a recuperação do carboxilato xilonato obtido após a fermentação em frascos sob agitação. O método utilizado baseou-se na técnica gravimétrica, por meio da adição de etanol (EtOH) à amostra fermentada, na proporção de 3:1 (v/v). Após 12 horas de refrigeração, o etanol foi decantado e os cristais de xilonato de cálcio formados foram redissolvidos em água quente, submetidos a tratamento com carvão ativado para remoção de impurezas, e posteriormente recristalizados por nova adição de etanol na mesma proporção (3:1, v/v). Os cristais finais foram secos em dessecador sob vácuo.⁷²

Liu *et al.* (2012), fizeram uma modificação no procedimento relatado por Buchert *et al.* (1986) para a purificação do ácido D-xilônico. Após a etapa fermentativa, o ácido xilônico, presente na forma de sal de cálcio, foi recuperado do meio por precipitação com etanol. Inicialmente, as células microbianas foram removidas por centrifugação a $2500 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante resultante, contendo o ácido D-xilônico, foi submetido à descoloração utilizando carvão ativado. Na sequência, o material foi filtrado e concentrado por meio de evaporação em evaporador rotativo. O concentrado foi novamente filtrado em membrana de $0,22 \mu m$ e adicionou-se EtOH (3:1, v/v) para a precipitação do ácido D-xilônico. Por fim, o produto foi seco a vácuo por 12 h a $4^\circ C$. O precipitado purificado foi analisado em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono e Hidrogênio (RMN - ^{13}C e 1H). Os resultados mostraram que 87,7% de ácido D-xilônico foi recuperado. A identidade do composto recuperado foi confirmada através da análise de RMN (^{13}C e 1H). A análise de HPLC demonstrou que a pureza do produto foi de 89,4%.³⁸

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo *Komagataella phaffii* P1HL2 utilizado em todo o estudo foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia que realizou a modificação genética da *Komagataella phaffii*. Como descrito por Ramos *et al.* (2021), para a construção da cepa, o gene *xylB* de *Halomonas lutea* foi clonado sob controle do promotor constitutivo pGAP (gliceraldeído desidrogenase) e expresso em *K. phaffii* usando o vetor integrativo pGAPZB.⁹ Os transformantes foram selecionados usando o antibiótico zeocina, e a PCR confirmou a integração do vetor no genoma da levedura.^{9,66} A levedura foi preservada em glicerol 30% a -80 °C e reativada em placas de ágar YPD suplementadas com zeocina (20 g/L de peptona bacteriológica, 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de ágar, zeocina 100 ug/mL) quando necessário.

4.1.2 Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado utilizado nas fermentações, foi cedido pelo Centro Tecnológico da Cana-de-Açúcar (CTC), São Paulo, Brasil. Foi obtido por explosão a vapor seguida de hidrólise ácida da fração rica em hemicelulose.^{73,74}

Antes do uso nas fermentações, o hidrolisado foi submetido a um processo de preparo. Inicialmente, as partículas sólidas foram removidas por centrifugação a 4700 rpm, por 10 min (centrífuga de bancada, Thermo Scientific). Em seguida, o pH foi ajustado para 5,5 utilizando um pHmetro digital (Metrohm) e solução de KOH 85% (v/v). O hidrolisado foi novamente centrifugado nas mesmas condições (4700 rpm, 10 min) e, posteriormente, filtrado em sistema a vácuo com membrana de 0,22 µm (Milipore). A filtração foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (Filter Flux), com o uso de vidrarias previamente autoclavadas (copo de vidro borossilicato de 300 mL, funil de placa porosa de 47 mm de diâmetro e Erlenmeyer de 1 L) em autoclave vertical de 18 L (Prismatec). Esse procedimento correspondeu à etapa de esterilização por filtração.

4.1.3 Equipamentos

Equipamentos utilizados nas análises e procedimentos:

- ✓ Autoclave Vertical, marca Prismatec, modelo CS capacidade 100 L.
- ✓ Autoclave Vertical, marca Prismatec, modelo CS capacidade 18 L.
- ✓ Balança analítica, marca Shimadzu, modelo AY220
- ✓ Banho térmico com circulação externa, marca Huber, modelo 118A-E
- ✓ Biorreator de 1 L, marca Eppendorf, modelo Dazgip Bioblock.
- ✓ Bioreator, marca Infors HT, modelo Multifors 2.
- ✓ Bomba de vácuo, marca Buchi, modelo V-700
- ✓ Capela de Fluxo Laminar, marca Filter Flux.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada, marca Thermo Scientific, modelo Megafuge 40R.
- ✓ Centrifuga de bancada refrigerada para tubos Eppendorf, marca Herme Labortechnik, modelo Z326K.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – CLAE, marca Agilent, modelo 1260 Infinity.
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Pressão (UHPLC), marca Waters UPLC, modelo Acquity H-Class.
- ✓ Espectrofotômetro portátil com absorvância UV/VIS, marca Implen, modelo OD600.
- ✓ Estufa de Secagem e Esterilização com Circulação e Renovação de Ar, capacidade de 80 L, marca Edutec, Estufa
- ✓ Incubadora de solo, marca Quimis, modelo Q315M25.
- ✓ Liofilizador de solo, marca Liotop, modelo K120.
- ✓ Microscópio Trinocular da marca BEL Photonic.
- ✓ pHmetro digital, marca Metrohm.
- ✓ Shaker Orbital Empilhável, marca Infors, modelo Mutitron Standard.
- ✓ Shaker Orbital de solo com incubação e refrigeração, marca Thermo Scientific, modelo MAXQ5000.

4.1.4 Meios e Soluções

4.1.4.1 Preparo de Soluções de Eritrosina

A solução estoque de eritrosina, utilizada para a determinação da viabilidade celular pelo método de quantificação de esporos em câmara de Neubauer, foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de eritrosina em 10 mL de água destilada e

armazenada sob refrigeração a 4 °C, protegida da luz. A solução de trabalho foi obtida pela diluição de 0,1 mL da solução estoque em 5,0 mL de tampão fosfato 0,1 M. O volume restante da solução foi mantido sob refrigeração, também protegido da luz.

4.1.4.2 Solução tampão ftalato de potássio

Empregou-se meio tamponado nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Para isso, preparou-se a solução tampão 0,2 M de ftalato de potássio, pH 5,5, utilizando hidrogeno ftalato de potássio monobásico (KHP) (PM = 204,22), grau P.A., hidróxido de potássio (KOH), com pureza 85%; e água destilada.

4.1.4.3 Meio de Cultura YPD/YPG

Preparou-se o meio de cultura líquido YPD para posterior crescimento das linhagens de *K. phaffii*. Utilizou-se 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de glicose. Após preparo, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C, 1 atm, por 15 min. Esse meio foi utilizado para crescimento celular tanto no primeiro quanto no segundo pré-inóculo. O mesmo procedimento descrito foi realizado para o meio YPG, substituindo a glicose por glicerol. Para o preparo do meio de cultura sólido, adotou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, acrescentando 20 g/L de ágar no preparo do meio. O meio de cultura sólido era vertido em placas de Petri, em ambiente estéril, na capela de fluxo laminar.

4.1.4.4 Meio de Cultura Líquido YP2X

As fermentações em biorreator e fermentações em batelada alimentada em Erlenmeyer, foi utilizado o meio de cultura líquido utilizado nos pré inóculos para crescimento das linhagens de *K. phaffii* foi YP2X. Utilizou-se 20 g/L de extrato de levedura, 40 g/L de peptona bacteriológica, 40 g/L de glicerol e 40 g/L de xilose. As soluções de glicerol 40 g/L e xilose 40 g/L foram preparadas separadamente. O meio YP2X e as soluções de xilose e glicerol foram esterilizadas em autoclave a 120 °C, 1 atm, por 15 min.

4.1.4.5 Meio mineral para fermentações em biorreator com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (Meio mínimo)

As fermentações com adição de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (10, 20 e 30% (v/v)), bem como a fermentação controle com meio sintético contendo xilose

e glicerol, foram conduzidas em meio mineral composto por 25% da solução de sais, 0,25% da solução de vitaminas, 0,25% da solução de elementos traços, solução de ureia 4 g/L. O meio foi suplementado com solução estoque xilose 200 g/L e glicerol 200 g/L, resultando em uma concentração inicial de xilose de 40 g/L e uma concentração de glicerol de 10 g/L.

4.1.4.5.1 Solução de Sais (10x)

Nas fermentações em biorreator, tanto com hidrolisado quanto com meio sintético (controle), utilizou-se 25% (v/v) da solução de sais (10X). Essa solução foi preparada pela combinação de sulfato de amônio (50 g/L), sulfato de magnésio (5 g/L) e fosfato monobásico de potássio (30 g/L). Após o preparo, foi submetida à autoclavagem a 120 °C, 1 atm, por 15 minutos.

4.1.4.5.2 Solução de Vitaminas

A solução de vitaminas utilizada nas fermentações com hidrolisado e na fermentação com meio sintético (controle) foi adicionada na concentração de 0,25% (v/v). O preparo dessa solução seguiu o protocolo descrito por Verduyn *et.al.* (1992).⁷⁵ Para obtenção de 100 mL da solução de vitaminas, foram inicialmente dissolvidos 0,005 g de biotina em 1 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. Em seguida, foram adicionados 80 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 6,5. À solução de biotina foram adicionadas, de forma sequencial, as demais vitaminas, realizando-se o ajuste do pH para 6,5 após cada adição. As vitaminas incorporadas foram: 0,1 g de pantotenato de cálcio ((C₉H₁₆NO₅)₂Ca), 0,1 g de niacina (C₆H₅NO₂), 2,5 g de inositol (C₆H₁₂O₆), 0,1 g de cloridrato de tiamina (C₁₂H₁₇ClN₄O₅), 0,1 g de cloridrato de piridoxina (C₈H₁₁NO₃), 0,02 g de ácido para-aminobenzóico (C₇H₇NO₂), 0,02 g de riboflavina (C₁₇H₂₀N₄O₆) e 0,0002 g de ácido fólico (C₁₉H₁₉N₇O₆). Por fim, o volume foi completado com água destilada até 100 mL e o pH ajustado novamente para 6,5. A solução final foi esterilizada por filtração utilizando membrana Millipore com porosidade de 0,22 µm.

4.1.4.5.3 Solução de Elementos Traços (1000X)

Nas fermentações conduzidas em biorreator, tanto com hidrolisado quanto com meio sintético (controle), foi utilizada uma solução de Elementos Traços na

concentração de 0,025% (v/v). O preparo dessa solução também seguiu o protocolo descrito por Verduyn *et al.* (1992).⁷⁵ Para o preparo de 100 mL da solução, inicialmente foram dissolvidos 1,5 g de etilenodiamino tetracetato dissódico (EDTA) em 50 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 0,45 g de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), com ajuste do pH para 6,0. Posteriormente, os demais sais foram adicionados sequencialmente à solução, realizando-se o ajuste do pH para 6,0 após cada adição. Os compostos adicionados foram: 0,1 g de cloreto de manganês diidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,03 g de cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,03 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,04 g de molibdato de sódio hidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0,45 g de cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,3 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,1 g de ácido bórico (H_3BO_3) e 0,01 g de iodeto de potássio (KI). O volume da solução foi completado com água destilada até 100 mL, seguido de ajuste final do pH para 4,0. A solução foi esterilizada por filtração utilizando membrana Millipore com porosidade de 0,22 μm .

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Preparo do inóculo da Linhagem recombinante de *Komagataella phaffii* no meio de cultura rico

A linhagem P1HL2 da levedura *K. phaffii* foi plaqueada em placas de Petri que continham o meio de cultura sólido YPD. As placas eram mantidas em estufa incubadora de solo, à 30 °C por aproximadamente 48 horas, até crescimento de colônias isoladas (Figura 8). O plaqueamento era feito pela técnica de esgotamento.



Figura 8. Placa de Petri após crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii*.

O inóculo da linhagem recombinante de *K. phaffii* foi feito em duas etapas, com o meio de cultura líquido YPD/YPG, no caso das fermentações em erlenmeyers, ou YP2X, no caso das fermentações que seriam realizadas em biorreator. O procedimento consistiu em adicionar uma colônia isolada em 10 mL do meio de cultura líquido em tubos tipo Falcon de 50 mL. Os tubos eram colocados em shaker orbital de solo sob agitação de 200 rpm, a 30 °C. Após 48 h, o meio com as células era transferido para Erlenmeyer aletados de 1 L, que continha 250 mL do meio de cultura líquido (YPD, YPG ou YP2X) nas mesmas condições de rotação, temperatura e tempo de 24 h. Em seguida, o meio era centrifugado a 4700 rpm, por 10 min. O precipitado era resuspendido com água destilada estéril, em seguida, realizava-se a leitura de absorbância no comprimento de onda de 600 nm. Para as fermentações era calculado a DO inicial, sendo que a fermentação com alimentação em Erlenmeyer começava com DO 10 e as demais fermentações DO 5.

4.2.2 Determinação peso seco da linhagem P1HL2 de *K. Phaffii*

A concentração celular da linhagem recombinante de *K. phaffii* foi determinada por meio da técnica de obtenção do peso seco e construção da curva padrão (ensaio realizado em triplicata).

As placas de Petri foram previamente identificadas com o nome da linhagem P1HL2 da levedura *K. phaffii* e pesadas. Em seguida, foram submetidas à secagem em Estufa de Secagem e Esterilização a 120 °C por 24 horas, com o objetivo de remover a umidade residual. Após esse período, as placas foram resfriadas em dessecador por 1 hora. Posteriormente, foi adicionado 1 mL da suspensão cremosa contendo a levedura, e as placas foram novamente pesadas. A seguir, as amostras foram incubadas em estufa a 70 °C durante a noite (*overnight*). No dia seguinte, as placas foram resfriadas em dessecador por 1 hora e novamente pesadas. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante, indicando completa remoção da umidade.

As curvas de calibração foram obtidas utilizando as seguintes diluições seriadas: 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 e 1:512, conforme apresentado na Figura 9. Essas curvas eram periodicamente construídas com o objetivo de verificar a constância da correlação entre a massa seca de levedura e a densidade óptica, assegurando a confiabilidade das medições ao longo dos experimentos.

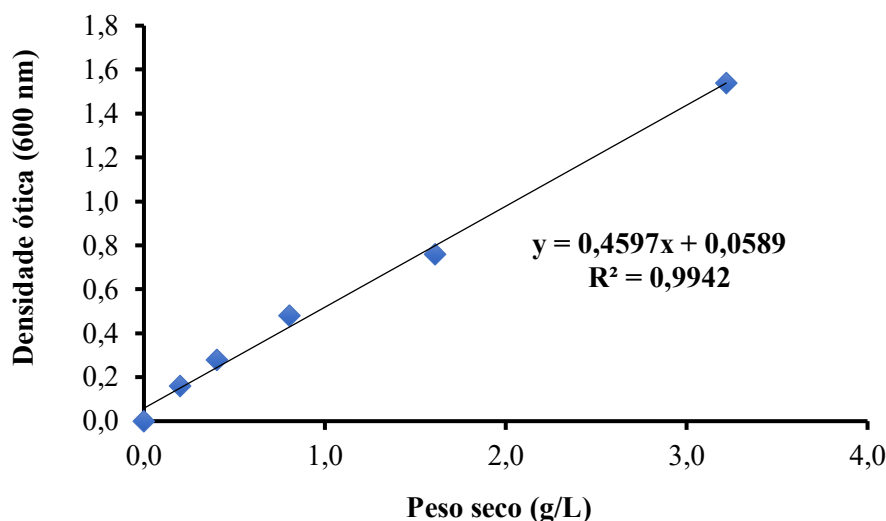


Figura 9. Gráfico de correlação de Peso Seco da linhagem recombinante P1HL2 com a densidade ótica.

4.2.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada por meio do método de quantificação de leveduras/esporos utilizando câmara de Neubauer. Esse procedimento consiste na contagem de células vivas e mortas por unidade de volume de uma suspensão celular, empregando-se uma solução corante de eritrosina para diferenciação das células inviáveis. As contagens foram realizadas em triplicata e, a partir dos resultados, calculou-se a média para estimativa do percentual de células viáveis. Essa análise foi conduzida no início das fermentações e repetida a cada coleta de amostra ao longo do processo fermentativo.

4.2.3.1 Contagem de Células Viáveis de Leveduras

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da suspensão de células e 1 mL da solução trabalho de eritrosina. Retirou-se 10 µL da solução contida no tubo de ensaio e colocou-se entre o retículo da câmara e a lamínula.

Com a câmara de Neubauer já preparada, ajustou-se o Microscópio Trinocular, para início da contagem celular o foco com a objetiva de 40x. Contaram-se as células incolores (vivas) e as células coradas de rosa (mortas) bem como os brotos contidos nos 25 quadrículos (16 retículos cada um), totalizando 400 retículos. Para evitar contar células a mais que estivessem sobre as linhas laterais, adotou-se o critério: para cada quadrado médio, contaram-se apenas as células que estavam em cima da linha superior e da linha à esquerda. Determinou-se a viabilidade celular conforme equação:

$$\text{Viabilidade celular(\%)} = \frac{\text{Total de células viáveis (vivas)}}{\text{Total de células (viáveis+não viáveis)}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.4 Estudo da fonte de carbono disponível para crescimento celular durante o processo fermentativo em batelada

Foram conduzidos experimentos de fermentação em batelada com o objetivo de avaliar o efeito de duas fontes de carbono distintas (glicose e glicerol) no crescimento da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* e na produção de ácido xilônico. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com relação volume de cultura/volume de frasco de 1:5, a 30 °C, por 96 h, sob agitação orbital a 200 rpm (Shaker MAXQ5000, Thermo Scientific). As concentrações iniciais foram ajustadas para aproximadamente 40 g/L de xilose e 10 g/L de glicose ou glicerol. Amostras foram coletadas nos tempos de 0, 6, 24, 48, 72 e 96 h, e posteriormente analisadas por UHPLC.



Figura 10. Fermentação em frasco Erlenmeyer de 250 mL, conduzida em shaker orbital, com a linhagem recombinante P1HL2, variando-se a proporção dos substratos glicerol/xilose.

4.2.5 Estudo da fonte de carbono disponível para crescimento celular durante o processo fermentativo em batelada alimentada

As fermentações foram conduzidas em frascos aletados Erlenmeyers Duran Baffled de 250 mL, incubados a 30 °C por 190 horas, sob agitação constante de 200 rpm em Shaker orbital de bancada (Mutitron Standard, Infors). As fermentações começaram com concentrações iniciais de 20 g/L de xilose e 40 g/L de glicerol ou glicose, conforme a condição experimental, e DO inicial de 10. As alimentações foram realizadas em intervalos de 24 horas, por meio da adição de uma solução concentrada de xilose a 200 g/L. Para o cálculo do volume a ser adicionado, assumiu-se o completo consumo da xilose anteriormente presente, de forma que, após a alimentação, a concentração no

meio fosse restabelecida a 20 g/L. As alimentações ocorreram aos 24, 48 e 72 horas de fermentação. No tempo de 96 horas, foi realizada nova alimentação visando atingir uma concentração de 40 g/L de xilose no meio. A última adição foi feita com 144 horas de processo, resultando em uma concentração final de 30 g/L de xilose no meio fermentativo. A única alimentação com glicerol ou glicose foi feita com 96 h de fermentação. Calculou-se o volume necessário de adição da solução 200 g/L de glicerol ou da solução 200 g/L de glicose, para que o meio ficasse com 20 g/L da fonte de carbono estudada na fermentação.

As amostras foram retiradas com os tempos reacionais: 0 h, 22 h, 46 h, 70 h, 94 h, 108 h, 142 h 166 h e 190 h e as amostras eram analisadas por *UHPLC*.

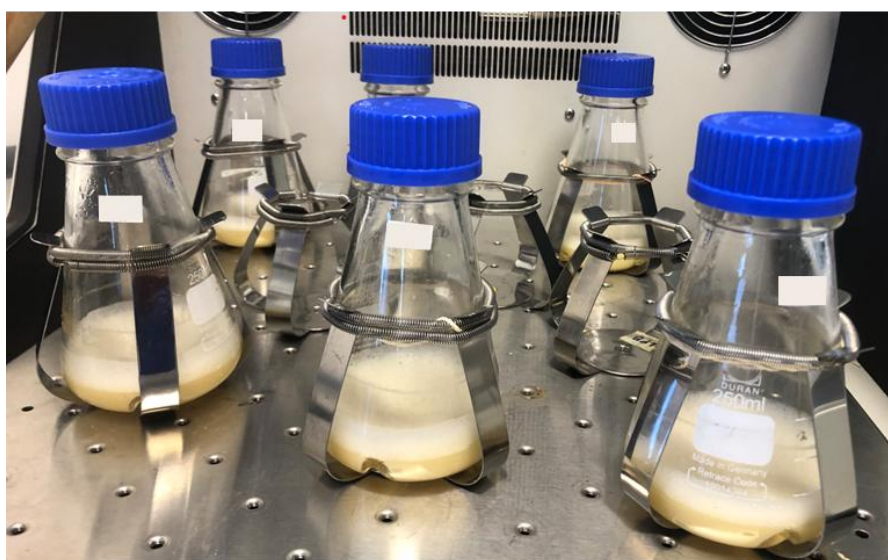


Figura 11. Fermentação em batelada alimentada com linhagem recombinante P1HL2, em frascos aletados Erlenmeyer de 250 mL, conduzida em Shaker orbital.

4.2.6 Estudo da razão dos substratos glicerol/xilose durante o processo fermentativo

Os experimentos foram conduzidos em modo batelada, utilizando meio contendo tampão ftalato de potássio ajustado para pH 5,2. As diferentes proporções entre glicerol e xilose avaliadas foram: 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 e 1:8. Em todos os ensaios, a concentração total inicial de substratos (glicerol + xilose) foi fixada em 60 g/L. Cada condição experimental foi realizada em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A Tabela 6 apresenta as concentrações específicas de glicerol e xilose utilizadas em cada uma das proporções testadas.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, incubados a 30 °C por um período de 96 horas, sob agitação constante de 200 rpm em shaker orbital. Amostras foram coletadas nos tempos reacionais de 0, 24, 48, 72 e 96 horas, e posteriormente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com ultra desempenho (UHPLC).

