



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

THAMARYS SCAPINI

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE POLPA DE MELANCIA UTILIZANDO UMA
NOVA ESPÉCIE DE *Wickerhamomyces* ISOLADA DE MADEIRA EM
DECOMPOSIÇÃO**

ERECHIM

2021

THAMARYS SCAPINI

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE POLPA DE MELANCIA UTILIZANDO UMA
NOVA ESPÉCIE DE *Wickerhamomyces* ISOLADA DE MADEIRA EM
DECOMPOSIÇÃO**

Dissertação de mestrado, apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Dra. Helen Treichel

Coorientadora: Dra. Gislaine Fongaro

ERECHIM

2021

AGRADECIMENTOS

Com todo meu coração agradeço a minha família: Pai, Mãe, Daiane, Nathan, João Lucas e Miguel. Obrigada pelo apoio incondicional, por todo o amor transmitido, pelo incentivo e compreensão. Eu amo incondicionalmente vocês.

Ao meu companheiro de vida e maior incentivador: Rodrigo. Agradeço por ter sido fortaleza e calma sempre. E principalmente pela paciência durante todo o processo acadêmico, desde o vestibular, a graduação, a processos seletivos, e ao mestrado (e vamos de doutorado?).

Meu agradecimento às minhas grandes inspirações: Professoras Helen Treichel e Gislaíne Fongaro. Que privilégio ter duas mulheres tão fortes como mentoras. Obrigada por todas as oportunidades, pela orientação e confiança, e pela amizade de vocês. Vocês me acolheram e me orientaram para a vida. Eu sou muito grata por poder contar com esse apoio.

À família que a vida me deu: aos meus grandes amigos do LAMIBI. Eu agradeço por tudo que vocês fazem e por tudo que representam na minha trajetória. Obrigada por serem presentes, compreensivos e atenciosos. E por todo suporte para construção deste trabalho. Vocês são essenciais e eu amo demais todos vocês.

Agradeço ao Professor Dr. Sérgio Luiz Alves Jr. por inúmeras discussões construtivas, por me instigar com questionamentos que me desafiavam a buscar mais conhecimento. Meu agradecimento ao Professor Dr. Marco Di Luccio pela atenção e contribuições a este trabalho. E aproveito para agradecer-los por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora.

Ao corpo técnico da UFFS por todo suporte. Especialmente a Suzana, por realizar as quantificações analíticas deste trabalho com tamanha competência e atenção. Obrigada pelas longas conversas e discussões, e principalmente por toda paciência e compreensão.

Aos meus amigos e colegas do PPGCTA. Ao corpo docente pelo conhecimento transmitido e pela confiança depositada em muitos momentos. E a minha colega e amiga Dra. Caroline Muller pelos momentos de aprendizado e longas conversas.

Agradeço ao suporte institucional e financeiro da CAPES, CNPq, UFFS e PPGCTA.

Agradeço a toda a equipe que sempre esteve ao meu lado, a minha família e a todos os profissionais que confiaram em mim e me oportunizaram todos os caminhos que trilhei. Vocês foram cruciais para eu estar aqui conquistando mais um sonho.

“Se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton (1676)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar uma estratégia de fermentação em batelada sequencial com reciclo celular para produção de etanol. O processo foi realizado utilizando resíduo de melancia como substrato e a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 como microrganismo fermentador. Os experimentos iniciais foram conduzidos para avaliar o potencial do resíduo e do microrganismo fermentador para produção de etanol. Os resultados demonstraram que a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 tem potencial para produção de etanol em substrato de resíduo de melancia, demonstrado pela eficiência de rendimento fermentativo de 95% em 9 h de processo, pelo reduzido rendimento de glicerol, pela capacidade de propagação celular, pela dispensa de suplementação com fonte de nitrogênio e, ainda, por apresentar capacidade fermentativa similar a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. Na sequência, a estratégia fermentativa de batelada sequencial com reciclo celular foi iniciada e conduzida ao longo de trinta ciclos. Os resultados demonstraram a redução de 6 h do tempo de fermentação após seis ciclos fermentativos. Além disso, a fermentação conduzida em batelada sequencial beneficiou a propagação celular, destacando ainda o aumento em quatro vezes na produtividade. A capacidade de fermentação da levedura foi mantida ao longo das trinta bateladas, com rendimentos superiores a 90% do rendimento teórico. A ação de adaptação por pressão seletiva foi avaliada pelo isolamento de colônias advindas do agrupamento celular do trigésimo reciclo, que ao serem expostas a diferentes fontes de carbono apresentaram diferença estatística, destacando o consumo de glicose e xilose. A utilização de polpa de melancia residual como substrato para fermentação alcoólica em estratégia de batelada sequencial com reciclo celular de uma levedura não convencional apresenta-se como novidade neste estudo.

Palavras-chave: Reciclo celular. Rendimento fermentativo. Resíduo de fruta.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate a sequential batch fermentation strategy with cell recycling for ethanol production. The process was carried out using watermelon residue as a substrate and the yeast *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 as a fermenting microorganism. The initial experiments were conducted to evaluate the residue's potential and the fermenting microorganism for ethanol production. The results showed that the yeast *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 has the potential for ethanol production on a watermelon residue substrate, demonstrated by the efficiency of 95% fermentative efficiency in 9 h of process, the reduced glycerol yield, the cell propagation capacity, and the dispensing supplementation with nitrogen source, and for presenting fermentative capacity similar to *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1. Then, the sequential batch fermentation strategy with cell recycling was initiated and conducted over thirty cycles. The results showed a 6 h reduction in the fermentation time after six fermentation cycles. In addition, the fermentation carried out in sequential batches benefited cell propagation, highlighting the fourfold increase in productivity. The yeast fermentation capacity was maintained throughout the thirty batches, with yields above 90% of the theoretical yield. The adaptation action by selective pressure was evaluated by the isolation of colonies from the cell group of the thirtieth recycle, which when exposed to different carbon sources showed a statistical difference, highlighting the consumption of glucose and xylose. The use of residual watermelon pulp as a substrate for alcoholic