Tabela 6: Fermentações realizadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL com as diferentes proporções dos substratos glicerol: xilose.

Condição	Proporção	[Glicerol] (g/L)	[Xilose] (g/L)
1	1:1	30 g/L	30 g/L
2	1:2	20 g/L	40 g/L
3	1:4	12 g/L	48 g/L
4	1:6	8,6 g/L	51,4 g/L
5	1:8	6,7 g/L	53,3 g/L

4.2.7 Avaliação da produção de ácido xilônico pela levedura P1HL2, com controle de pH e fluxo constante de ar comprimido na fermentação

Os ensaios foram realizados em sistema de batelada alimentada, em biorreator de bancada de 1 L (Eppendorf – Dasgip Bioblock), com impelidor do tipo rushton, operado sob controle automático de temperatura, agitação, pH e com fornecimento contínuo de ar comprimido. O volume de trabalho inicial foi estabelecido em 40% da capacidade total do reator. Utilizou-se o meio YP2X, contendo concentrações iniciais de 40 g/L de glicerol e 20 g/L de xilose como fontes de carbono. A preparação do inóculo seguiu o protocolo previamente descrito.

As fermentações foram conduzidas sob temperatura controlada de 30 °C, com fluxo de ar comprimido de 0,800 L/min, agitação constante de 200 rpm e pH mantido em 5,5. As alimentações do meio fermentativo foram realizadas nos tempos reacionais de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas. Em cada ponto de alimentação, foi calculado o volume necessário de uma solução de xilose a 200 g/L, de modo que, após a adição, a concentração final de xilose no meio fosse ajustada para 20 g/L.

Com 48 h de fermentação, também alimentou o meio com glicerol. Calculou-se o volume necessário de adição da solução 200 g/L de glicerol para que o meio fermentativo ficasse com 20 g/L de glicerol.

Todas as alimentações foram realizadas por meio da bomba peristáltica acoplada ao próprio sistema do fermentador. As fermentações foram conduzidas por um período total de 240 horas. Amostras (alíquotas) foram coletadas em intervalos regulares de 24 em 24 horas, para posterior quantificação dos produtos fermentativos por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

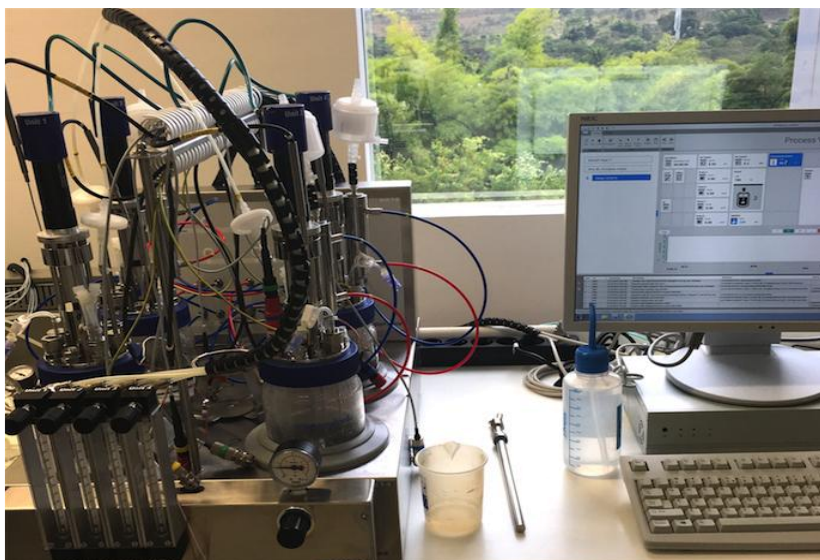


Figura 12. Sistema de Fermentação Eppendorf, modelo Dasgip Bioblock, utilizado para as fermentações em batelada alimentada com a linhagem recombinante P1HL2.

4.2.8 Estudo do uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em fermentações com a linhagem recombinante P1HL2

Os experimentos foram realizados com a adição do hidrolisado que foi diluído no meio de cultivo para concentrações finais de 10, 20 e 30% (v/v). Como controle (branco), foi realizada uma fermentação substituindo o hidrolisado por uma solução composta unicamente por xilose e glicerol, nas mesmas concentrações utilizadas nas demais condições.

As fermentações foram conduzidas em biorreator Infors HT (Figura 13), o volume de trabalho inicial foi estabelecido em 700 mL, correspondente a 70% da capacidade total do reator. Utilizou-se meio mínimo, composto por 25% (v/v) de solução de sais, 0,25% (v/v) de solução de elementos traço, 0,25% (v/v) de solução de vitaminas e 4 g/L de ureia como fonte de nitrogênio. As fermentações foram iniciadas com concentrações de 40 g/L de xilose e 10 g/L de glicerol como fontes de carbono.

Todas as fermentações foram conduzidas com a concentração inicial de xilose de 40 g/L. A partir desses dados, calculou-se o volume necessário de uma solução

suplementar de xilose (200 g/L) a ser adicionado, de modo que a concentração inicial de xilose no meio fermentativo fosse ajustada para 40 g/L.



Figura 13. Bioreator Infors HT, modelo Multifors 2, utilizado para as fermentações com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Os parâmetros operacionais do fermentador foram ajustados para temperatura de 30 °C, pH 5,5, agitação de 400 rpm e fluxo de oxigênio de 0,8 L/min. O controle de pH foi realizado por meio de bomba peristáltica acoplada ao sistema, utilizando solução de hidróxido de potássio (KOH) a 3 M. A fermentação teve duração total de 96 horas, com coletas de alíquotas realizadas nos tempos de 0, 15, 24, 48, 72 e 96 horas, para posterior quantificação dos produtos fermentativos por *UHPLC*.

4.2.9 Purificação e Recuperação do Ácido Xilônico obtido por Fermentação com a linhagem recombinante P1HL2

4.2.9.1 Troca iônica em coluna de vidro

No ensaio de troca iônica, foi empregada a resinas comercial Amberlite IRA-67 na forma Cl^- , classificada como resina aniônica de base fraca. A solução eluente utilizada foi bicarbonato de amônio a 1 M.

A resina Amberlite IRA-67 na forma Cl^- , classificada como aniônica de base fraca, apresenta grupo funcional amina terciária e possui matriz polimérica de acrílico em estrutura de gel. As partículas da resina possuem diâmetro na faixa de 500 a 700 μm , sendo adequada para aplicações em ambientes com pH variando entre 0 e 7. O processo de preparação consistiu em três lavagens consecutivas com água

destilada, com o objetivo de remover impurezas residuais e assegurar a estabilidade da forma iônica antes da utilização no experimento.⁷⁶

O procedimento experimental foi conduzido em quatro etapas sequenciais:

1. Carregamento com fermentado contendo ácido xilônico (14,37 g/L);
2. Lavagem com água deionizada para remoção de compostos não adsorvidos;
3. Eluição com solução de bicarbonato de amônio a 1,0 M;
4. Lavagem final com água deionizada para regeneração parcial da resina.

O ensaio foi realizado em coluna de vidro contendo membrana de retenção, também em vidro, para assegurar a estabilidade do leito fixo. Foram utilizados 22,2 g de resina Amberlit IRA-67, correspondentes ao volume de leito (*bed volume* - BV). O carregamento da coluna foi realizado sob fluxo contínuo com o auxílio de uma bomba peristáltica, sendo a vazão de eluição ajustada para 2,5 mL/min.

Após a eluição, a solução contendo ácido xilônico foi submetida a um banho térmico a 80 °C, com o objetivo de promover a evaporação parcial da água e a remoção do bicarbonato de amônio residual. Em seguida, a amostra foi congelada e submetida a liofilização por 24 horas, resultando na obtenção do ácido xilônico purificado. A Figura 14 apresenta o esquema representativo do experimento de troca iônica utilizando a resina Amberlite IRA-67 Cl⁻, empregado para a purificação do ácido xilônico.

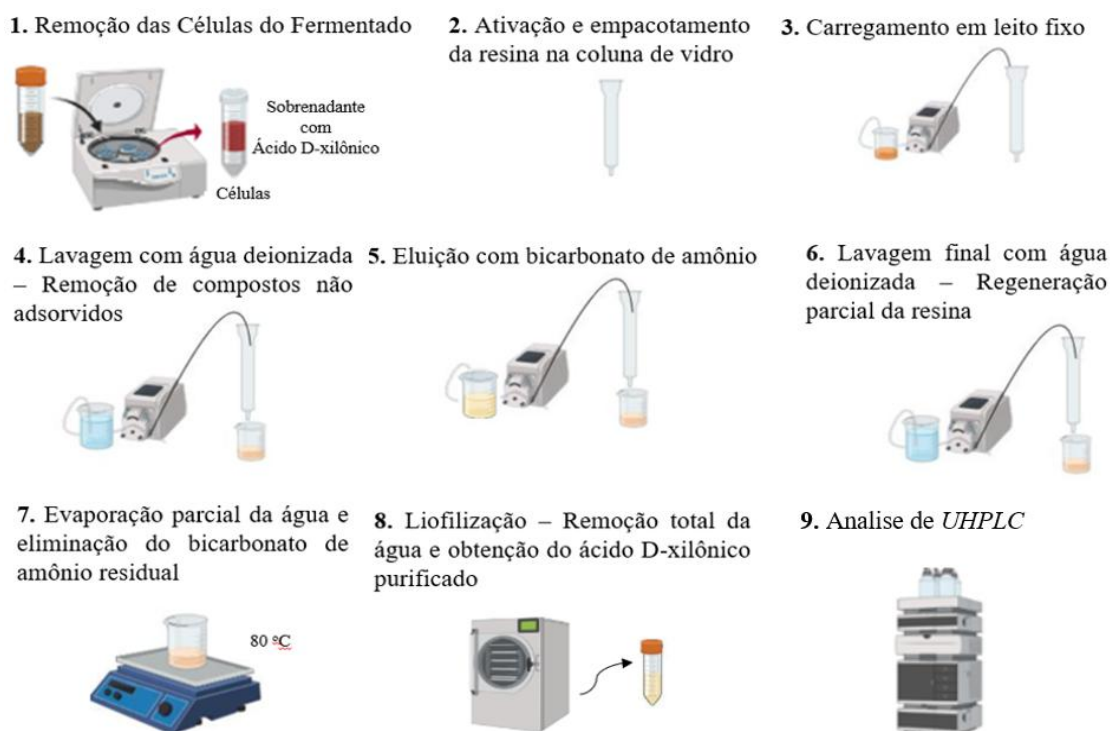


Figura 14. Procedimento de purificação do ácido xilônico por troca iônica com resina Amberlite IRA-67 Cl⁻.

4.2.9.2 Método de Precipitação com Etanol

4.2.9.2.1 Preparo de amostra obtida por fermentação para recuperação e purificação do ácido xilônico

Os ensaios de purificação do ácido xilônico, obtido após fermentação, foram realizados por meio de precipitação com etanol (EtOH), seguindo o protocolo descrito por Buchert *et al.* (1986). O procedimento adotado está representado Figura 15 na forma de esquema.⁷²

As soluções de ácido xilônico com concentrações de 30,1 g/L, 253,5 g/L e 447,8 g/L foram utilizadas nos ensaios. No caso das amostras mais concentradas, a água foi evaporada em banho maria com circulação externa. A temperatura utilizada no banho foi de 70 °C e a evaporação transcorreu até a obtenção do volume desejado, o que correspondeu à aproximadamente 12 h.

No ensaio destinado a avaliar a necessidade da etapa de clarificação, o concentrado contendo ácido D-xilônico foi submetido à descoloração com carvão ativado, seguida de filtração a vácuo utilizando membrana com porosidade de 0,22 µm.

A etapa subsequente consistiu na precipitação do ácido xilônico por adição de etanol (EtOH). Foram avaliadas diferentes razões volumétricas entre o agente precipitante e o concentrado de ácido xilônico, nas proporções 3:1, 4:1, 5:1 e 6:1 (v/v). Após a adição do EtOH, a mistura foi mantida em baixa temperatura por 12 h para promover a precipitação do composto.

A separação das fases (sobrenadante e precipitado) foi feita por centrifugação a 4700 rpm, por 10 min. O precipitado foi seco a vácuo por 12 h a 4 °C em liofilizador de solo.

Em todos os ensaios, foram determinados os percentuais de purificação e recuperação do ácido xilônico. Para tanto, o precipitado obtido após as etapas de precipitação com etanol e secagem a vácuo em liofilizador foi pesado. Amostras foram coletadas em cada etapa para análise por *UHPLC*. A partir da quantificação do ácido xilônico presente no precipitado, calculou-se o grau de pureza do material. O percentual de recuperação foi determinado considerando-se a massa de ácido xilônico na amostra inicial do concentrado utilizada no ensaio e a massa de ácido xilônico obtida no precipitado final.

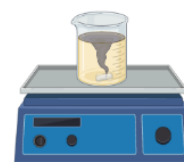
1. Remoção das Células



2. Concentração do ácido D-xilônico



3. Clarificação com carvão ativo



4. Filtração a vácuo



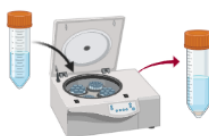
5. Precipitação do ácido D-xilônico com EtOH



6. Condicionar a mistura a baixa temperatura



7. Separação das Fases



8. Secagem a vácuo do precipitado (Liofilizador)



9. Analisar o precipitado purificado e o sobrenadante UHPLC



Figura 15. Adaptação do procedimento para purificação do ácido xilônico por precipitação com EtOH, segundo Buchert *et al.*⁷²

4.2.9.2.2 Estudo da importância da etapa de clarificação com carvão ativo durante processo de purificação do ácido xilônico

Segundo o procedimento descrito por Buchert *et al.* (1986), uma das etapas envolvidas no processo de purificação do ácido xilônico obtido por fermentação é a clarificação com carvão ativo seguida da filtração a vácuo com membrana 0.22 μm .⁷² Utilizou a solução 30,1 g/L de ácido xilônico em dois ensaios. Em um deles, a etapa de clarificação não foi realizada. No outro, transferiu-se 10 mL do concentrado para um béquer e adicionou-se 0,150 g de carvão ativado. A mistura ficou sob agitação por 30 min e, em seguida, foi filtrada a vácuo. Em ambos os casos, a precipitação do ácido xilônico foi realizada adicionando-se EtOH (3:1, v/v). As etapas subsequentes seguiram o procedimento descrito anteriormente e apresentado na Figura 14.

4.2.9.3 Avaliação da razão EtOH e quantidade ácido xilônico que deve ser empregado na etapa de precipitação para purificação do ácido xilônico

Avaliou-se a razão de EtOH e quantidade de ácido xilônico na etapa de precipitação. Esses ensaios foram feitos com o produto fermentativo concentrado com 30,1 g/L de ácido xilônico. A precipitação do ácido xilônico foi realizada adicionando-se EtOH nas seguintes razões: 3:1; 4:1, 5:1 e 6:1 (v/v). As etapas subsequentes seguiram o procedimento descrito anteriormente e apresentado na Figura 14.

4.2.9.4 Avaliação da concentração de ácido xilônico para o processo de purificação

Para avaliar o efeito da concentração de ácido xilônico na purificação, utilizou-se o produto da fermentação em biorreator com meio sintético (xilose/glicerol). Transferiu-se 10 mL da amostra com 279,8 g/L de ácido xilônico para três tubos do tipo falcon de 45 mL e 10 mL da amostra 447,8 g/L de ácido xilônico para outros três tubos do tipo falcon de 45 mL. Adicionou-se 30 mL de EtOH a frio em cada um dos tubos, obedecendo a razão 3:1 (v/v). Os tubos ficaram 96 h na geladeira, para maior precipitação a baixa temperatura. O processo de purificação seguiu com as etapas de separação, secagem do precipitado a vácuo, e análise de *UHPLC*.

4.2.10. Cálculo dos Parâmetros de Desempenho Fermentativo e de Purificação

Após a realização das fermentações, o rendimento foi determinado com base na Equação 2.

$$Y_{P/S} = -\frac{dP}{dS} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (2)$$

O rendimento foi expresso em $g_{\text{ácido xilônico}}/g_{\text{xilose}}$, onde P é a concentração do produto (g/L) e S é a concentração do substrato consumido (g/L). P_f e P_i são as concentrações finais e iniciais do produto. S_f e S_i são as concentrações finais e iniciais do substrato, respectivamente.

A produtividade do processo foi determinada pela concentração de ácido xilônico obtida em relação ao tempo da fermentação (equação 3), e expressa em $g_{\text{ácido xilônico}}/L \cdot h$.

$$Produtividade = \frac{dP}{dT} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i} = \frac{\text{Ácido Xilônico obtido } \left(\frac{g}{L}\right)}{\text{Tempo da fermentação (h)}} \quad (3)$$

A velocidade de consumo de substrato foi determinada pela quantidade de xilose consumida (g/L) com relação ao tempo de fermentação (h), conforme equação 4:

$$V = \frac{dS}{dT} = \frac{S_f - S_i}{T_f - T_i} \quad (4)$$

onde, S é a concentração do substrato consumido (g/L), sendo S_i a concentração inicial do substrato (g/L) e S_f a concentração final do substrato (g/L). T é o tempo transcorrido de fermentação, sendo T_i o tempo inicial da fermentação (h) e T_f o tempo final (h).

No modelo de Monod, a biomassa (X) é expressa como a concentração de células em peso seco por unidade de volume, enquanto μ (h^{-1}) representa a taxa específica de crescimento celular. A taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi determinada por meio da construção de um gráfico de $\ln(X/X_0)$ em função do tempo. O coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento foi utilizado como estimativa de $\mu_{m\acute{a}x}$.⁷⁷

A eficiência de recuperação de ácido xilônico nos diferentes métodos de purificação foi calculada em termos percentuais, tomando-se como referência a massa de ácido xilônico inicialmente presente na amostra obtida após fermentação, antes da aplicação do processo de purificação.

$$Recuperação (\%) = \frac{\text{Massa de ácido xilônico em cada etapa da purificação}}{\text{Massa de ácido xilônico do meio fermentativo}} \cdot 100 \quad (5)$$

A pureza foi determinada com base na proporção entre a massa seca da amostra obtida após a purificação e a concentração de ácido xilônico quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), após a solubilização da massa seca resultante da purificação em 5 mL de água.

$$Pureza (\%) = \frac{\text{Massa de ácido xilônico em cada etapa da purificação}}{\text{Massa seca total}} \cdot 100 \quad (6)$$

4.2.11 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação dos compostos presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi feita por meio de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), realizadas no equipamento Infinity 1260 Agilent Technology, com coluna

cromatográfica Aminex HPX-87H (BioRad), temperatura da coluna a 45 °C, detector índice de refração (RID), temperatura da cela do detector a 40 °C. A fase móvel para essa coluna cromatográfica corresponde uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M, com vazão de 0,600 mL/min. O tempo de retenção aproximado para a glicose é de 8,8 min, para a xilose é de 9,5 min, e para o ácido acético é de 15 min.

Foi preparada uma solução padrão com concentração inicial de 5 g/L, mediante a pesagem de 0,1250 g de glicose, xilose e ácido acético, todos reagentes de alta pureza. Os solutos foram dissolvidos em água Milli-Q e o volume final ajustado para 25 mL. A partir dessa solução padrão, foram preparadas seis diluições seriadas para construção da curva de calibração, com concentrações finais de 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 g/L.

As amostras a serem analisadas também foram diluídas de forma que a concentração estivesse dentro dos valores da curva padrão.

4.2.12 Análise de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

As quantificações dos substratos de fermentação, xilose, glicerol/glicose, bem como do produto ácido xilônico foram feitas por meio de análises de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão (UHPLC), realizadas no equipamento Waters UPLC Acquity H-Class, com detector ELSD, coluna cromatográfica BEH Amida Premium (2,1 mm X 100 mm; 1,7 µm), temperatura da coluna a 50 °C, temperatura da cela do detector a 40 °C. Essa coluna cromatográfica possui duas fases móvel: a primeira solução possui acetonitrila/água em proporção 80:20, acetato de amônio 10 mM, hidróxido de amônio 0,2%, e água destilada purificada em um sistema Milli-Q; a segunda solução possui acetonitrila/água em proporção 40:60, acetato de amônio 10 mM, hidróxido de amônio 0,2%, e água destilada purificada em um sistema Milli-Q. A vazão da fase móvel é 0,3 mL/min.

O equipamento foi utilizado conforme instruções fornecidas pelo fabricante, sendo necessária a construção de uma curva padrão com os compostos de interesse. A cada corrida, além das amostras, injetava-se também os padrões. Dessa forma, preparou-se uma solução padrão com concentração de 5 g/L, pesou-se 0,1250 g de glicose, xilose, ácido xilônico e glicerol, sendo que todos os reagentes utilizados eram de alta pureza. Solubilizou-se em água Milli-Q e a solução foi avolumada para 25 mL.

A partir dessa solução padrão 5 g/L, realizou-se 6 diluições com as seguintes concentrações de: 0,15625 g/L; 0,3125 g/L; 0,625 g/L; 1,25 g/L; 2,5 g/L; 5,0 g/L.

As amostras a serem analisadas também foram diluídas de forma que a concentração estivesse dentro dos valores da curva padrão. Após análise das amostras *UHPLC*, as concentrações obtidas para cada composto eram multiplicadas pelo fator de diluição.



Figura 16. Equipamento *UHPLC* utilizado para quantificação dos substratos (xilose, glicerol/glicose) e do produto das fermentações (ácido xilônico).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da glicose e do glicerol como fonte de carbono para crescimento celular durante a fermentação para produção de ácido xilônico

5.1.1 Fermentação em batelada

O primeiro parâmetro analisado nas fermentações com a linhagem recombinante P1HL2 de *K. phaffii* foi a fonte de carbono utilizada pela levedura para crescimento celular. Foram realizadas fermentações com glicose e com glicerol, além da fonte de carbono (xilose) para a produção do ácido xilônico.

A principal diferença observada comparando as fermentações com glicose e glicerol diz respeito à concentração celular. Apesar das fermentações terem iniciado com a mesma concentração de células, 10,75 g/L, durante toda a fermentação a concentração celular foi maior nas que continham glicerol no meio fermentativo (Figura 17). Como o glicerol esteve disponível ao longo de todo o cultivo, observou-se uma concentração final de biomassa aproximadamente 16% superior em relação à obtida com glicose como fonte de carbono. A compreensão das características de crescimento dos microrganismos empregados no bioprocesso é essencial, uma vez que o desempenho do sistema pode estar diretamente relacionado ao desenvolvimento celular.⁷⁸

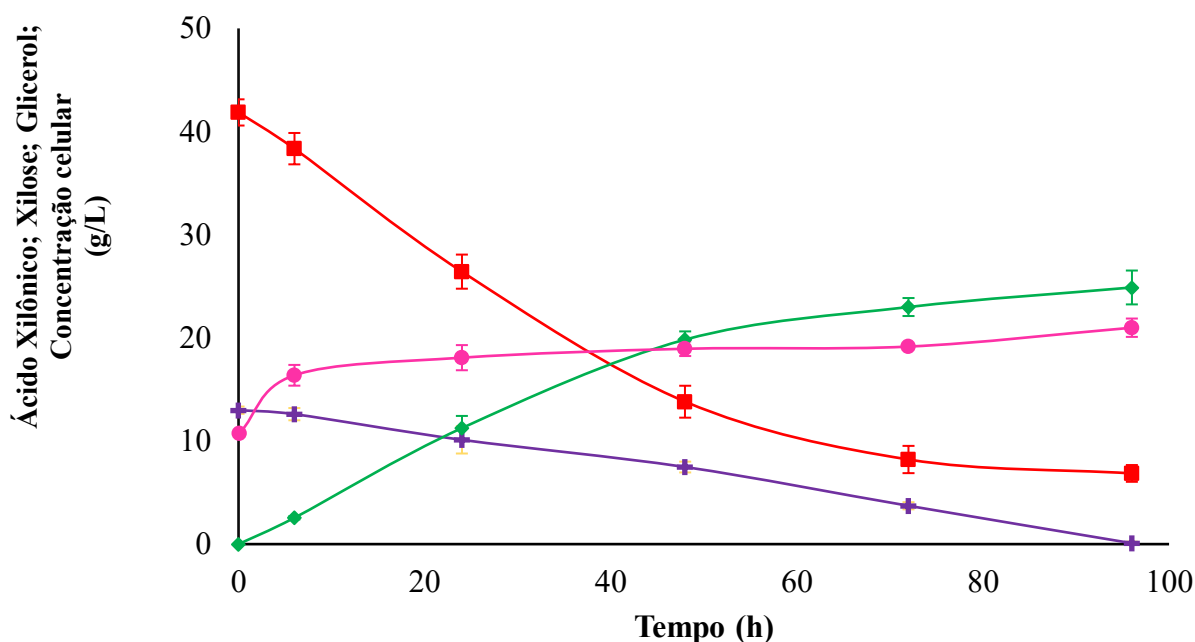


Figura 17. Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 96 h de fermentação com glicerol como fonte de carbono, bem como os perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicerol (+), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●).

A Figura 17 apresenta o gráfico da concentração celular da levedura P1HL2 os perfis de consumo dos substratos (xilose e glicerol) e formação do produto de interesse (ácido xilônico). Percebe-se que a concentração inicial de xilose foi de $41,86 \pm 1,27$ g/L, e de glicerol foi de $12,99 \pm 0,35$ g/L. Após 96 h de fermentação, obteve-se $24,88 \pm 1,64$ g/L de ácido xilônico. Além disso, a fonte de carbono disponível para crescimento celular, se esgotou após 96 h de fermentação.

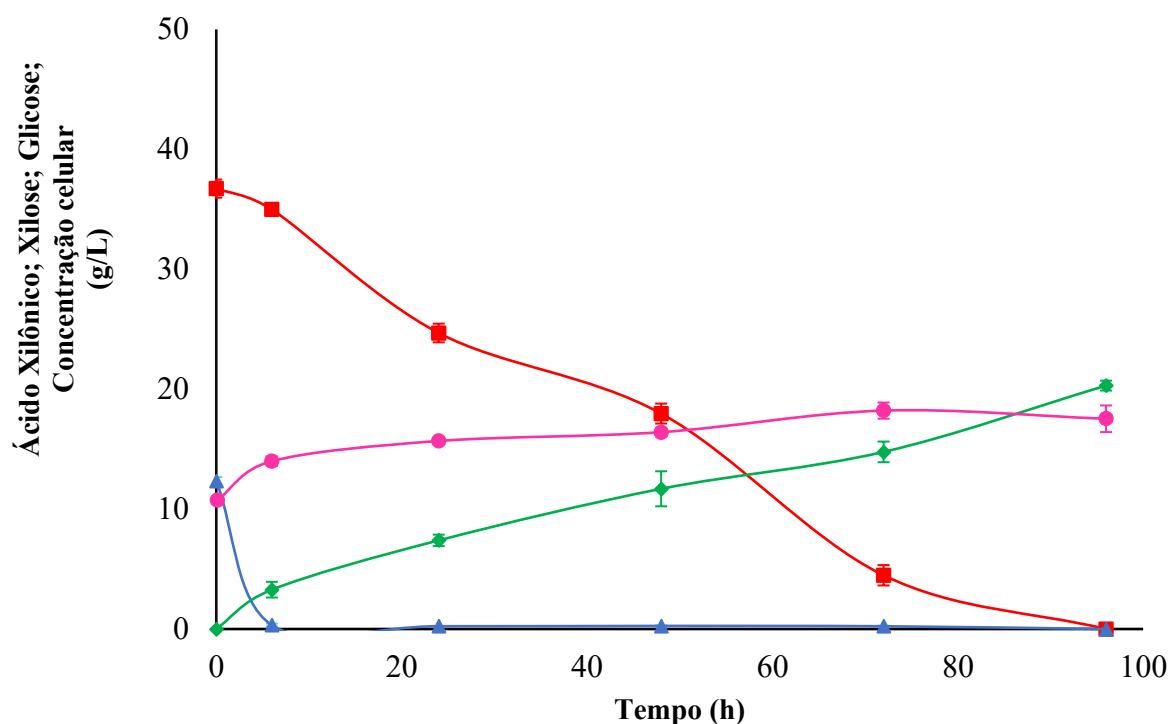


Figura 18. Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 96 h de fermentação com glicose como fonte de carbono, perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicose (▲), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●).

A Figura 18, por sua vez, apresenta o gráfico das concentrações de xilose, glicose e ácido xilônico no decorrer das fermentações, bem como a concentração celular da levedura P1HL2. A concentração inicial de xilose foi $36,72 \pm 0,76$ g/L e de glicose foi $12,35 \pm 0,31$ g/L. A concentração de ácido xilônico obtida após 96 h, foi de $20,30 \pm 0,31$ g/L. Diferentemente do observado nas fermentações com glicerol, para as fermentações com glicose, a fonte de carbono disponível para crescimento celular acabou com apenas 6 h de fermentação.

A taxa de crescimento específica (μ) é um parâmetro que reflete o estado fisiológico do microrganismo e influencia diretamente sua capacidade de produzir o metabólito de interesse.⁷⁹ Dessa forma, o parâmetro μ influencia quatro aspectos

principais do bioprocesso em questão: a produção de biomassa, o estado celular, e tanto a quantidade como a qualidade do produto final.⁷⁸ Com isso, a fonte limitante de carbono (glicose ou glicerol), bem como a taxa específica de crescimento (μ) são parâmetros cruciais para o desenvolvimento e otimização de determinado bioprocessos.^{63,80}

No estudo realizado, a taxa específica de crescimento foi maior para as fermentações com glicerol ($0,10 \text{ h}^{-1}$), sendo $0,06 \text{ h}^{-1}$ para as fermentações com glicose (Tabela 7). A explicação para μ ter sido maior nas fermentações com glicerol pode estar associada ao metabolismo da levedura *K. phaffii*. Isso porque, o genoma da proteína possui 4 genes para transportadores de glicerol, levando a altas taxas específicas de crescimento, quando substrato é utilizado.⁶⁴

Melo *et al.* (2018) caracterizaram a produção de ácido láctico em culturas recombinantes de *K. phaffii* utilizando glicerol como fonte de carbono em condições aeróbicas com restrição de oxigênio, mostram em seus resultados taxas de crescimento específicas limitadas ($\mu = 0,015 - 0,028 \text{ h}^{-1}$), com a análise cinética indicando a disponibilidade de oxigênio como o principal fator limitante do crescimento nesses sistemas de fermentação.⁸¹

Tabela 7: Parâmetros obtidos após fermentações com glicose e fermentações com glicerol.

	Fermentações com Glicose	Fermentações com Glicerol
μ (taxa específica de crescimento) (h^{-1})	0,06 *	0,10 *
Ácido Xilônico obtido (g/L)	$20,30 \pm 0,41$	$24,88 \pm 1,64$
Ácido Xilônico obtido (g)	$0,91 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,07$
Y P/S ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}} / \text{g}_{\text{xilose}}$)	$0,50 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,03$
Produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}} / \text{L.h}$)	0,21 *	$0,26 \pm 0,02$
Velocidade consumo substrato ($\text{g}_{\text{xilose}} / \text{L.h}$)	$0,38 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$
Xilose residual (g/L)	0,0	$6,86 \pm 0,81$

As concentrações iniciais do substrato são apresentadas nas Figuras 17 e 18.

* Erro abaixo de 0,00.

A Tabela 7 mostra o fator de conversão do substrato em produto $Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}} / \text{g}_{\text{xilose}}$), a produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}} / \text{L.h}$), e a velocidade de consumo do substrato

xilose ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{L}\cdot\text{h}$). Observa-se que o glicerol apresenta desempenho superior à glicose como fonte de carbono para a produção de ácido xilônico. As fermentações conduzidas com glicerol resultaram em um aumento de 18,4% na concentração de ácido xilônico, com rendimento 9% superior e produtividade 19% maior em relação às fermentações realizadas com glicose.

Na fermentação com glicerol como fonte de carbono, a taxa de consumo de xilose foi de $0,36 \pm 0,01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, com concentração residual de $6,86 \pm 0,81 \text{ g/L}$ após 96 h. Embora a xilose não tenha sido totalmente consumida, a presença de glicerol favoreceu o crescimento celular, resultando em maior biomassa e, conseqüentemente, em maior rendimento, produtividade e concentração final de ácido xilônico.

Nas fermentações com glicose, a xilose foi consumida mais rapidamente ($0,38 \pm 0,01 \text{ g/L}\cdot\text{h}$), com produtividade de $0,21 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L}\cdot\text{h}$ e fator de conversão de $0,50 \pm 0,01 \text{ g/g}$, mas o crescimento celular foi menor. Esses resultados mostram que o glicerol atua como uma fonte eficiente para o desenvolvimento da levedura e produção de ácido xilônico.

Dessa forma, após análise de todos os resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que o glicerol é uma boa fonte de carbono para o crescimento da linhagem recombinante P1HL2 da *K. phaffii*. Os parâmetros relacionados ao desempenho do processo, como o fator de conversão de substrato em produto e a produtividade, apresentaram valores semelhantes entre as condições avaliadas, porém foram superiores nas fermentações conduzidas com glicerol.

Além disso, o glicerol representa uma fonte de carbono atrativa para bioprocessos devido ao seu baixo custo e alta abundância como subproduto do biodiesel. Sua utilização como substrato de fermentação agrega valor à cadeia produtiva do biodiesel, ao mesmo tempo em que fornece uma matéria-prima econômica para o crescimento microbiano.⁶³

A levedura *K. phaffii* possui a capacidade de usar tanto a glicose quanto o glicerol como fontes de carbono. Segundo Mattanovich *et al.* (2009), a presença de 4 genes no genoma da proteína, que codificam para proteínas do simporte H^+ / glicerol, faz com que a utilização do glicerol para crescimento do microrganismo seja eficiente.⁶⁴ Com isso, alguns estudos já relataram o uso eficaz de glicerol bruto e/ou puro como fonte de carbono por *K. phaffii* na produção de proteínas heterólogas, enzimas industriais e produtos químicos de alto valor agregado.^{60–63}

5.1.2 Fermentação em batelada alimentada com a linhagem recombinante com P1HL2

Com base nos resultados obtidos nas fermentações em batelada, observou-se que o crescimento celular ocorre predominantemente nas fases iniciais do cultivo, tanto quando se utiliza o glicerol quanto a glicose como fonte de carbono para esse propósito. Além disso, verificou-se que, enquanto a glicose é rapidamente consumida, o glicerol permanece disponível no meio ao longo de todo o processo fermentativo. Visando proporcionar condições ideais para o crescimento celular nas etapas iniciais da fermentação, optou-se pela realização de experimentos em batelada alimentada. Nessa estratégia, foram inicialmente adicionados ao meio aproximadamente 40 g/L de glicose ou glicerol. A partir das 24 horas iniciais de cultivo, xilose foi suplementada ao meio a cada 24 horas, com o objetivo de favorecer a produção de ácido xilônico. A Figura 19 apresenta o perfil da fermentação conduzida com glicerol.

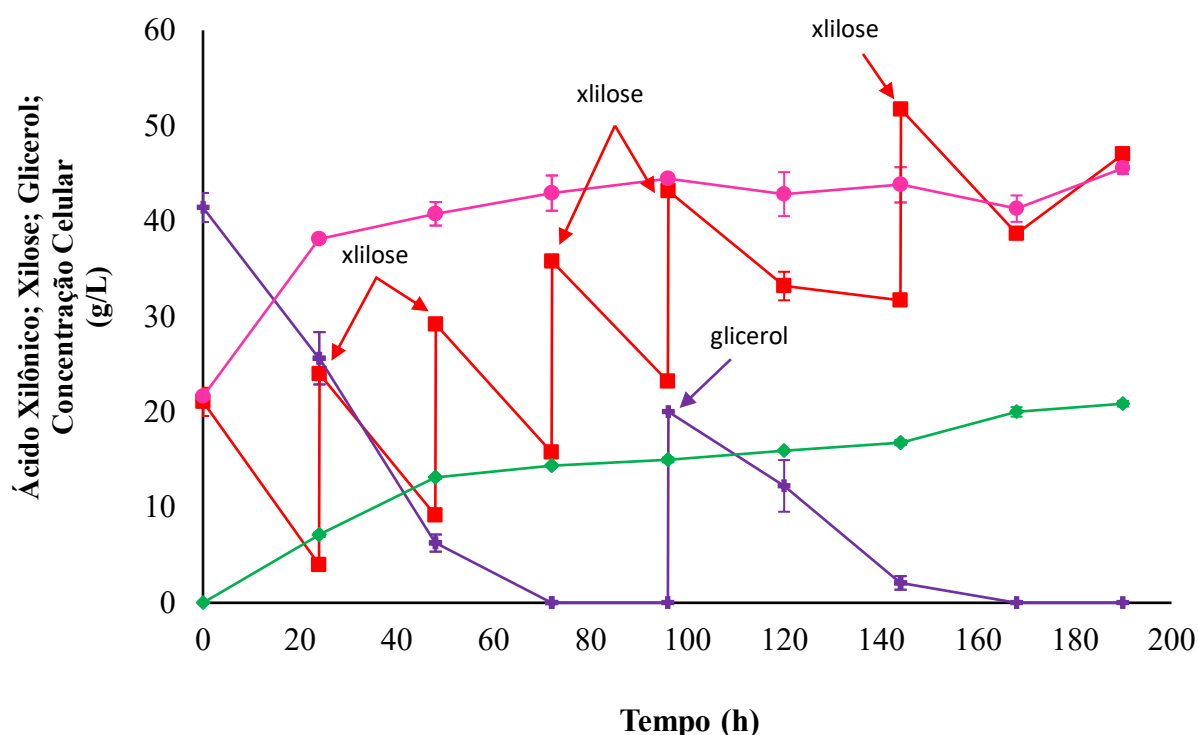


Figura 19. Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 190 h de fermentação com glicerol como fonte de carbono, bem como os perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicerol (+), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●).

As concentrações iniciais de xilose e glicerol foram de $21,06 \pm 1,48$ g/L e $41,43 \pm 1,53$ g/L, respectivamente (Figura 19), e após 24 h do início da fermentação, o meio

ainda possuía $25,63 \pm 2,74$ g/L de glicerol, o qual foi totalmente consumido somente após 72 h de fermentação. Como com 96 h de fermentação, não havia mais glicerol no meio fermentativo, alimentou-se o meio com solução 200 g/L de glicerol, para que a concentração no meio fermentativo fosse 20 g/L de glicerol. Com 118 h, a concentração de glicerol presente no meio foi de $12,25 \pm 2,71$ g/L. O glicerol acrescentado no meio fermentativo acabou após 70 h da adição (166 h de fermentação).

O perfil de concentração de xilose apresenta uma queda apenas nas primeiras 24 h. Considerava-se que toda a xilose havia sido consumida a cada 24 h, e com isto era adicionado um volume da solução estoque de xilose (200 g/L) de forma que a concentração final no meio fermentativo fosse de 20 g/L de xilose. Com 96 h, alimentou-se o reator para que a concentração de xilose meio fermentativo fosse de 40 g/L. A última alimentação foi feita com 144 h, e a concentração final de xilose no meio fermentativo foi de 30 g/L. Somando todas as alimentações, a quantidade de xilose adicionada no meio foi de 7,49 g. Após 190 h de fermentação, o meio ainda continha $47,01 \pm 0,24$ g/L de xilose. Como o volume final ocupado do Erlenmeyer foi de 82 mL, a quantidade mássica de xilose restantes no meio corresponde a $3,87 \pm 0,02$ g. A fermentação transcorreu por 190 h, e ao final, obteve-se $20,87 \pm 0,30$ g/L de ácido xilônico.

Os ensaios realizados com glicose como fonte de carbono estão representados na Figura 20. As concentrações iniciais de xilose e glicose foram, respectivamente, $17,59 \pm 0,74$ g/L e $37,11 \pm 1,47$ g/L. Observa-se que a glicose foi rapidamente consumida nas primeiras horas de fermentação, e, após 24 horas de cultivo, sua concentração no meio já era nula. Esse comportamento é consistente com o observado nas fermentações em batelada com glicose (Figura 18), indicando que essa fonte de carbono é rapidamente assimilada durante a fase de crescimento celular. No entanto, 20 g/L de glicose foram fornecidos somente após 96 horas de fermentação para manter as condições usadas para a fermentação de glicerol. Com 118 h, a concentração de glicose no meio era de $15,93 \pm 0,29$ g/L, sendo que a glicose acrescentada no meio fermentativo acabou após 70 h da adição (166 h de fermentação).

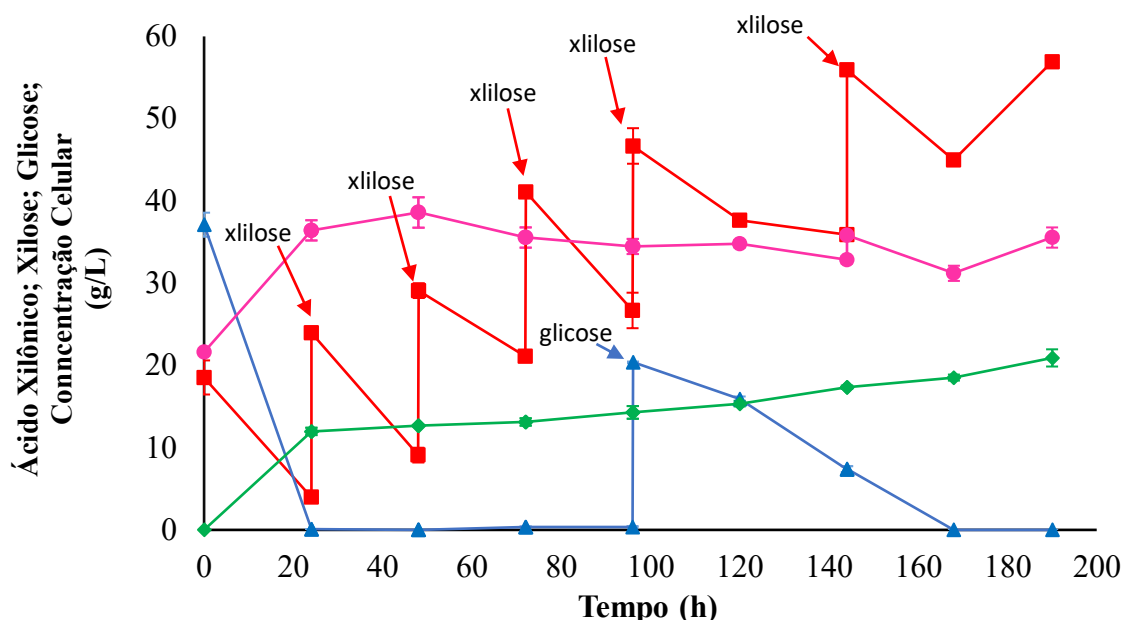


Figura 20. Perfil de crescimento celular da linhagem P1HL2 de *K. phaffii* ao longo de 190 h de fermentação com glicose como fonte de carbono, bem como os perfis de consumo dos substratos e formação de ácido xilônico. Os dados representam: xilose (■), glicose (▲), ácido xilônico (◆) e concentração celular (●).

A alimentação com xilose foi feita seguindo as mesmas concentrações e tempos reacionais descritos anteriormente para as fermentações com glicerol. Somando todas as alimentações, a quantidade de xilose adicionada no meio foi 7,49 g. Após 190 h de fermentação, o meio ainda continha $56,91 \pm 0,11$ g/L de xilose, o que corresponde a $4,69 \pm 0,01$ g de xilose. A fermentação transcorreu por 190 h, e ao final, obteve-se $20,91 \pm 1,05$ g/L de ácido xilônico.

Embora as fermentações conduzidas com glicerol e glicose tenham sido iniciadas com a mesma concentração celular (21,63 g/L), observou-se que, ao longo de todo o processo, a concentração de biomassa foi consistentemente mais elevada nas condições em que o glicerol foi utilizado como fonte de carbono (Figura 19), comportamento também verificado nas fermentações em batelada (Figura 17). No entanto, a taxa específica de crescimento (μ) foi idêntica para ambas as condições em batelada alimentada, com valor de $0,07 \text{ h}^{-1}$, diferindo das taxas obtidas nas fermentações em batelada, previamente apresentadas na Tabela 7.

Após analisar os resultados obtidos e apresentados nas Figuras 19 e 20, foi possível calcular os parâmetros fermentativos. Como os meios foram alimentados durante a fermentação, levou-se em consideração a massa total de xilose adicionada no meio, e a massa de ácido xilônico obtido para cálculo do fator de conversão do

substrato em produto $Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{g}_{\text{xilose}}$). A velocidade de consumo do substrato ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{h}$) também foi calculada com o valor mássico da xilose. Também foi possível calcular a produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$) do processo. Os valores obtidos estão apresentados a Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros obtidos após fermentações, em batelada alimentada, com glicose e com glicerol.

	Fermentações com Glicose	Fermentações com Glicerol
μ (taxa específica de crescimento) (h^{-1})	0,07 *	0,07 *
Ácido Xilônico obtido (g/L)	$20,91 \pm 1,05$	$20,87 \pm 0,30$
Ácido Xilônico obtido (g)	$1,72 \pm 0,09$	$1,72 \pm 0,03$
$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{g}_{\text{xilose}}$)	$0,46 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,01$
Produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$)	0,11 *	0,11 *
Velocidade consumo substrato ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{h}$)	0,04 *	0,04 *
Xilose residual (g/L)	$56,91 \pm 0,11$	$47,01 \pm 0,24$

As concentrações iniciais do substrato são apresentadas nas Figuras 19 e 20.

Um total de 8,49 g de xilose foi utilizado em cada fermentação de pulso.

* Erro abaixo de 0,00.

Com base nos parâmetros fermentativos apresentados na Tabela 8, a quantidade de ácido xilônico obtida após as 190 h de fermentação com glicerol foi similar a obtida pelas fermentações com glicose. A velocidade de consumo do substrato ($0,04 \text{ g}_{\text{xilose}}/\text{h}$), bem como a produtividade ($0,11 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$) foram similares. No entanto, as fermentações com glicose apresentaram uma conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) maior, de $0,46 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{g}_{\text{xilose}}$, em comparação às fermentações com glicerol com $0,37 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{g}_{\text{xilose}}$.

Com base na análise dos resultados obtidos para as fermentações em batelada e em batelada alimentada, o glicerol se mostrou uma boa fonte de carbono para crescimento celular da linhagem recombinante P1HL2. Apesar dos processos terem iniciado com concentração celular diferentes ($10,75 \text{ g/L}$ nas fermentações em batelada e $21,63 \text{ g/L}$ nas fermentações com alimentação), em ambos os estudos o crescimento celular foi maior quando o glicerol correspondia a fonte de carbono disponível para a levedura.

Além disso, nas fermentações em batelada, a concentração de ácido xilônico, o fator de conversão de substrato em produto e a produtividade, foram maiores para as fermentações com glicerol (Tabela 8).

Vale ressaltar que, independentemente da fonte de carbono, o fator de conversão de substrato em produto foi menor para as fermentações em batelada alimentada, comparados aos valores obtidos nas fermentações em batelada. Nos processos com alimentação, $Y_{P/S}$ obtido foi de $0,46 \pm 0,03$ g ácido xilônico/g xilose para as fermentações com glicose, e $0,37 \pm 0,01$ g ácido xilônico/g xilose para as fermentações com glicerol (Tabela 8). Em contrapartida, em sistema de batelada, $Y_{P/S}$ obtido foi de $0,50 \pm 0,01$ g ácido xilônico/g xilose para as fermentações com glicose, e $0,55 \pm 0,03$ g ácido xilônico/g xilose para as fermentações com glicerol (Tabela 7).

Considerando que as fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer, a razão entre o volume do meio fermentativo e a capacidade total do frasco exerce influência significativa sobre o processo, especialmente no que diz respeito à disponibilidade de oxigênio. Em fermentações do tipo batelada alimentada, o volume do meio aumenta progressivamente ao longo do tempo, e a quantidade de oxigênio disponível diminui. Nas fermentações em batelada, foi utilizado um volume correspondente a 20% da capacidade total do frasco. Já ao final das fermentações em batelada alimentada, o volume total atingido foi de 82 mL, representando 32,8% da capacidade do Erlenmeyer. Esses dados indicam que pode ter havido limitação de oxigênio nas fermentações em frascos, o que é corroborado pelo perfil de crescimento celular observado.

Durante a fermentação aeróbica, espécies reativas de oxigênio são formadas. Essas espécies podem causar estresse oxidativo no microrganismo utilizado no processo fermentativo. As células microbianas possuem sistemas defensivos enzimáticos e não enzimáticos que podem protegê-las do dano oxidativo.⁸² Como resultado, quando a ausência de oxigênio ultrapassa a capacidade dos sistemas de defesa celular, a levedura pode sofrer estresse oxidativo, o que interfere no crescimento celular durante a fermentação e na conversão do substrato no produto de interesse.⁸³

O glicerol foi selecionado como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo e empregado em todos os estudos subsequentes, devido à sua eficácia no suporte ao desenvolvimento da levedura P1HL2 em fermentações do tipo batelada e batelada alimentada.

Além disso, o glicerol destaca-se como uma fonte de carbono economicamente mais viável em comparação à glicose, principalmente por ser um subproduto amplamente disponível da indústria de biodiesel. Enquanto a glicose apresenta limitações associadas à sua demanda nas indústrias alimentícia e de rações, o glicerol

bruto, por sua vez, possui custo reduzido e maior disponibilidade. Sua utilização em bioprocessos não apenas reduz os custos operacionais, mas também contribui para a sustentabilidade do processo ao agregar valor à cadeia produtiva do biodiesel por meio do aproveitamento de resíduos industriais.^{63,84}

5.2 Avaliação da razão entre as fontes de carbono glicerol, para o crescimento do microrganismo, e xilose, para a produção do ácido xilônico

A fim de avaliar o efeito da razão entre os dois substratos glicerol/xilose (1:1, 1:2; 1:4; 1:6 e 1:8), foram conduzidas fermentações em frascos Erlenmeyer. A Figura 21 apresenta os resultados referentes à viabilidade celular e à concentração da biomassa de levedura ao longo do tempo, em cada uma das condições avaliadas. Em todos os ensaios realizados, a concentração celular inicial foi de 8,34 g/L, com viabilidade de 100%. Os perfis de crescimento celular apresentaram comportamento semelhante entre as diferentes condições experimentais. No entanto, ao término de 96 horas de fermentação, a condição 3, correspondente à razão glicerol/xilose de 1:4, resultou na maior concentração celular, atingindo aproximadamente $29,17 \pm 0,50$ g/L. Para as demais condições avaliadas, os valores de concentração celular final foram similares, considerando-se o desvio padrão obtido nas análises realizadas em triplicata.

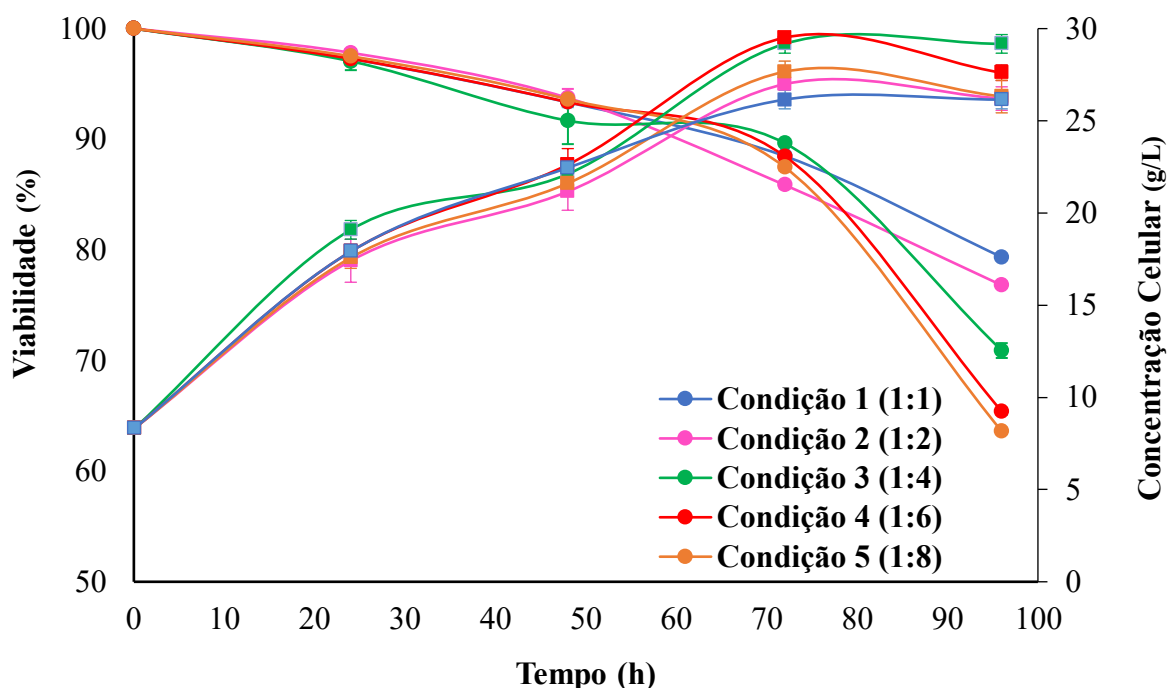


Figura 21. Perfis de viabilidade (•) e concentração celular (■) da levedura P1HL2, durante as fermentações com diferentes razões dos substratos glicerol/xilose.

Após as 96 horas de fermentação, as condições 1 (razão glicerol/xilose de 1:1) e 2 (1:2) apresentaram os maiores percentuais de células viáveis, com valores de $79,34 \pm 0,13\%$ e $77,00 \pm 0,13\%$, respectivamente. Essas condições correspondiam às maiores concentrações iniciais de glicerol, conforme demonstrado na Figura 21. Em contraste, as condições 4 (1:6) e 5 (1:8), que apresentavam as menores concentrações iniciais de glicerol, resultaram nas menores porcentagens de viabilidade celular, $63,60 \pm 0,16\%$ e $65,00 \pm 0,31\%$, respectivamente.

A condição 3 (1:4) apresentou maior concentração celular ao final das 96 h, com $29,17 \pm 0,29$ g/L e viabilidade de $71 \pm 0,67\%$, sugerindo que uma proporção intermediária de glicerol em relação a xilose favorece o acúmulo de biomassa, ainda que com viabilidade ligeiramente inferior às condições com maior teor de glicerol.

É importante destacar que, embora tanto o glicerol quanto a xilose sejam substratos presentes no meio, o glicerol atua como fonte de carbono assimilável para o crescimento celular da levedura. Assim, observou-se uma correlação positiva entre a disponibilidade de carbono, proveniente do glicerol, e a manutenção da viabilidade celular durante o processo fermentativo.

A Figura 22 apresenta o perfil de consumo de glicerol e da xilose ao longo das fermentações.

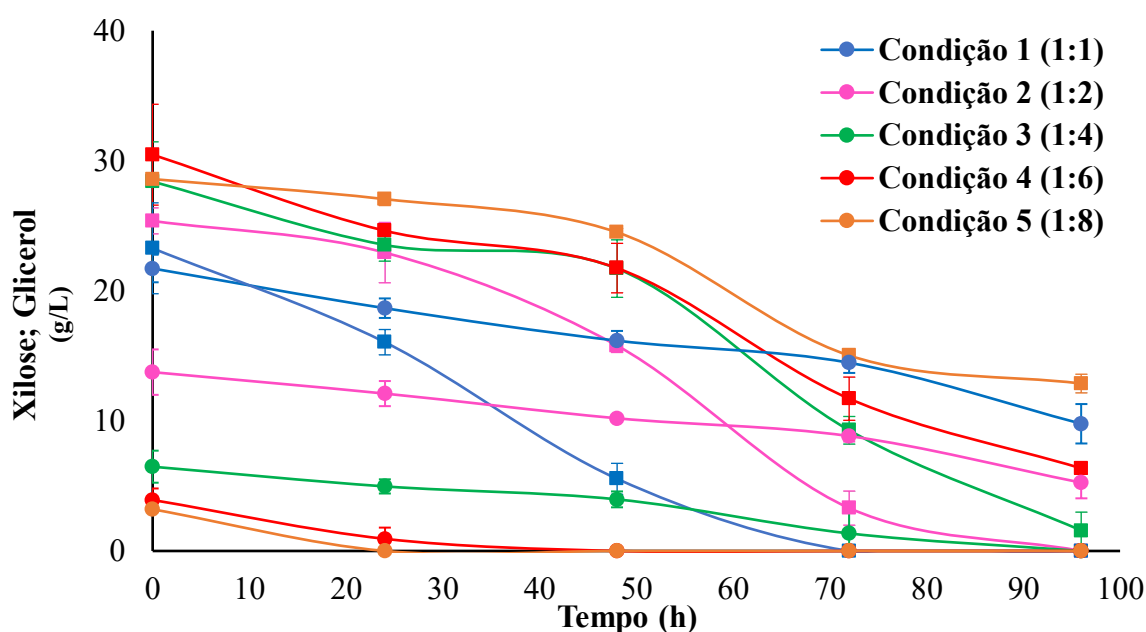


Figura 22. Perfis de concentração de xilose (■) e glicerol (●) durante as fermentações com a levedura P1HL2, em diferentes razões dos substratos glicerol/xilose.

Com base nos perfis de concentração de xilose apresentados na Figura 22, observa-se que a condição 1 (razão glicerol/xilose de 1:1) apresentou a cinética de

consumo de xilose mais acelerada. Nessa condição, após 72 horas de fermentação, a xilose foi completamente consumida em todas as replicadas. De forma semelhante, nas fermentações conduzidas sob a condição 2 (1:2), a depleção total da xilose também foi observada, embora apenas ao final das 96 horas de processo. Em contraste, a condição 5 (1:8), que iniciou a fermentação com $28,59 \pm 0,13$ g/L de xilose, apresentou uma cinética de consumo significativamente mais lenta, resultando em uma concentração residual de xilose de $12,87 \pm 0,72$ g/L ao término das 96 horas de fermentação.

Em relação aos perfis de concentração de glicerol, observa-se que, após 24 horas de fermentação, o glicerol foi completamente consumido nas replicadas da condição 5 (razão glicerol/xilose de 1:8). Essa condição apresentava a menor concentração inicial de glicerol entre todas as avaliadas, com valor de $3,21 \pm 0,01$ g/L. Esses resultados indicam que, quanto menor a disponibilidade inicial de glicerol no meio fermentativo, mais rapidamente ocorre o esgotamento dessa fonte de carbono utilizada para o crescimento celular da levedura. Tal esgotamento precoce pode limitar o desempenho metabólico da levedura ao longo da fermentação, resultando em menor produção de biomassa, como observado nos perfis de concentração celular (Figura 21).

Em contrapartida, as condições 1 (razão glicerol/xilose de 1:1) e 2 (1:2) apresentaram as maiores concentrações iniciais de glicerol, e após 96 horas de fermentação, essas foram as únicas condições em que ainda se detectava glicerol residual no meio, com concentrações de $9,78 \pm 1,52$ g/L para a condição 1 e $5,25 \pm 1,20$ g/L para a condição 2.

Na condição 3 (1:4), o consumo total do glicerol ocorreu com 96h. A xilose apresentou consumo quase completo, restando apenas $1,60 \pm 1,42$ g/L no meio ao término do processo (Figura 22). Esses resultados mostram que a proporção entre glicerol e xilose influencia não só a velocidade de consumo de cada substrato, mas também o equilíbrio entre o crescimento celular e o aproveitamento dos açúcares, o que pode impactar diretamente o rendimento final de ácido xilônico.

A análise conjunta dos perfis de consumo de xilose e glicerol (Figura 22) demonstra que, nas condições 4 (razão glicerol/xilose de 1:6) e 5 (1:8), o glicerol foi rapidamente esgotado, enquanto se observou acúmulo de xilose residual no meio ao final das fermentações. Este resultado pode ser explicado pela função distinta de cada substrato no metabolismo da *K. phaffii*. Enquanto o glicerol é utilizado como fonte de

carbono e energia para o crescimento celular, a xilose é convertida exclusivamente em ácido xilônico por uma via oxidativa não competitiva. A concentração inicial de xilose foi 8 vezes superior à de glicerol na condição 4 e 9 vezes superior na condição 5, o que pode ter resultado em um desequilíbrio metabólico. Devido à baixa disponibilidade de glicerol, o crescimento celular foi limitado, especialmente nas primeiras 24 horas de fermentação, quando o glicerol foi completamente consumido. Como consequência, a biomassa gerada foi insuficiente para promover a conversão eficiente da xilose em ácido xilônico, refletindo na maior quantidade de açúcar residual observada. Esses resultados reforçam a importância de uma adequada proporção entre os substratos, de modo a garantir simultaneamente o crescimento celular e a atividade enzimática necessária para a bioconversão da xilose.

O oposto foi observado nas condições 1 (1:1) e 2 (1:2), ou seja, a xilose se esgotou e restou glicerol no meio após as 96 h de fermentação. Como a quantidade inicial de glicerol era alta, comparada as demais condições, ele estava em excesso no meio, e não foi totalmente consumido pela levedura. A xilose por sua vez, estava em menor quantidade, comparada as demais condições, sendo totalmente consumida. Esse resultado evidencia que, quando a disponibilidade de glicerol é adequada para sustentar o crescimento celular da *K. phaffii*, a levedura atinge um nível de biomassa suficiente para realizar de forma mais eficiente o consumo da xilose, consequentemente sua conversão em ácido xilônico.

A Figura 23 apresenta as concentrações de ácido xilônico obtidas nas fermentações com as diferentes razões de glicerol/xilose.

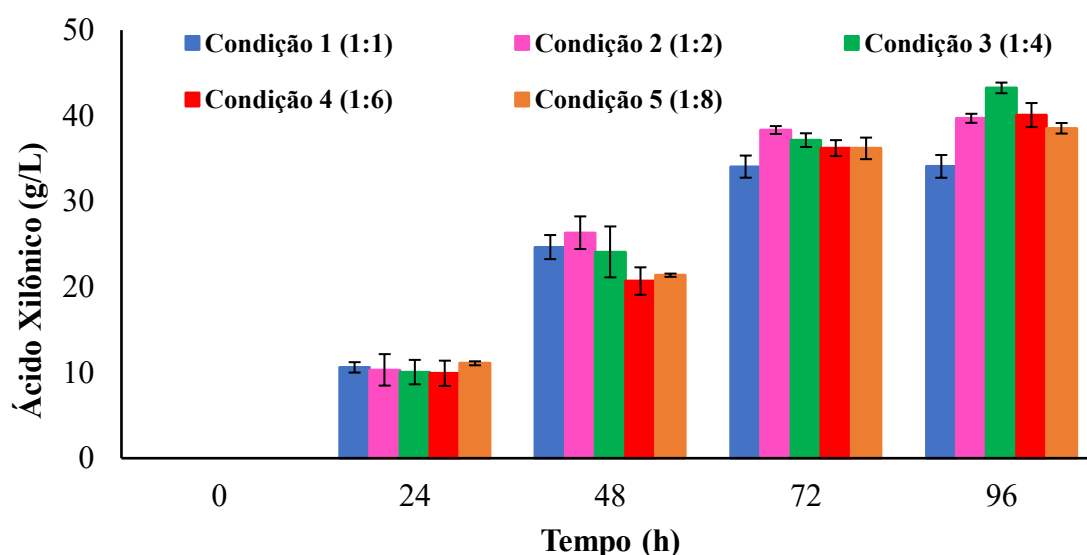


Figura 23. Concentração de ácido xilônico durante as fermentações com a levedura P1HL2, em diferentes razões dos substratos glicerol/xilose.

Ao final de 96 horas de fermentação, a maior concentração de ácido xilônico foi observada na condição 3 (razão glicerol/xilose de 1:4), alcançando $43,30 \pm 0,62$ g/L (Figura 23). Por outro lado, a menor produção foi registrada na condição 1 (1:1), com concentração final de $34,09 \pm 1,33$ g/L. Esses resultados indicam que a proporção entre os substratos influencia significativamente o desempenho da bioconversão da xilose, com a condição 3 se destacando como a mais eficiente sob os parâmetros avaliados.

Dessa forma, com base nos perfis de concentração de glicerol, xilose e ácido xilônico, apresentados nas Figuras 22 e 23, observa-se que a razão entre os substratos exerce influência direta sobre a produção final de ácido xilônico. Nas condições em que o glicerol foi adicionado em menor quantidade no início da fermentação (condições 4 e 5), observou-se um esgotamento precoce dessa fonte de carbono que é essencial para o crescimento celular da *K. phaffii*. Consequentemente, a limitação no desenvolvimento da biomassa comprometeu a capacidade da levedura de converter toda a xilose disponível em ácido xilônico. Nessas condições, a concentração inicial de xilose era significativamente mais elevada, fazendo com que, após as 96h de fermentação, restasse xilose residual no meio fermentativo.

Na condição 1 (razão glicerol/xilose 1:1), com concentrações iniciais equivalentes de ambos os substratos, foi obtida a menor produção de ácido xilônico. Apesar do completo consumo da xilose com 72 h de fermentação, o glicerol permaneceu em alta concentração residual ($9,78 \pm 1,72$ g/L), indicando fornecimento em excesso. Situação semelhante foi observada na condição 2 (1:2), enquanto nas condições 4 (1:6) e 5 (1:8) ocorreu o oposto, com acúmulo de xilose ao final do processo. Esses resultados evidenciam que o desbalanceamento entre as duas fontes de carbono compromete a eficiência da conversão de xilose em ácido xilônico (Figura 22).

Após analisar os perfis de concentração da xilose, do glicerol e do ácido xilônico, foi possível calcular a taxa específica de crescimento μ (h^{-1}), a produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$) e a velocidades de consumo do substrato xilose ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{L.h}$). Os resultados obtidos estão apresentados a Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros obtidos após fermentações com diferentes razões dos substratos glicerol/xilose.

	Condição 1 Razão 1:1	Condição 2 Razão 1:2	Condição 3 Razão 1:4	Condição 4 Razão 1:6	Condição 5 Razão 1:8
μ (taxa específica de crescimento) (h^{-1})	0,12	0,12	0,13	0,13	0,12
Ácido Xilônico (g/L)	$34,09 \pm 1,33$	$39,7 \pm 0,53$	$43,3 \pm 0,62$	$40,08 \pm 1,40$	$38,54 \pm 0,62$
Produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$)	$0,36 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$
Velocidade consumo substrato ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{L.h}$)	$0,21 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,05$	$0,25 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,01$
Glicerol residual (g/L)	$9,78 \pm 1,52$	$5,25 \pm 1,20$	0,00	0,00	0,00
Xilose residual (g/L)	0,00	0,00	$1,57 \pm 1,42$	$9,78 \pm 0,45$	$12,87 \pm 0,72$

Com base nos parâmetros obtidos para as fermentações realizadas com as cinco diferentes razões dos substratos glicerol/xilose, conforme apresentado na Tabela 9, a condição 3 (razão 1:4) foi a que resultou na maior produtividade de ácido xilônico, alcançando $0,45 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$. Além disso, a concentração de ácido xilônico obtida após 96 horas de fermentação também foi a mais elevada entre todas as condições, atingindo $43,30 \pm 0,62 \text{ g/L}$. Conforme ilustrado na Figura 22, nessa condição, a concentração inicial de glicerol foi suficiente para garantir a disponibilidade de carbono necessário para o crescimento celular da levedura ao longo de toda a fermentação. Ademais, a quantidade de xilose residual foi próxima de zero.

A condição 1 (razão glicerol/xilose de 1:1) apresentou a menor produtividade durante o processo fermentativo, com uma taxa de $0,36 \pm 0,01 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$, além de resultar na menor concentração final de ácido xilônico, $34,09 \pm 1,33 \text{ g/L}$. Esse desempenho inferior pode ser atribuído ao excesso de glicerol no meio fermentativo em relação à quantidade de xilose disponível. Esse desequilíbrio resultou em um crescimento celular reduzido, conforme evidenciado na Figura 20, quando comparado às demais condições experimentais. Além disso, a xilose, que é o substrato destinado à conversão em ácido xilônico, foi completamente consumida com 72 h de fermentação, o que limitou a produção do ácido xilônico nas horas subsequentes.

A partir das curvas de produção de ácido xilônico das fermentações nas condições 2, 4 e 5 (Figura 23), observa-se que a concentração final de ácido xilônico foi similar entre essas condições, considerando o desvio padrão obtido com as triplicatas. Além disso, os valores de produtividade obtidos foram próximos. No entanto, na condição 5, a levedura não consumiu completamente a xilose, resultando na maior

concentração de xilose residual no meio fermentativo ao final do processo, com $12,03 \pm 1,54$ g/L.

Outro parâmetro importante apresentado na Tabela 9 é a taxa específica de crescimento (μ). Os valores obtidos para as condições 3 e 4 foram ligeiramente mais elevados comparados ao demais, com $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$. Esses resultados indicam que as concentrações iniciais de glicerol nessas condições favorecem uma maior velocidade de crescimento celular, o que, por sua vez, contribui para as maiores produtividades observadas.

Com base na análise dos resultados obtidos, conclui-se que a razão ideal entre os substratos glicerol e xilose para a fermentação com a linhagem recombinante P1HL2 de *K. phaffii* é 1:4. Iniciar a fermentação com uma concentração de xilose quatro vezes superior à do glicerol resulta na maior conversão de xilose em ácido xilônico, além de levar à máxima produtividade observada no estudo.

5.3 Fermentação em biorreator com a linhagem P1HL2: batelada alimentada sob controle de pH e aeração contínua

Com o objetivo de avaliar a produção de ácido xilônico pela linhagem de levedura P1HL2 com maior controle dos parâmetros operacionais, as fermentações foram conduzidas em biorreator, empregando-se o sistema de batelada alimentada. Durante todo o processo fermentativo, o pH foi mantido constante em 5,5, e o suprimento de ar comprimido foi regulado a um fluxo de 0,800 L/min.

A Figura 24 apresenta os perfis de concentração de xilose, glicerol e ácido xilônico ao longo do tempo de fermentação. A fermentação foi iniciada com $19,18 \pm 1,51$ g/L de xilose e $36,71 \pm 1,91$ g/L de glicerol. Ao final de 240 horas de cultivo, foi alcançada uma concentração de $55,11 \pm 2,36$ g/L de ácido xilônico. Observa-se que a redução na concentração de xilose ocorreu apenas nas primeiras 24 horas do processo. A partir desse ponto, a xilose foi adicionada periodicamente ao meio, a cada 24 horas, por meio da suplementação com solução concentrada (200 g/L), de modo a restabelecer a concentração de xilose para aproximadamente 20 g/L após cada alimentação. Em relação ao glicerol, a única adição ocorreu às 48 horas de fermentação, utilizando-se o volume necessário da mesma solução concentrada (200 g/L) para ajustar a concentração no meio também para 20 g/L.

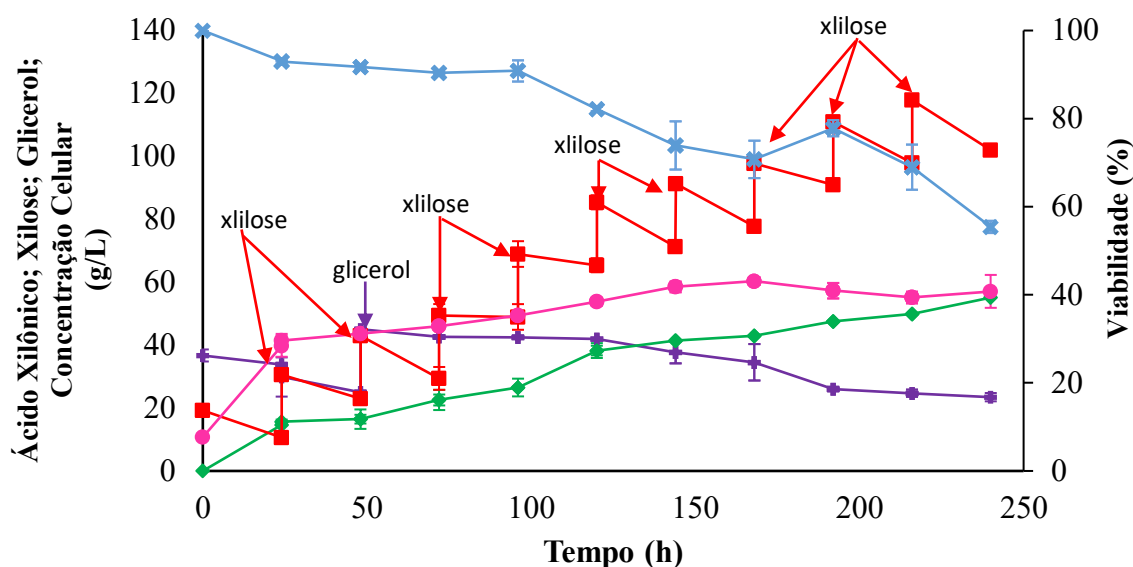


Figura 24. Perfil de fermentações em biorreator utilizando sistema de batelada alimentada. Monitoramento das concentrações de xilose (■), glicerol (+), ácido xilônico (♦), concentração celular (•) e viabilidade da levedura P1HL2 (x) ao longo do tempo.

A análise do perfil de viabilidade celular ao longo do processo fermentativo (Figura 24) revelou que, no início da fermentação, as células apresentavam 100% de viabilidade. Ao final do cultivo, esse valor foi reduzido para $55,41 \pm 1,41\%$, indicando uma redução progressiva na proporção de células viáveis ao longo do tempo. A taxa específica de crescimento (μ), calculada durante a fase exponencial, foi de $0,170 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, refletindo um crescimento celular eficiente nas etapas iniciais da fermentação.

Além da taxa específica de crescimento celular foram determinados a velocidade de consumo do substrato xilose, que foi de $0,460 \pm 0,003 \text{ g}_{\text{xilose}}/\text{h}$, e a produtividade do processo, obtida em $0,191 \pm 0,013 \text{ g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros obtidos após fermentações em biorreator, adotando sistema de batelada alimentada.

	Fermentação em Biorreator Batelada Alimentada
μ (taxa específica de crescimento) (h^{-1})	$0,17 \pm 0,01$
Ácido Xilônico obtido (g/L)	$55,11 \pm 2,36$
$Y_{P/S}$ ($\text{g}_{\text{xylonic acid}}/\text{g}_{\text{xylolse}}$)	0.97 ± 0.05
Produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$)	$0,19 \pm 0,01$
Velocidade consumo substrato ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{L.h}$)	0,46
Quantidade total de xilose adicionada (g)	$110,31 \pm 0,60$
Xilose Consumida (g)	$39,53 \pm 0,19$
Xilose residual (g/L)	101,98

Comparando os resultados da fermentação de batelada alimentada em biorreator apresentados na Tabela 10, com os resultados da fermentação em batelada alimentada, utilizando o glicerol como fonte de carbono, realizadas em frascos Erlenmeyer (Tabela 8) percebe-se que todos os parâmetros foram maiores nas fermentações em biorreator.

Em biorreator, ocorreu um melhor controle do pH durante a fermentação, mantendo-se em 5,5. Para as fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer não foi possível controlar o pH durante a fermentação, apenas tamponou-se o meio fermentativo com ftalato de potássio (pH 5,5).

O oxigênio disponível nas fermentações em frascos Erlenmeyer era limitado e diminuía conforme se adicionava mais xilose no meio. Em contrapartida, o fluxo de ar comprimido nas fermentações em biorreator era constante, 0,800 L/min, contribuindo para crescimento celular da levedura, esta suplementação permitiu que os níveis de OD fossem mantidos acima de 20% após o consumo de glicerol. Isso justifica a velocidade específica de crescimento ter sido maior para as fermentações em biorreator, 0,17 h⁻¹ (Tabela 10), comparados a 0,07 h⁻¹ obtidos nas fermentações em frascos Erlenmeyer (Tabela 8).

A produção de ácido xilônico tem início com a oxidação enzimática da xilose em xilonolactona, a qual é subsequentemente hidrolisada, originando o ácido xilônico. Esse processo libera prótons, promovendo a acidificação do meio fermentativo. O pH reduzido resultante atua como barreira contra o crescimento de microrganismos contaminantes, além de diminuir a necessidade de adição de agentes neutralizantes. Como consequência, há uma potencial redução nos custos associados à etapa de purificação, contribuindo para a viabilidade econômica do bioprocesso. A oxigenação adequada é crucial para a regeneração de cofatores como o NAD⁺, necessário para a atividade da desidrogenase durante a oxidação da xilose. Além de manter o equilíbrio dos cofatores, o oxigênio auxilia na respiração celular, promove o crescimento microbiano e aumenta a produtividade do ácido xilônico. Assim, o controle do pH e a oxigenação do meio fermentativo contribuem para maior eficiência da fermentação, melhor viabilidade celular e melhor rendimento.^{5,10}

Nos resultados obtidos em reator foi observado a melhoria de todos os parâmetros o que indicam que o controle rigoroso dos parâmetros operacionais, como pH, fluxo de ar comprimido, temperatura e agitação, desempenha um papel

fundamental na melhoria da produtividade do processo fermentativo e no aumento da concentração final de ácido xilônico.

Um estudo realizado por Lima *et al.* (2016), mostrou que a levedura *K. phaffi* modificada geneticamente era capaz de produzir lactato a partir do glicerol em fermentações com restrição de oxigênio. O gene que codifica L-lactato desidrogenase (LDH) foi inserido e o gene que codifica piruvato descarboxilase (PDC) foi rompido, resultando na cepa GLp. Para a avaliação da linhagem modificada, realizaram fermentações em batelada com limitação de oxigênio. Ao final, obtiveram um rendimento de 67% de ácido L-lático e 20% do subproduto arabitol.⁶¹ Em 2020, este grupo de pesquisa realizou um estudo detalhado sobre o metabolismo da levedura geneticamente modificada, com o objetivo de reduzir a formação do subproduto arabitol e aumentar a produção de ácido lático. As fermentações foram conduzidas em biorreator, mantendo-se 50% de saturação de oxigênio dissolvido durante todo o processo, bem como o controle do pH para que este permanecesse constante em 5 ao longo da fermentação. Neste novo estudo, foi observado um incremento de 20% na produção de ácido lático, concomitante a uma redução de 50% na formação de arabitol.⁶³

5.4 Fermentação em biorreator com uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como fonte complementar de xilose: efeitos sobre a produção de ácido xilônico

O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar constitui uma solução rica em xilose, mas que também apresenta diversos outros componentes, incluindo elementos em baixas concentrações, que são chamados elementos traço. Ainda que presentes em níveis reduzidos, tais elementos podem exercer efeito inibitório sobre o crescimento da levedura.⁸⁵ Para avaliar especificamente o impacto inibitório de determinados compostos presentes no hidrolisado, como o ácido acético, foi necessário empregar um meio mínimo definido durante as fermentações. Essa abordagem permitiu assegurar que os efeitos observados fossem atribuídos exclusivamente aos compostos potencialmente tóxicos para a levedura, evitando interferências provenientes da combinação dos elementos traços com componentes de meios mais complexos.

Dessa forma, além das fermentações realizadas com 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, foi conduzida também uma

fermentação utilizando meio mínimo suplementado exclusivamente com xilose e glicerol. Esta última condição experimental foi adotada como controle (branco) para as análises comparativas.

Durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica, a celulose e a hemicelulose são degradadas, liberando não apenas açúcares monoméricos, mas também diversos compostos inibitórios, como fenóis, furaldeídos e ácidos orgânicos. Esses compostos são capazes de inibir o metabolismo microbiano danificando as membranas celulares, reduzindo o pH intracelular e inibindo as enzimas do metabolismo central. Como consequência, esses efeitos podem comprometer o desempenho fermentativo, reduzindo o consumo de açúcares e a formação do produto de interesse.⁸⁵ Os inibidores mais comuns encontrados em hidrolisados lignocelulósicos são furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido acético, compostos fenólicos e íons inorgânicos.⁸⁶

O hidrolisado utilizado nas fermentações deste estudo foi fornecido pelo Centro Tecnológico da Cana-de-Açúcar (CTC) e obtido por meio do pré-tratamento por explosão a vapor, seguido de hidrólise ácida da fração hemicelulósica.

Tabela 11: Concentração de xilose, glicose e ácido acético presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

	Hidrolisado bagaço de cana-de-açúcar
[Xilose] (g/L)	91,15 ± 1,77
[Glicose] (g/L)	5,81 ± 0,08
[Ácido Acético] (g/L)	21,47 ± 0,46

Antes de iniciar a fermentação, foi realizada análise de CLAE para quantificação dos principais componentes do hidrolisado, incluindo xilose, glicose e ácido acético (Tabela 11). A xilose foi suplementada ao meio de cultivo, de forma a padronizar sua concentração inicial em aproximadamente 40 g/L em todas as fermentações. Além disso, as fermentações foram realizadas utilizando glicerol como principal fonte de carbono para o crescimento celular. Neste caso, sendo a concentração inicial deste açúcar ajustada para cerca de 10 g/L.

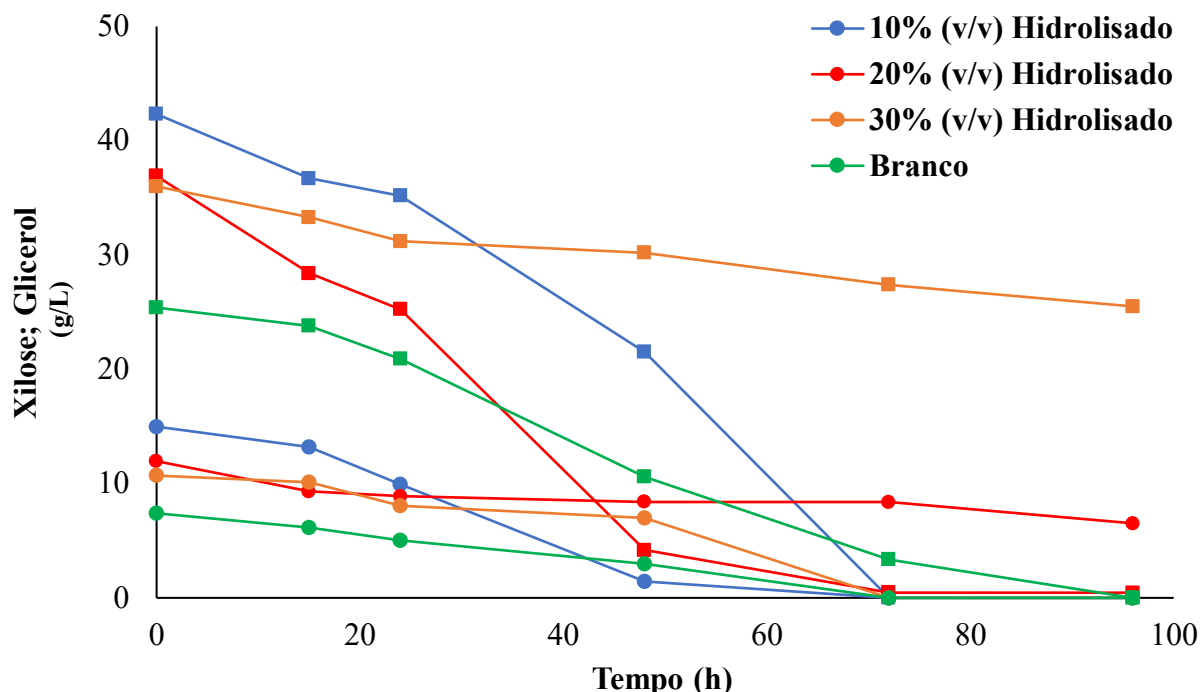


Figura 25. Perfis de concentração de xilose (■) e glicerol (●) durante fermentações controle (branco) e em meios contendo 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

A Figura 25 apresenta os perfis de consumo de xilose e glicerol ao longo das fermentações. As concentrações iniciais de xilose foram de 42,33 g/L, 36,91 g/L e 36,00 g/L para as fermentações com 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado, respectivamente, enquanto a condição controle (meio mínimo) apresentou 25,4 g/L. Em relação ao glicerol, os valores iniciais foram de 14,98 g/L (10% (v/v) de hidrolisado), 11,96 g/L (20% (v/v)) e 10,70 g/L (30% (v/v)), sendo 7,4 g/L no controle.

Apesar da concentração inicial de xilose na fermentação com 10% (v/v) de hidrolisado ter sido ligeiramente superior às demais, esse açúcar foi completamente consumido em até 72 horas de fermentação. Comportamento semelhante foi observado na condição com 20% (v/v) de hidrolisado, em que também se verificou o esgotamento da xilose nesse mesmo intervalo de tempo. Na fermentação controle (meio mínimo), o consumo total ocorreu após 96 horas. Por outro lado, na fermentação contendo 30% (v/v) de hidrolisado, a xilose quase não foi metabolizada, permanecendo uma concentração residual de 25,50 g/L ao final do processo.

A fermentação com 30% (v/v) de hidrolisado envolveu a adição de um volume consideravelmente maior desse substrato em comparação às condições com 20% (v/v) e 10% (v/v), o que resultou em concentrações mais elevadas de compostos inibitórios no meio. Dentre esses compostos, o ácido acético foi identificado e quantificado como

principal inibidor microbiano. O hidrolisado utilizado continha, em média, $21,47 \pm 0,46$ g/L de ácido acético (Tabela 11), o que correspondeu à introdução de aproximadamente 4,50 g, 3,00 g e 1,50 g desse inibidor nas fermentações com 30% (v/v), 20% (v/v) e 10% (v/v) de hidrolisado, respectivamente. Esse aumento na carga inibitória pode ter contribuído para a redução da atividade metabólica microbiana, com impacto direto na taxa de consumo de açúcares durante o processo fermentativo.⁸⁵

Os perfis de concentração de ácido xilônico ao longo das fermentações estão apresentados na Figura 26, e indicam que a maior produção desse ácido orgânico foi observada na condição com 10% (v/v) de hidrolisado. Ao final de 96 horas de fermentação, as concentrações de ácido xilônico atingiram 42,30 g/L, 18,86 g/L e 8,80 g/L nas fermentações conduzidas com 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado, respectivamente. Esses resultados sugerem que concentrações mais elevadas de hidrolisado podem ter impactado negativamente a síntese do produto, possivelmente devido à maior presença de compostos inibitórios no meio.

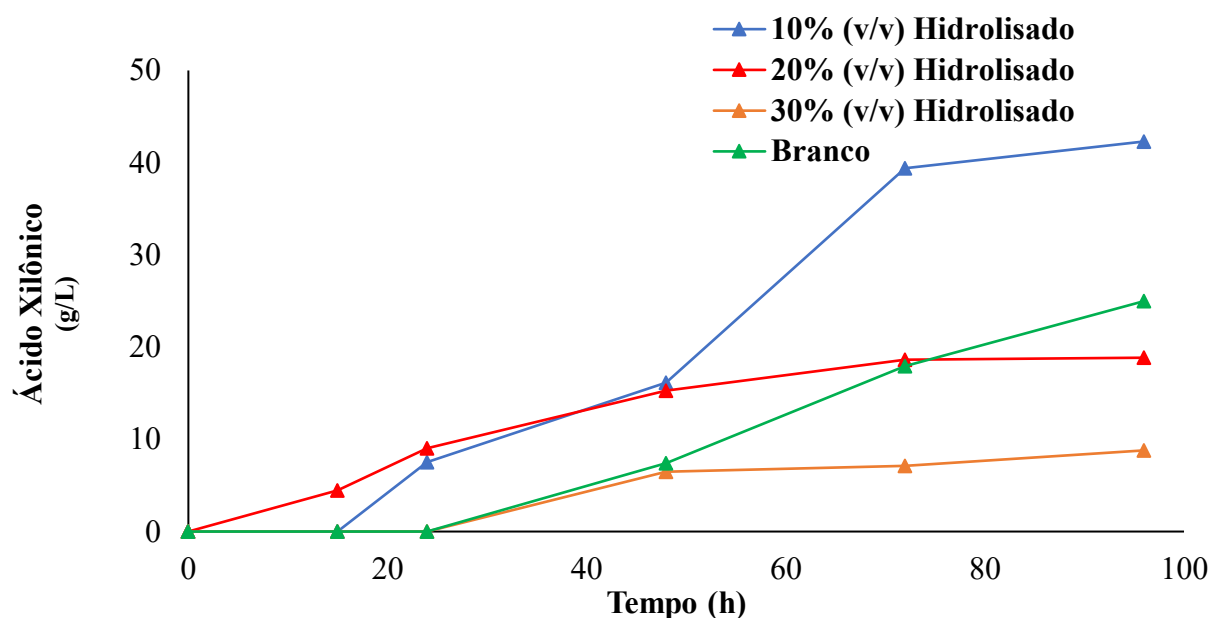


Figura 26. Perfil de concentração de ácido xilônico durante as fermentações realizadas em meio mínimo (branco) e em meios contendo 10% (v/v), 20% (v/v) e 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

A fermentação com 10% (v/v) de hidrolisado apresentou conversão praticamente completa da xilose (42,33 g/L para 42,30 g/L de ácido xilônico; 99,93%), resultado semelhante ao obtido na fermentação com meio mínimo (98,38%). Em contraste, as condições com 20% e 30% (v/v) de hidrolisado exibiram baixo desempenho, com conversões de 51,07% e 49,17%, respectivamente. Esses resultados indicam que o aumento na concentração de hidrolisado e, consequentemente, de compostos

inibitórios, comprometeu o metabolismo microbiano, reduzindo a conversão da xilose ao produto de interesse.

A Figura 27 apresenta os perfis de viabilidade celular e concentração de biomassa da levedura P1HL2 ao longo das fermentações. Em todas as condições avaliadas, a fermentação foi iniciada com 100% de viabilidade celular e concentração inicial de biomassa de 10,75 g/L. Observa-se que, ao longo das 96 horas de fermentação, a menor concentração celular foi registrada na condição com 30% (v/v) de hidrolisado, sugerindo que o maior teor de compostos inibitórios presentes nessa condição pode realmente ter impactado negativamente o crescimento da levedura.

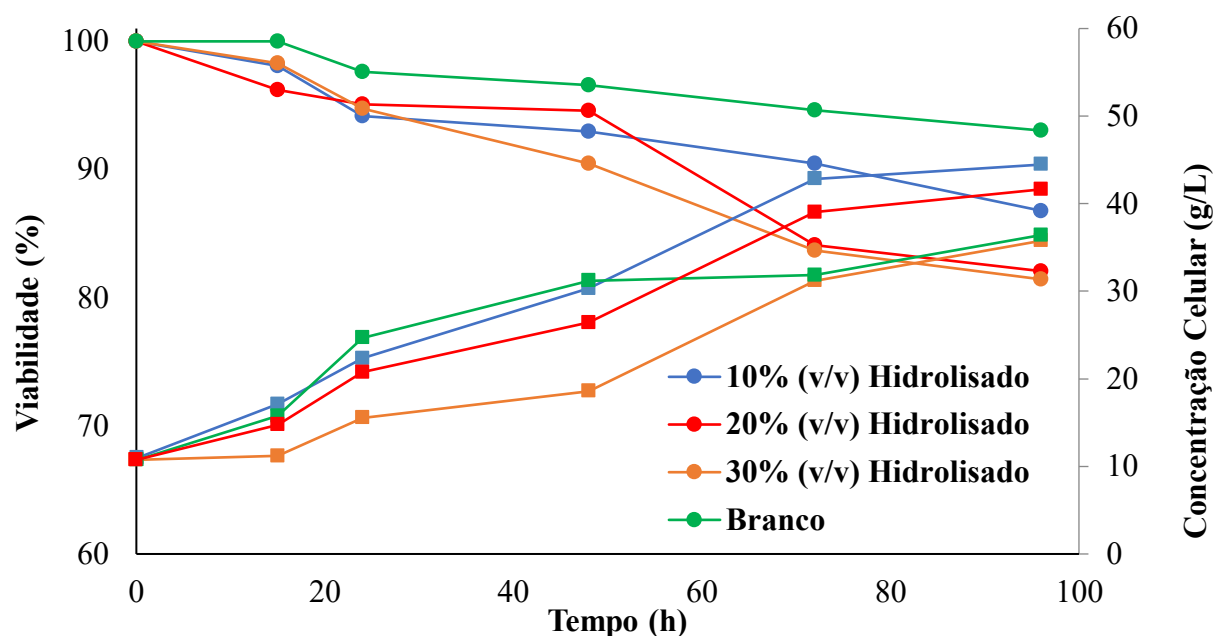


Figura 27. Perfil de viabilidade (•) e concentração celular (■) durante as fermentações realizadas em meio mínimo (branco) e em meios contendo 10%, 20% e 30% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Além disso, percebe-se que a concentração celular foi maior para a fermentação com 10 % de hidrolisado. Considerando a menor proporção de hidrolisado no meio fermentativo, é possível que os alguns compostos presentes no hidrolisado, mesmo que em baixas concentrações, tenham atuado como elementos-traço, exercendo efeitos benéficos sobre o desempenho fermentativo. A velocidade específica de crescimento (μ) foi de $0,17 \text{ h}^{-1}$ na fermentação com 10% (v/v) de hidrolisado e na fermentação controle, $0,16 \text{ h}^{-1}$ para fermentação com 20% (v/v) de hidrolisado, $0,11 \text{ h}^{-1}$ na fermentação com 30% (v/v) de hidrolisado (Tabela12).

Em relação à viabilidade celular, observa-se que, ao longo de todo o processo fermentativo, a condição controle apresentou valores ligeiramente superiores, alcançando 93,04% de células viáveis ao final das 96 horas. A menor viabilidade foi observada na fermentação com 30% (v/v) de hidrolisado. Esses resultados indicam que a fermentação com 30% de hidrolisado não apenas comprometeu a viabilidade celular, mas também resultou em um crescimento mais lento da levedura, possivelmente em função da maior concentração de compostos inibitórios presentes no meio. Além disso, variáveis de fermentação como condições fisiológicas celulares, concentração de oxigênio dissolvido e pH do meio também interferem na toxicidade desses compostos, o que pode acentuar seu efeito tóxico sobre o microrganismo durante a produção de ácido xilônico. Portanto, a presença de compostos tóxicos, como o ácido acético, pode levar ao estresse da levedura e à redução da eficiência no uso de açúcares, levando a menor formação do produto de interesse e menor produtividade do processo.⁸⁷

Após analisar os perfis de concentração da xilose, do glicerol e do ácido xilônico, foi possível calcular a produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$), o rendimento ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{g}_{\text{xilose}}$) e a velocidade de consumo do substrato xilose ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{L.h}$). Os resultados obtidos estão apresentados a Tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros obtidos após fermentações com 10% (v/v), 20% (v/v), 30% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e fermentação controle.

	10% (v/v) Hidrolisado	20% (v/v) Hidrolisado	30% (v/v) Hidrolisado	Branco (Controle)
μ (velocidade específica de crescimento) (h^{-1})	0,17	0,16	0,11	0,17
Ácido Xilônico obtido (g/L)	42,30	18,85	8,80	24,99
YP/S ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{g}_{\text{xilose}}$)	1,0	0,51	0,84	0,98
Produtividade ($\text{g}_{\text{ácido xilônico}}/\text{L.h}$)	0,44	0,20	0,10	0,26
Velocidade consumo Substrato ($\text{g}_{\text{xilose}}/\text{L.h}$)	0,44	0,38	0,11	0,26
Xilose Inicial (g)	29,63	25,84	25,20	17,78
Xilose Consumida (g)	29,63	25,53	7,61	17,78
Xilose residual (g/L)	0,0	0,45	25,5	0,0

De acordo com os resultados obtidos, o processo de fermentação utilizando 10% de hidrolisado apresentou maior produtividade, maior taxa de consumo de substrato e maior concentração final de ácido xilônico. Além disso, não permaneceu xilose residual no meio de fermentação (Tabela 12). Por outro lado, as fermentações com 20% (v/v) e

30% (v/v) de hidrolisado apresentaram os piores parâmetros de fermentação, com valores de produtividade e concentração final de ácido xilônico próximos. Além disso, a taxa de consumo de substrato foi muito menor para a fermentação com 30% (v/v) de hidrolisado, o que significa que ao final de todo o processo ainda havia mais de 25 g/L de xilose restante no meio de fermentação.

A partir da análise dos perfis de concentração de glicerol, xilose e ácido xilônico, bem como dos parâmetros fermentativos apresentados na Tabela 12, é possível afirmar que a quantidade de hidrolisado utilizada nas fermentações exerceu influência direta sobre a produção final de ácido xilônico. Observou-se que, à medida que se aumentou a proporção de hidrolisado no meio, houve uma redução na concentração final do produto de interesse. Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da carga de compostos inibitórios no meio fermentativo, que afetam negativamente o crescimento celular (Figura 27), limitam o consumo de xilose (Figura 25) e, consequentemente, reduzem a formação de ácido xilônico (Figura 26).

Por outro lado, a fermentação realizada com 10% (v/v) de hidrolisado apresentou não apenas a maior concentração final de ácido xilônico, mas também produtividade superior à observada na fermentação controle com meio sintético. Esse resultado pode estar relacionado à composição do meio: enquanto o meio sintético foi formulado com meio mínimo, possivelmente deficiente em algum elemento-traço essencial à conversão eficiente da xilose, a presença de uma pequena quantidade de hidrolisado (10% v/v) forneceu tais componentes em concentrações adequadas. Nessa condição, os compostos inibitórios estavam presentes em níveis suficientemente baixos para não comprometer o metabolismo celular, podendo até atuar como elementos-traço benéficos à fermentação.

Um estudo preliminar, realizado por Ramos, *et al.* (2021), mostrou a capacidade da linhagem recombinante P1HL2 da *K. phaffii* de produzir ácido xilônico na presença de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, as fermentações com hidrolisado foram conduzidas em shaker orbital, utilizando em frascos erlenmeyer de 500 mL, com 50 mL de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, diluído a 20% (v/v). A concentração inicial de glicose e de xilose para a fermentação foram, respectivamente 10 g/L e 30 g/L. O pH foi ajustado para 5,5 com KOH, e a OD₆₀₀ inicial foi de 20. A fermentação transcorreu por 96 h, a 30 °C e agitação de 200 rpm. Eles observaram que o consumo de glicose ocorreu apenas nas primeiras 24 h da fermentação, e não houve a conversão de toda xilose disponível em ácido xilônico.

Além disso, a produção de ácido xilônico parou com 48 h de fermentação. Ao final do processo, obteve-se $11,7 \pm 1,6$ g/L de ácido xilônico, com produtividade de $0,16$ g_{ácido xilônico}/L.h.^{9,10}

5.5 Purificação do ácido xilônico obtido após fermentação com a linhagem recombinante P1HL2 da levedura *K. phaffii*

Dois métodos distintos foram empregados para a purificação do ácido xilônico obtido após a fermentação com a linhagem P1HL2 de *K. phaffii*. O primeiro consistiu em ensaio de troca iônica utilizando a resina aniônica de base fraca Amberlite IRA-67 na forma Cl^- , conforme o procedimento descrito por Zaini *et al.* (2019).⁷⁶ O segundo método adotado foi a purificação por precipitação com etanol (EtOH), seguindo o procedimento proposto por Buchert *et al.* (1986).⁷²

Embora não existam, até o momento, relatos na literatura sobre a purificação de ácido xilônico por meio de troca iônica, optou-se por realizar este experimento com base no estudo de Bayazit *et al.* (2011), que descreve a formação de um complexo ácido-amina durante a adsorção de ácidos orgânicos pela resina Amberlite IRA-67, de base fraca e matriz acrílica.⁸⁸ Essa metodologia tem sido bastante empregada na purificação de outros ácidos orgânicos, como: ácido láctico, ácido acético, ácido glutárico e ácido glioxílico.^{88–91} Nesse processo, ocorre uma reação de neutralização representada pelo equilíbrio: $n(\text{R-N}) + \text{AH}_n \leftrightarrow \text{R-(NH}^+)_n\text{A}^{n-}$ em que n representa o número de grupos ionizáveis da molécula do ácido (AH_n), R-N corresponde à amina terciária presente na estrutura da resina, e $\text{R-(NH}^+)_n\text{A}^{n-}$ refere-se ao complexo ácido-amina formado.⁸⁸

Essa abordagem já demonstrou eficácia na purificação de outros ácidos carboxílicos, como o ácido D-lático. No estudo conduzido por Zaini *et al.* (2019), foi desenvolvido um processo de purificação em três etapas para o ácido D-lático de origem microbiana. A primeira etapa consistiu no tratamento do fermentado com carvão ativado a 7%, seguido pela acidificação do meio utilizando a resina catiônica Amberlite IRA-120. Na etapa final, realizou-se a adsorção do ácido láctico por meio de troca aniônica utilizando a resina Amberlite IRA-67. Como resultado, o processo permitiu a recuperação de 80,4% de ácido D-lático, com pureza final de 91,8%.⁷⁶

Diversas soluções podem ser utilizadas como eluentes na purificação de ácidos orgânicos por meio da resina Amberlite IRA-67. Dentre elas, destaca-se o ácido clorídrico, que, embora efetivo na eluição, demonstrou elevado potencial de

degradação da matriz acrílica da resina.⁷⁶ Com o objetivo de preservar a integridade estrutural da resina e prolongar sua vida útil, estudos anteriores têm explorado a aplicação de outros eluentes menos agressivos, tais como hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, carbonato de sódio e bicarbonato de amônio.⁹² Dentre essas alternativas, a eluição com bicarbonato de amônio apresentou resultados promissores em termos de eficiência de recuperação e preservação da resina. Assim, neste trabalho, optou-se por utilizar o bicarbonato de amônio como eluente no processo de purificação por troca iônica.

A Figura 28 mostra o perfil de eluição do ácido xilônico com NH_4HCO_3 para o experimento com carregamento em coluna de vidro com 34 mL de meio fermentativo no carregamento a 14,37 g/L de ácido xilônico. As amostras foram coletadas a cada 1 mL, resultando no perfil da Figura 28.

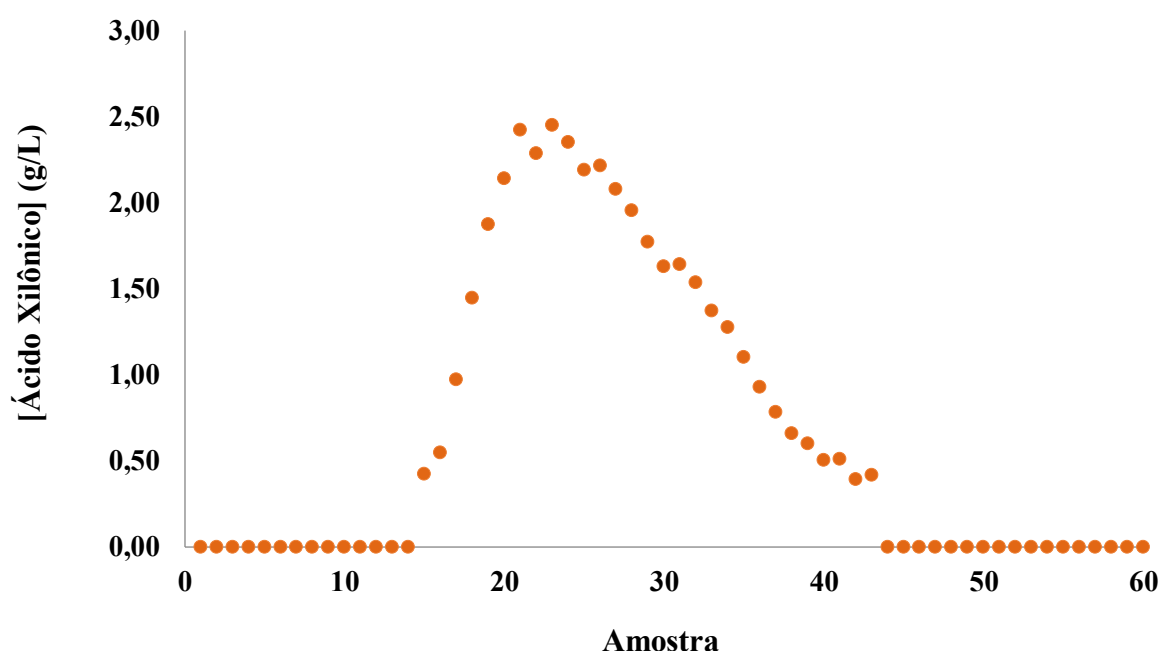


Figura 28. Curva obtida na etapa de eluição do ácido xilônico com NH_4HCO_3 .

Ao término do processo de purificação por troca iônica com a resina Amberlite IRA-67, foi obtida uma taxa de recuperação de 65,05% de ácido xilônico, com pureza final de 8,05%. Esses resultados são considerados insuficientes para aplicações industriais, especialmente naquelas que demandam alta pureza, como a produção de polímeros. Com o objetivo de aumentar a eficiência na recuperação e purificação do ácido xilônico, adotou-se uma segunda metodologia de purificação por precipitação com EtOH. Após a o processo fermentativo, embora o meio apresentasse aspecto límpido, exibia uma coloração amarelada, que poderia estar relacionada a presença de

impurezas residuais. Para reduzir essa coloração e viabilizar uma purificação mais eficaz foi feita uma etapa de clareamento utilizando o carvão ativado, conforme procedimento adaptado de Buchert *et al.* (1986).⁷²

A Tabela 13 apresenta as concentrações de glicerol, xilose e ácido xilônico no produto obtido ao final da fermentação, bem como as respectivas concentrações desses compostos após a etapa de evaporação da água e, posteriormente, após o tratamento com carvão ativado seguido de filtração a vácuo. Além disso, são apresentados os percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico ao longo do processo de purificação, permitindo a comparação entre os ensaios conduzidos com e sem a etapa de clarificação por carvão ativado.

Tabela 13: Concentrações de glicerol, xilose e ácido xilônico antes da purificação, e percentuais de pureza e recuperação do ácido xilônico após os ensaios de purificação.

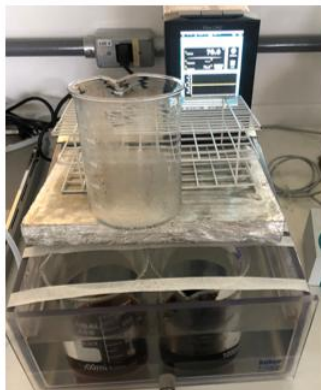
Amostra	Antes dos ensaios de Purificação			Após os ensaios de Purificação			
	[Glicerol] (g/L)	[Xilose] (g/L)	[Ác.Xilônico] (g/L)	Precipitado (g)	Ác. Xilônico no precipitado (g)	Pureza (%)	Recuperação (%)
Fermentado	3,4	13,8	13,8	-	-	-	-
Concentrado de Ác. Xilônico (sem carvão ativo)	7,8	40,7	30,1	0,102	0,062	61,06	41,46
Após adição de carvão ativo e filtração	5,9	35,2	25,6	0,100	0,050	49,59	33,21

Com base nos dados apresentados, observa-se que a etapa de evaporação da água por banho-maria resultou em um aumento superior ao dobro nas concentrações desses compostos. No entanto, verificou-se uma redução nas concentrações de glicerol, xilose e ácido xilônico após o tratamento com carvão ativado e subsequente filtração a vácuo com membrana de 0,22 µm. Especificamente, a concentração de glicerol reduziu-se de 7,8 g/L para 5,9 g/L, a de xilose de 40,7 g/L para 35,2 g/L, e a de ácido xilônico apresentou uma queda de 14,95%, passando de 30,1 g/L para 25,6 g/L.

Essas reduções indicam que houve adsorção parcial desses compostos pelo carvão ativado, impactando na recuperação do produto de interesse. Para se obter maiores índices de recuperação e pureza do ácido xilônico é fundamental minimizar perdas ao longo das etapas de purificação.

A Figura 29 ilustra cada uma dessas etapas descritas no processo de purificação.

a) Evaporação da água para aumento da concentração dos compostos presentes no produto da fermentação.



b) Produto da fermentação concentrado após etapa de evaporação da água utilizando banho-maria.



c) Filtração à vácuo após adição de carvão ativo



d) Precipitação por EtOH (3:1 v/v)



e) Sobrenadante e precipitado após adição de EtOH



f) Secagem do precipitado à vácuo em liofilizador



Figura 29. Etapas do processo de purificação do ácido xilônico obtido após a fermentação: (a) evaporação da água e concentração dos compostos no fermentado; (b) produto fermentativo após evaporação em banho-maria; (c) filtração a vácuo após adição de carvão ativado; (d) precipitação do ácido xilônico com EtOH (3:1 v/v); (e) separação entre sobrenadante e precipitado; (f) secagem do precipitado a vácuo por liofilização.

A Figura 30 apresenta os cromatogramas obtidos por *UHPLC* após os ensaios de purificação, realizados com e sem a etapa de clarificação com carvão ativado. Observa-se que, após os ensaios de purificação, os cromatogramas não indicaram a presença de xilose e glicerol, compostos inicialmente detectados no sobrenadante da fermentação. Em contrapartida, o ácido xilônico, produto de interesse, foi identificado nas amostras purificadas. Esses resultados indicam que o método proposto por Buchert *et al.* (1986) foi eficaz na remoção de impurezas e na recuperação seletiva do ácido xilônico, demonstrando sua viabilidade para aplicação na etapa de purificação deste composto em processos biotecnológicos.⁷²

Os cromatogramas exibiram perfis semelhantes entre si, com um pico correspondente ao ácido xilônico, e um pico duplo não identificado. Este último, possivelmente, está relacionado a compostos residuais oriundos do meio fermentativo, os quais podem ter sido precipitados durante a adição de etanol na etapa de purificação. A presença desses componentes não identificados pode ter contribuído para a redução da pureza final do ácido xilônico, impedindo que se atingisse 100% de eficiência na purificação.

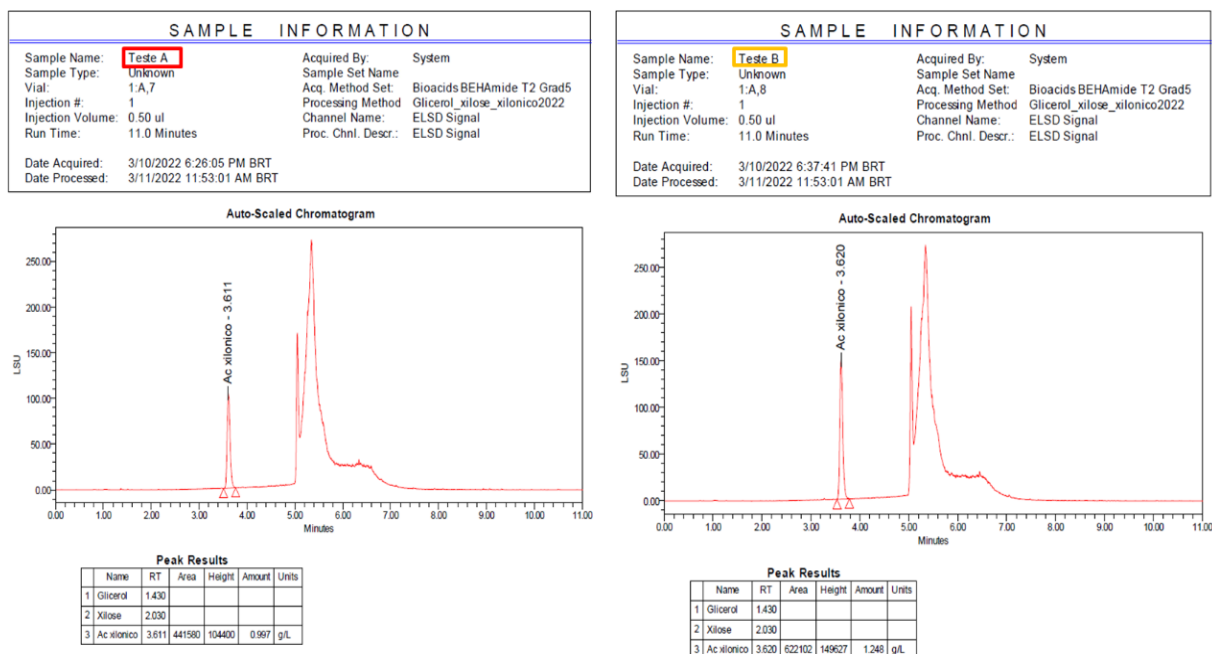


Figura 30. Cromatogramas obtidos por *UHPLC* utilizados para a quantificação do ácido xilônico (g/L) após os ensaios de purificação. A: amostra submetida à etapa de clarificação com carvão ativado; B: amostra sem clarificação.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 13, verificou-se que os maiores valores de pureza (61,06%) e de recuperação (41,46%) do ácido xilônico foram obtidos no ensaio em que a etapa de clarificação com carvão ativado não foi executada. A inclusão dessa etapa resultou em perdas significativas do produto de interesse, atribuídas à adsorção do ácido xilônico pelo carvão ativado, o que se refletiu em menores percentuais de pureza (49,59%) e recuperação (33,21%). Do ponto de vista visual, o precipitado obtido após a adição de etanol nos dois ensaios apresentava coloração branca, indicando que a etapa de descoloração não se mostrou imprescindível. Além disso, sua execução implicou redução indesejável nos índices de purificação do produto de interesse, sendo, portanto, contraproducente para o processo.

Outro parâmetro avaliado foi a razão volumétrica de EtOH em relação a quantidade do produto da fermentação concentrado, na etapa de precipitação do ácido xilônico. Os ensaios foram conduzidos utilizando as seguintes proporções (v/v) de etanol em relação ao volume do concentrado: 3:1 (ensaio C), 4:1 (ensaio D), 5:1 (ensaio E) e 6:1 (ensaio F).

Tabela 14: Testes realizados para a purificação do ácido xilônico obtido via fermentação com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Ensaio	Precipitado (g)	[Ác.Xilônico] (g/L)	Ác. Xilônico no precipitado (g)	Pureza (%)	Recuperação (%)
A Com carvão ativo	0,1008	9,997	0,050	49,59	33,21
B Sem carvão ativo	0,1022	12,48	0,062	61,06	41,46
C EtOH (3:1 v/v)	0,0767	11,86	0,059	77,31	39,40
D EtOH (4:1 v/v)	0,0796	11,63	0,058	73,05	38,64
E EtOH (5:1 v/v)	0,0801	10,64	0,053	66,42	35,35
F EtOH (6:1 v/v)	0,0840	12,62	0,063	75,12	41,93

Com base nos dados apresentados na Tabela 14, verifica-se que o ensaio C, correspondente à razão volumétrica de etanol de 3:1, resultou no maior percentual de pureza do ácido xilônico, alcançando 77,31%. No entanto, esse valor não apresentou diferença significativa em relação aos ensaios D (4:1) e F (6:1), os quais também apresentaram níveis de pureza superiores a 70%. Por outro lado, os percentuais de recuperação do ácido xilônico foram inferiores a 42% em todos os ensaios avaliados. É importante destacar que, para a análise da influência da razão etanol:concentrado na etapa de precipitação, utilizou-se fermentado contendo 30,10 g/L de ácido xilônico, sem a etapa de clarificação, o que possivelmente contribuiu para as baixas taxas de recuperação observadas. Diante desses resultados, recomenda-se a realização de novos experimentos com concentrações mais elevadas de ácido xilônico no fermentado, com o objetivo de aumentar tanto a pureza quanto a recuperação do produto.

Os resultados obtidos indicam que o aumento do volume de etanol não é essencial para a eficiência da precipitação do ácido xilônico. A razão volumétrica de 3:1 (etanol:concentrado fermentativo) foi suficiente para atingir um percentual de pureza superior a 75%, valor que não diferiu daqueles observados nos ensaios com maiores proporções de etanol, considerando o desvio padrão obtido com as triplicatas. Esses dados sugerem que a utilização de volumes mais elevados do agente precipitante não

proporciona ganhos significativos em termos de pureza. Dessa forma, volumes menores de etanol podem ser empregados sem prejuízo à eficiência do processo, favorecendo uma operação mais simplificada e tecnicamente viável.

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração inicial de ácido xilônico do fermentado durante as etapas de purificação, foram conduzidos experimentos utilizando amostras com concentrações de 279,80 g/L e 447,80 g/L desse ácido orgânico. Verificou-se que, ao se empregar a amostra com 447,80 g/L, a precipitação com EtOH ocorreu de forma imediata, indicando uma possível relação entre a maior saturação do meio e a formação mais rápida do precipitado. Esse comportamento não foi observado com a amostra contendo 279,80 g/L, na qual a precipitação ocorreu de maneira menos evidente. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico obtidos a partir de triplicatas experimentais com concentrados iniciais de 279,80 g/L e 447,80 g/L.

Ensaio	Precipitado			
	Precipitado (g)	Ácido Xilônico (g)	Pureza (%)	Recuperação (%)
Concentrado Ácido Xilônico 279,80 g/L	3,03 ± 0,05	1,49 ± 0,28	49,22 ± 8,67	53,31 ± 9,88
Concentrado Ácido Xilônico 447,80 g/L	5,58 ± 0,35	4,12 ± 0,63	74,38 ± 7,77	91,90 ± 13,99

Com base nos dados apresentados na Tabela 15, observou-se que os ensaios conduzidos com maior concentração inicial de ácido xilônico (447,80 g/L) resultaram em percentuais superiores de pureza e recuperação. Nessa condição, foram obtidos 74,38 ± 7,77% de pureza e 91,90 ± 13,99% de recuperação. Esses resultados indicam que a concentração inicial do ácido xilônico exerce influência direta sobre a eficiência do processo de purificação, favorecendo a precipitação e o rendimento do produto final em concentrações mais elevadas.

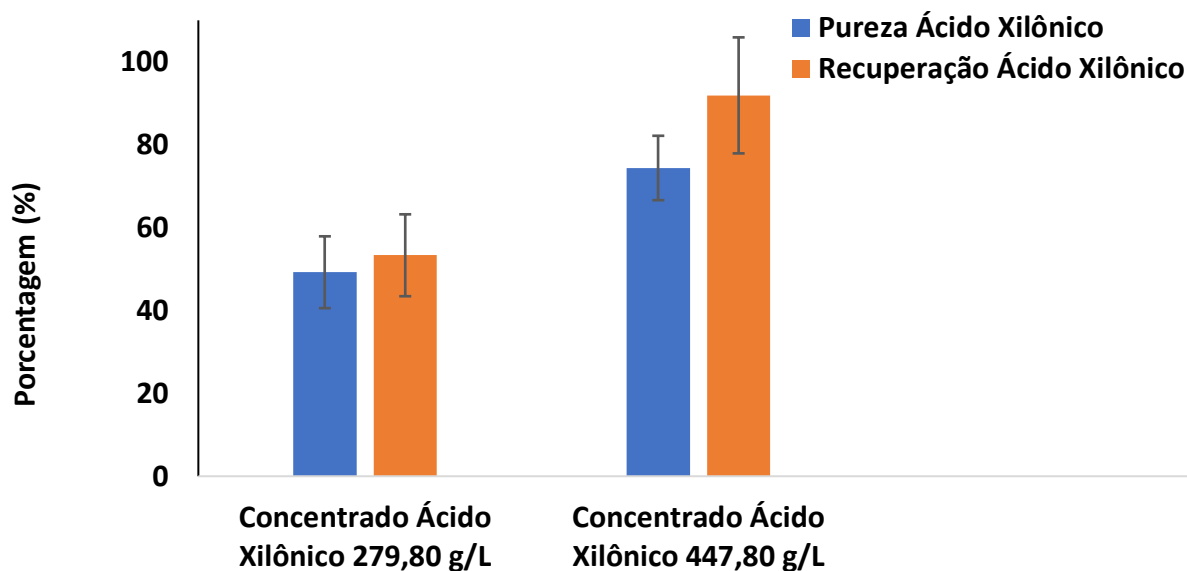


Figura 31. Gráfico com a porcentagem de pureza obtidos com as os concentrados de ácido xilônico 279,80 g/L e 447,80 g/L.

A análise da Figura 31 evidencia diferenças significativas nos percentuais de pureza e recuperação do ácido xilônico entre os ensaios com concentrações iniciais de 279,80 g/L e 447,80 g/L. Os resultados indicam que a concentração inicial de ácido xilônico é um fator crítico para os processos de purificação, sendo que níveis mais elevados aproximam o sistema do ponto de precipitação, favorecendo tanto a recuperação quanto a pureza final do produto.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou a capacidade da linhagem recombinante *Komagataella phaffii* P1HL2 na produção de ácido xilônico por meio de diferentes estratégias fermentativas. Foram avaliadas variáveis fundamentais como a fonte de carbono para o crescimento celular, a razão entre os substratos glicerol/xilose, o uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como alternativa à xilose comercial, além de metodologias para purificação do ácido xilônico obtido.

Nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer, o glicerol foi selecionado como a melhor fonte de carbono, promovendo maior crescimento celular e rendimento. Em batelada, a conversão de xilose em ácido xilônico foi de $0,55 \pm 0,03$ g_{ácido xilônico}/g_{xilose}, com produtividade de $0,26 \pm 0,02$ g_{ácido xilônico}/L.h e concentração de ácido xilônico de $24,88 \pm 1,64$ g/L.

Nos estudos que avaliaram a razão entre os substratos glicerol e xilose, verificou-se que a razão 1:4 resultou nos melhores indicadores, com $43,30 \pm 0,62$ g/L de ácido xilônico e produtividade de $0,45 \pm 0,01$ g_{ácido xilônico}/L.h.

No sistema de batelada alimentada em biorreator, com controle de pH (5,5), temperatura (30 °C) e aeração (0,800 L/min), foi alcançada a maior concentração de ácido xilônico ($55,11 \pm 2,36$ g/L) e rendimento ($0,19 \pm 0,01$ g_{ácido xilônico}/g_{xilose}), superando os resultados obtidos em frascos Erlenmeyer. Esses dados evidenciam a importância do controle rigoroso das condições operacionais para aumentar a produtividade do processo.

O uso de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como complemento à xilose comercial foi avaliado. A condição com 10% (v/v) de hidrolisado resultou em 42,30 g/L de ácido xilônico e produtividade de 0,44 g_{ácido xilônico}/g_{xilose}. Em contrapartida, a condição com 30% (v/v) de hidrolisado resultou na menor produção de ácido xilônico (8,80 g/L) e produtividade reduzida (0,10 g_{ácido xilônico}/g_{xilose}), provavelmente a presença de compostos inibitórios no hidrolisado comprometem o processo fermentativo, afetando negativamente o crescimento celular, o consumo de xilose e, consequentemente, a produção do ácido xilônico.

Quanto à purificação, a primeira estratégia avaliada foi por troca iônica com resina Amberlite IRA-67 Cl⁻, utilizando coluna de vidro. No entanto, esse método apresentou baixa eficiência, com taxa de recuperação de 61,05% e pureza final de apenas 8,05%, valores considerados insuficientes para aplicações industriais ou para

a síntese de polímeros. Diante desses resultados, foi conduzido um segundo estudo utilizando o método de precipitação com etanol, no qual diferentes parâmetros foram avaliados com o objetivo de aumentar a eficiência do processo.

A adoção da etapa de clarificação com carvão ativado resultou em um percentual de pureza de 49,59%, enquanto a omissão dessa etapa elevou a pureza para 61,06%. Outro parâmetro avaliado foi a razão volumétrica entre etanol (EtOH) e concentrado de ácido xilônico na etapa de precipitação, observando-se que a proporção de 3:1 (v/v) já proporcionou resultados equivalentes aos obtidos com razões superiores, alcançando purezas superiores a 77%. Ademais, a concentração inicial de ácido xilônico no produto fermentado mostrou-se determinante para a pureza final após as etapas de purificação; quanto maior a concentração inicial, mais próxima do ponto de precipitação, maior a recuperação do ácido xilônico com pureza elevada. Utilizando um concentrado com 447,8 g/L de ácido xilônico, foram obtidos $74,38 \pm 7,77\%$ de pureza e $91,90 \pm 13,99\%$ de recuperação.

Dessa forma, os resultados demonstram o potencial biotecnológico da linhagem *K. phaffii* P1HL2 para produção de ácido xilônico, bem como a viabilidade da sua purificação por precipitação com EtOH, contribuindo para o desenvolvimento de plataformas sustentáveis de produção de ácidos orgânicos a partir de fontes renováveis.

7 – Referências

1. Chen Z, Wang Y, Cheng H, Zhou H. Integrated chemo- and biocatalytic processes: a new fashion toward renewable chemicals production from lignocellulosic biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd*. Preprint posted online February 1, 2022. doi:10.1002/jctb.7241
2. Rodríguez A, Espinosa E. Special issue “lignocellulosic biomass.” *Molecules.MDPI AG*. 2021;26(5). doi:10.3390/molecules26051483
3. Ashokkumar V, Venkatkarthick R, Jayashree S, et al. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. *Bioresour Technol.Elsevier Ltd*. 2022;344. doi:10.1016/j.biortech.2021.126195
4. Reshmy R, Thomas D, Philip E, et al. Bioplastic production from renewable lignocellulosic feedstocks: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.Springer Science and Business Media B.V*. 2021;20(1):167-187. doi:10.1007/s11157-021-09565-1
5. Toivari MH, Nygård Y, Penttilä M, Ruohonen L, Wiebe MG. Microbial d-xylonate production. *Appl Microbiol Biotechnol.Springer Verlag*. 2012;96(1):1-8. doi:10.1007/s00253-012-4288-5
6. Chen Y, Nielsen J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Curr Opin Biotechnol.Elsevier Ltd*. 2016;37:165-172. doi:10.1016/j.copbio.2015.11.004
7. Zhou X, Zhou X, Liu G, Xu Y, Balan V. Integrated production of gluconic acid and xylonic acid using dilute acid pretreated corn stover by two-stage fermentation. *Biochem Eng J*. 2018;137:18-22. doi:10.1016/j.bej.2018.05.005
8. Toivari M, Vehkomäki ML, Nygård Y, Penttilä M, Ruohonen L, Wiebe MG. Low pH d-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. *Bioresour Technol*. 2013;133:555-562. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.157
9. Ramos TGS, Justen F, Carneiro CVGC, et al. Xylonic acid production by recombinant *Komagataella phaffii* strains engineered with newly identified xylose dehydrogenases. *Bioresour Technol Rep*. 2021;16. doi:10.1016/j.biteb.2021.100825
10. Trichez D, Carneiro CVGC, Braga M, Almeida JRM. Recent progress in the microbial production of xylonic acid. *World J Microbiol Biotechnol.Springer Science and Business Media B.V*. 2022;38(7). doi:10.1007/s11274-022-03313-5
11. Chen J, Zhang B, Luo L, et al. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.Elsevier Ltd*. 2021;149. doi:10.1016/j.rser.2021.111370
12. Rosas-Aburto A, Cano-Díaz GS, Vivaldo-Lima E, et al. Determination of the composition of lignocellulosic biomasses from combined analyses of thermal, spectroscopic, and wet

- chemical methods. *Ind Eng Chem Res.* 2021;60(9):3502-3515. doi:10.1021/acs.iecr.0c05243
13. Justen F. *Produção de Ácido Xilônico Por Komagataella Phaffii*. Universidade de Brasília - UnB; 2017.
 14. Yu TY, Tseng YK, Lin TH, et al. Effect of cellulose compositions and fabrication methods on mechanical properties of polyurethane-cellulose composites. *Carbohydr Polym.* 2022;291. doi:10.1016/j.carbpol.2022.119549
 15. Saini JK, Saini R, Tewari L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech.Springer Verlag.* 2015;5(4):337-353. doi:10.1007/s13205-014-0246-5
 16. Brylev AN, Adylov DK, Tukhtaeva GG, Kamal Dinova NA, Abidova LD, Rakhimov DA. *Polysaccharides of Rice Straw*. Vol 37.; 2001.
 17. Rabemanolontsoa H, Saka S. Comparative study on chemical composition of various biomass species. *RSC Adv.* 2013;3(12):3946-3956. doi:10.1039/c3ra22958k
 18. Miron J, Yosef E, Ben-Ghedalia D. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. *J Agric Food Chem.* 2001;49(5):2322-2326. doi:10.1021/jf0008700
 19. Talita Gabriela Salles Ramos. *“Engenharia Metabólica de Komagataella Phaffii Para a Produção de Ácido Xilônico a Partir de Fontes Renováveis.”* Universidade de Brasília - UnB; 2019.
 20. Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;84(1):37-53. doi:10.1007/s00253-009-2101-x
 21. Budtova T, Aguilera DA, Beluns S, et al. Biorefinery approach for aerogels. *Polymers (Basel).MDPI AG.* 2020;12(12):1-63. doi:10.3390/polym12122779
 22. Almeida JRM, Fávaro LCL, Quirino BF. Biodiesel biorefinery: Opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnol Biofuels.* 2012;5. doi:10.1186/1754-6834-5-48
 23. De Buck V, Polanska M, Van Impe J. Modeling Biowaste Biorefineries: A Review. *Front Sustain Food Syst.Frontiers Media S.A.* 2020;4. doi:10.3389/fsufs.2020.00011
 24. Prabhu AA, Thomas DJ, Ledesma-Amaro R, et al. Biovalorisation of crude glycerol and xylose into xylitol by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1). doi:10.1186/s12934-020-01378-1
 25. Losordo Z, McBride J, Rooyen J Van, et al. Cost competitive second-generation ethanol production from hemicellulose in a Brazilian sugarcane biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2016;10(5):589-602. doi:10.1002/bbb.1663

26. Jin LQ, Zhao N, Liu ZQ, Liao CJ, Zheng XY, Zheng YG. Enhanced production of xylose from corncob hydrolysis with oxalic acid as catalyst. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2018;41(1):57-64. doi:10.1007/s00449-017-1843-6
27. Kim D, Woo HM. Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganisms for use as efficient microbial cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol*. Springer Verlag. 2018;102(22):9471-9480. doi:10.1007/s00253-018-9353-2
28. Wang C, Wei D, Zhang Z, et al. Production of xylonic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(23):10055-10063. doi:10.1007/s00253-016-7825-9
29. Zhu Y, Li W, Lu Y, et al. Production of furfural from xylose and corn stover catalyzed by a novel porous carbon solid acid in γ -valerolactone. *RSC Adv*. 2017;7(48):29916-29924. doi:10.1039/c7ra03995f
30. Widodo Y, Wahyuningsih S, Ueda A. Sweet Potato Production for Bio-ethanol and Food Related Industry in Indonesia: Challenges for Sustainability. *Procedia Chem*. 2015;14:493-500. doi:10.1016/j.proche.2015.03.066
31. Veras HCT, Parachin NS, Almeida JRM. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1). doi:10.1186/s12934-017-0766-x
32. Erickson B, Nelson JE, Winters P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnol J. Wiley-VCH Verlag*. 2012;7(2):176-185. doi:10.1002/biot.201100069
33. Cortivo PRD, Machado J, Hickert LR, Rossi DM, Ayub MAZ. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 and *Pantoea agglomerans* BL1 cultivated in acid and enzymatic hydrolysates of soybean hull. *Biotechnol Prog*. 2019;35(3). doi:10.1002/btpr.2793
34. Kumdam H, Murthy SN, Gummadi SN. *Production of Ethanol and Arabitol by Debaryomyces Nepalensis: Influence of Process Parameters.*; 2013. <http://www.amb-express.com/content/3/1/23>
35. Um J, Kim DG, Jung MY, Saratale GD, Oh MK. Metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* for 2,3-butanediol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol*. 2017;245:1567-1574.
36. Kim SJ, Sim HJ, Kim JW, Lee YG, Park YC, Seo JH. Enhanced production of 2,3-butanediol from xylose by combinatorial engineering of xylose metabolic pathway and cofactor regeneration in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol*. 2017;245:1551-1557.
37. Toivari M, Nygård Y, Kumpula EP, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of d-xylose to d-xylonate. *Metab Eng*. 2012;14(4):427-436. doi:10.1016/j.ymben.2012.03.002

38. Liu H, Valdehuesa KNG, Nisola GM, Ramos KRM, Chung WJ. High yield production of d-xylonic acid from d-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*. 2012;115:244-248. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.065
39. Di Lorenzo RD, Serra I, Porro D, Branduardi P. State of the Art on the Microbial Production of Industrially Relevant Organic Acids. *Catalysts.MDPI*. 2022;12(2). doi:10.3390/catal12020234
40. Governo AT, Proença L, Parpot P, Lopes MIS, Fonseca ITE. Electro-oxidation of D-xylose on platinum and gold electrodes in alkaline medium. *Electrochim Acta*. 2004;49(9-10):1535-1545. doi:10.1016/j.electacta.2003.11.013
41. Meryemoglu B, Nis B, Ozsel BK. Organic acids production from low-cost cellulosic substrates by fermentation. *Biomass Convers Biorefin*. Published online January 28, 2023. doi:10.1007/s13399-023-03826-5
42. Anastassiadis S, Aivasidis A, Wandrey C. Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;61(2):110-117. doi:10.1007/s00253-002-1180-8
43. Ma Y, Li B, Zhang X, Wang C, Chen W. Production of Gluconic Acid and Its Derivatives by Microbial Fermentation: Process Improvement Based on Integrated Routes. *Front Bioeng Biotechnol.Frontiers Media S.A*. 2022;10. doi:10.3389/fbioe.2022.864787
44. Singh O V., Kumar R. Biotechnological production of gluconic acid: Future implications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;75(4):713-722. doi:10.1007/s00253-007-0851-x
45. Zhou X, Zhou X, Liu G, Xu Y. Integrated production of gluconic acid and xylonic acid using dilute acid pretreated corn stover by two-stage fermentation. *Biochem Eng J*. 2018;137(15):18-22.
46. Chysirichote T. Valorization of banana peel for citric acid production under solid state fermentation with *aspergillus Niger*. *Chem Biochem Eng Q*. 2020;34(1):49-57. doi:10.15255/CABEQ.2019.1740
47. Liu XY, Chi Z, Liu GL, Wang F, Madzak C, Chi ZM. Inulin hydrolysis and citric acid production from inulin using the surface-engineered *Yarrowia lipolytica* displaying inulinase. *Metab Eng*. 2010;12(5):469-476.
48. Tefara SF, Begna Jiru E, G/Meskel Bairu A. Optimization of fermentation condition for production of lactic acid from khat ("*Catha edulis*") waste by using immobilized *Lactobacillus plantarum*. *Biomass Convers Biorefin*. Published online 2022. doi:10.1007/s13399-022-02797-3
49. Yamane T, Tanaka R. Highly accumulative production of l(+)-lactate from glucose by crystallization fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae*. *J Biosci Bioeng*. 2013;115(1):90-95.

50. Dysvik A, Liland KH, Myhrer KS, et al. Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. *Journal of the Institute of Brewing*. 2019;125(3):342-356. doi:10.1002/jib.569
51. Jantama K, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Svoronos SA, Ingram LO. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng*. 2008;101(5):881-893. doi:10.1002/bit.22005
52. Bondar M, da Fonseca MMR, Cesário MT. Xylonic acid production from xylose by *Paraburkholderia sacchari*. *Biochem Eng J*. 2021;170. doi:10.1016/j.bej.2021.107982
53. Jin D, Ma J, Li Y, et al. Development of the synthesis and applications of xylonic acid: A mini-review. *Fuel.Elsevier Ltd*. 2022;314. doi:10.1016/j.fuel.2021.122773
54. Bañares AB, Nisola GM, Niño K, Valdehuesa G, Lee WK, Chung WJ. Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021;105:5309-5324. doi:10.1007/s00253-021-11410-y/Published
55. Valdehuesa KNG, Ramos KRM, Nisola GM, et al. Everyone loves an underdog: metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.Springer Verlag*. 2018;102(18):7703-7716. doi:10.1007/s00253-018-9186-z
56. Toivari M, Nygård Y, Kumpula EP, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of d-xylose to d-xylonate. *Metab Eng*. 2012;14(4):427-436. doi:10.1016/j.ymben.2012.03.002
57. Lekshmi Sundar MS, Nampoothiri KM. Sustainable production of xylonic acid from acid pre-treated sawdust liquor and subsequent downstream processing. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. Published online January 1, 2024. doi:10.1007/s43393-024-00274-8
58. Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36(11):1435-1438. doi:10.1007/s10295-009-0638-4
59. Zuo Y, Xiao F, Gao J, et al. Establishing *Komagataella phaffii* as a Cell Factory for Efficient Production of Sesquiterpenoid α -Santalene. *J Agric Food Chem*. 2022;70(26):8024-8031. doi:10.1021/acs.jafc.2c02353
60. Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, et al. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*. 2009;8. doi:10.1186/1475-2859-8-29
61. Lima PBA, Mulder KCL, Melo NTM, et al. Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*. 2016;15(1). doi:10.1186/s12934-016-0557-9

62. Siripong W, Wolf P, Kusumoputri TP, et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of isobutanol and isobutyl acetate. *Biotechnol Biofuels*. 2018;11(1). doi:10.1186/s13068-017-1003-x
63. Melo NTM, Pontes GC, Procópio DP, et al. Evaluation of product distribution in chemostat and batch fermentation in lactic acid-producing *Komagataella phaffii* strains utilizing glycerol as substrate. *Microorganisms*. 2020;8(5). doi:10.3390/microorganisms8050781
64. Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, et al. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*. 2009;8. doi:10.1186/1475-2859-8-29
65. Li P, Sun H, Chen Z, Li Y, Zhu T. Construction of efficient xylose utilizing *pichia pastoris* for industrial enzyme production. *Microb Cell Fact*. 2015;14(1). doi:10.1186/s12934-015-0206-8
66. Carneiro CVGC, Serra LA, Pacheco TF, et al. Advances in *Komagataella phaffii* Engineering for the Production of Renewable Chemicals and Proteins. *Fermentation.MDPI*. 2022;8(11). doi:10.3390/fermentation8110575
67. Paes BG, Steindorff AS, Formighieri EF, Pereira IS, Almeida JRM. Physiological characterization and transcriptome analysis of *Pichia pastoris* reveals its response to lignocellulose-derived inhibitors. *AMB Express*. 2021;11(1). doi:10.1186/s13568-020-01170-9
68. Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hähn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. John Wiley and Sons Ltd*. 2007;82(4):340-349. doi:10.1002/jctb.1676
69. López-Garzón CS, Straathof AJJ. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. *Biotechnol Adv*. 2014;32(5):873-904.
70. Blanc CL, Theoleyre MA, Lutin F, Pareau D, Stambouli M. Purification of organic acids by chromatography: Adsorption isotherms and impact of elution flow rate. *Sep Purif Technol*. 2015;141:105-112. doi:10.1016/j.seppur.2014.11.032
71. Wang Q, Chen GQ, Lin L, Li X, Kentish SE. Purification of organic acids using electrodialysis with bipolar membranes (EDBM) combined with monovalent anion selective membranes. *Sep Purif Technol*. 2021;279. doi:10.1016/j.seppur.2021.119739
72. Buchert J, Viikari L, Linko M, Markkanen P. *PRODUCTI ON OF XYLONIC ACID BY PSEUDOMONAS FRAGI*. Vol 8.; 1986.
73. Morais Junior WG, Pacheco TF, Trichez D, Almeida JRM, Gonçalves SB. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *Yeast*. 2019;36(5):349-361. doi:10.1002/yea.3394

74. Pacheco TF, Machado BRC, de Moraes Júnior WG, Almeida JRM, Gonçalves SB. Enhanced Tolerance of *Spathaspora passalidarum* to Sugarcane Bagasse Hydrolysate for Ethanol Production from Xylose. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;193(7):2182-2197. doi:10.1007/s12010-021-03544-6
75. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*. 1992;8(7):501-517. doi:10.1002/yea.320080703
76. Zaini NAM, Chatzifragkou A, Tverezovskiy V, Charalampopoulos D. Purification and polymerisation of microbial D-lactic acid from DDGS hydrolysates fermentation. *Biochem Eng J*. 2019;150. doi:10.1016/j.bej.2019.107265
77. Borzani W, Schmidell W, Lima U de A, Aquarone E. *Biotecnologia Industrial*. Vol 2. Edgard Blucher.; 2001.
78. Schuler MM, Marison IW. Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. Springer Verlag. 2012;94(6):1469-1482. doi:10.1007/s00253-012-4095-z
79. Rocha I, Veloso A, Carneiro S, Ferreira E, Costa R. Implementation of a specific rate controller in a fed-batch *E. coli* fermentation. In: *IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)*. Vol 17. 2008. doi:10.3182/20080706-5-KR-1001.3513
80. Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J*. 2012;64:91-105. doi:10.1016/j.bej.2010.07.017
81. Melo NTM, Mulder KCL, Nicola AM, et al. Effect of pyruvate decarboxylase knockout on product distribution using *pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) engineered for lactic acid production. *Bioengineering*. 2018;5(1). doi:10.3390/bioengineering5010017
82. Roukas; Triantafyllos. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(3):424-433.
83. Lu C, Bentley WE, Rao G. Comparisons of oxidative stress response genes in aerobic *Escherichia coli* fermentations. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83(7):864-870. doi:10.1002/bit.10732
84. Garlapati VK, Shankar U, Budhiraja A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*. Elsevier B.V. 2016;9:9-14. doi:10.1016/j.btre.2015.11.002
85. Pacheco TF, Machado BRC, de Moraes Júnior WG, Almeida JRM, Gonçalves SB. Enhanced Tolerance of *Spathaspora passalidarum* to Sugarcane Bagasse Hydrolysate for Ethanol Production from Xylose. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;193(7):2182-2197. doi:10.1007/s12010-021-03544-6

86. Bianchini I de A, Sene L, da Cunha MAA, Felipe M das G de A. Short-term Adaptation Strategy Improved Xylitol Production by *Candida guilliermondii* on Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. *Bioenergy Res.* 2022;15(2):1182-1194. doi:10.1007/s12155-021-10324-x
87. Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresour Technol.Elsevier Ltd.* 2004;93(1):1-10. doi:10.1016/j.biortech.2003.10.005
88. Bayazit ŞS, Inci I, Uslu H. Adsorption of lactic acid from model fermentation broth onto activated carbon and amberlite IRA-67. *J Chem Eng Data.* 2011;56(5):1751-1754. doi:10.1021/je1006345
89. John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY L(+)-Lactic Acid Recovery from Cassava Bagasse Based Fermented Medium Using Anion Exchange Resins. *Braz arch biol technol v.* 51(6):1241-1248.
90. Karekar SC, Srinivas K, Ahring BK. Batch screening of weak base ion exchange resins for optimized extraction of acetic acid under fermentation conditions. *Chemical Engineering Journal Advances.* 2022;11. doi:10.1016/j.cej.2022.100337
91. Bayazit ŞS, Inci I, Uslu H. Adsorption of glutaric acid and glyoxylic acid onto weakly basic ion-exchange resin: Equilibrium and kinetics. In: *Journal of Chemical and Engineering Data.* Vol 55. 2010:679-684. doi:10.1021/je900357d
92. Gao Q, Liu F, Zhang T, et al. The role of lactic acid adsorption by ion exchange chromatography. *PLoS One.* 2010;5(11). doi:10.1371/journal.pone.0013948

ANEXO

Resultados não apresentados no corpo original da tese

No estudo de purificação e recuperação do ácido xilônico, avaliou-se o efeito da razão volumétrica de etanol em relação ao volume do concentrado obtido após a etapa fermentativa. Para essa análise, foram utilizados concentrados contendo 136,35 g/L e 309,38 g/L de ácido xilônico.

Inicialmente, os ensaios de precipitação foram conduzidos com o concentrado de 136,35 g/L, empregando diferentes proporções volumétricas de etanol (v/v) em relação ao concentrado. As razões avaliadas foram: 1:1 (ensaio A), 2:1 (ensaio B), 3:1 (ensaio C), 4:1 (ensaio D), 5:1 (ensaio E), 6:1 (ensaio F), 7:1 (ensaio G), 8:1 (ensaio H), 9:1 (ensaio I) e 10:1 (ensaio J).

Tabela 16: Percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico obtidos a partir de triplicatas experimentais com concentrado inicial de 136,35 g/L.

Ensaio	Precipitado (g)	[Ác.Xilônico] (g/L)	Ác. Xilônico no precipitado (g)	Pureza (%)	Recuperação (%)
A EtOH (1:1 v/v)	0,027 ± 0,002	2,48 ± 0,32	0,012 ± 0,002	46,11 ± 7,55	3,034 ± 0,392
B EtOH (2:1 v/v)	0,038 ± 0,003	3,16 ± 0,21	0,016 ± 0,001	41,30 ± 1,23	3,861 ± 0,251
C EtOH (3:1 v/v)	0,081 ± 0,023	7,30 ± 1,65	0,037 ± 0,008	45,74 ± 3,22	8,923 ± 2,016
D EtOH (4:1 v/v)	0,151 ± 0,008	24,45 ± 2,32	0,073 ± 0,007	48,60 ± 3,95	17,929 ± 1,703
E EtOH (5:1 v/v)	0,194 ± 0,007	38,74 ± 1,77	0,116 ± 0,005	59,76 ± 1,19	28,412 ± 1,294
F EtOH (6:1 v/v)	0,228 ± 0,017	46,75 ± 1,98	0,140 ± 0,006	61,51 ± 1,90	34,284 ± 1,454
G EtOH (7:1 v/v)	0,238 ± 0,009	72,52 ± 0,95	0,218 ± 0,003	91,38 ± 2,45	53,187 ± 0,694
H EtOH (8:1 v/v)	0,247 ± 0,019	74,25 ± 4,56	0,223 ± 0,014	90,26 ± 2,57	54,458 ± 3,341
I EtOH (9:1 v/v)	0,251 ± 0,017	52,62 ± 1,97	0,158 ± 0,006	62,88 ± 1,88	38,592 ± 1,444
J EtOH (10:1 v/v)	0,235 ± 0,019	48,66 ± 1,66	0,146 ± 0,005	62,26 ± 2,73	35,688 ± 1,219

Com base nos resultados apresentados na Tabela 16, observa-se que a razão volumétrica de etanol influencia nos percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico precipitado. As maiores purezas foram obtidas nos ensaios G (7:1) e H (8:1), que atingiram valores próximos a 90%. Esse comportamento sugere que o aumento gradual do volume de etanol promove inicialmente a redução da solubilidade do ácido xilônico, favorecendo sua precipitação com menor quantidades de impurezas.

Entretanto, nos ensaios conduzidos com razões superiores (I 9:1 e J 10:1), observou-se uma queda expressiva da pureza para valores próximos a 60%, apesar do

maior volume de solvente empregado. Esse resultado indica a existência de um ponto ótimo de proporção etanol/concentrado, acima do qual a adição excessiva de etanol pode alterar o equilíbrio de solubilidade do sistema, ocasionando a precipitação de compostos indesejados.

Além disso, ao analisar simultaneamente os parâmetros de pureza e recuperação, verifica-se que o uso de volumes progressivamente maiores de etanol não resulta em um incremento proporcional da recuperação do ácido xilônico. As recuperações máximas foram observadas nos ensaios G e H (aproximadamente 53–54%), e passaram a diminuir nos ensaios I e J, reforçando a conclusão de que o excesso de solvente não favorece o processo. Assim, os resultados obtidos com esse estudo demonstram que a razão volumétrica entre etanol e concentrado desempenha um papel determinante, e que proporções intermediárias (7:1 e 8:1) representam a faixa mais eficiente para maximizar simultaneamente a pureza e a recuperação do ácido xilônico.

Na etapa seguinte, os ensaios de precipitação foram realizados utilizando o concentrado contendo 309,38 g/L de ácido xilônico, aplicando-se as mesmas proporções volumétricas de etanol (v/v) em relação ao concentrado previamente avaliadas. As razões testadas foram: 1:1 (ensaio K), 2:1 (ensaio L), 3:1 (ensaio M), 4:1 (ensaio N), 5:1 (ensaio O), 6:1 (ensaio P), 7:1 (ensaio Q), 8:1 (ensaio R), 9:1 (ensaio S) e 10:1 (ensaio T).

Tabela 17: Percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico obtidos a partir de triplicatas experimentais com concentrado inicial de 309,38 g/L.

Ensaio	Precipitado (g)	[Ác.Xilônico] (g/L)	Ác. Xilônico no precipitado (g)	Pureza (%)	Recuperação (%)
K EtOH (1:1 v/v)	0,330 ± 0,025	11,80 ± 1,21	0,059 ± 0,006	17,91 ± 1,93	6,355 ± 0,653
L EtOH (2:1 v/v)	0,542 ± 0,115	39,34 ± 8,15	0,167 ± 0,059	27,73 ± 2,83	21,193 ± 4,388
M EtOH (3:1 v/v)	0,831 ± 0,043	77,08 ± 4,44	0,385 ± 0,022	47,49 ± 0,73	40,178 ± 0,747
N EtOH (4:1 v/v)	0,928 ± 0,072	87,64 ± 5,09	0,438 ± 0,025	47,26 ± 1,03	47,213 ± 2,743
O EtOH (5:1 v/v)	0,912 ± 0,067	84,50 ± 0,31	0,443 ± 0,035	48,53 ± 1,16	45,522 ± 0,168
P EtOH (6:1 v/v)	0,956 ± 0,057	158,94 ± 3,48	0,815 ± 0,037	88,23 ± 1,84	85,624 ± 1,874
Q EtOH (7:1 v/v)	0,886 ± 0,051	94,32 ± 0,85	0,497 ± 0,045	52,55 ± 3,31	50,812 ± 0,457
R EtOH (8:1 v/v)	0,919 ± 0,171	107,58 ± 1,33	0,512 ± 0,045	52,97 ± 2,90	57,955 ± 0,716
S EtOH (9:1 v/v)	0,940 ± 0,061	115,70 ± 2,285	0,535 ± 0,084	60,21 ± 3,71	62,871 ± 1,231
T EtOH (10:1 v/v)	0,805 ± 0,039	76,18 ± 8,97	0,426 ± 0,084	46,62 ± 2,68	41,040 ± 4,830

Os resultados obtidos com o concentrado de 309,38 g/L de ácido xilônico revelaram um comportamento distinto daquele observado para o concentrado de 136,35 g/L. A razão etanol:concentrado de 6:1 (ensaio P) mostrou ser a condição de melhor desempenho, alcançando pureza de 88,23% e recuperação de 85,62%. Esses valores superam os máximos obtidos com o fermentado de ácido xilônico menos concentrado, nos quais a pureza atingiu aproximadamente 90% apenas nas razões 7:1–8:1, porém com recuperação significativamente inferior (53–54%). Assim, para o fermentado de ácido xilônico mais concentrado, a proporção 6:1 permitiu elevar os percentuais de pureza e de recuperação do ácido xilônico precipitado.

De modo geral, observou-se um aumento progressivo dos indicadores de desempenho entre os ensaios K (1:1) e P (6:1). Nesse intervalo, houve crescimento consistente na massa precipitada, na quantidade de ácido xilônico presente no precipitado obtido e nos valores de pureza e recuperação. Esse comportamento sugere que o aumento da proporção de etanol até um limiar crítico favorece a supersaturação e a precipitação do ácido xilônico, elevando eficiência do processo.

Após o ponto ótimo, entretanto, as razões superiores a 6:1 (ensaios Q–T) não promoveram melhorias adicionais. Pelo contrário, tanto a pureza quanto a recuperação passaram a oscilar e, no ensaio T (10:1), apresentaram queda acentuada, com valores de 46,6% e 41,0%, respectivamente. Esses resultados indicam que o excesso de etanol pode reduzir a seletividade da precipitação, possivelmente devido à co-precipitação de impurezas ou redistribuição do soluto entre as fases, prejudicando o desempenho do processo.

Dessa forma, a razão 6:1 mostrou ser a condição mais favorável para aumentar tanto a pureza quanto a recuperação, partindo de um concentrado com 309,38 g/L de ácido xilônico. Como recomendações de trabalhos futuros, sugere-se validar essa condição com repetições, explorar razões próximas (5:1–7:1), visando assegurar a robustez do processo e seu potencial de escalonamento.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 26 de Novembro de 2025 .

Assinatura do/a discente: Isabela Castro de Almeida

Programa: Pesquisa de Pós-Graduação em Química

Nome completo: Isabela Castro de Almeida

Título do Trabalho: Produção de ácido xilônico por fermentação utilizando a cepa PSHU2 da Komagataella phaffii modificada geneticamente

Nível: () Mestrado ☒ Doutorado

Orientador/a: Prof. Falmirio Machado Silva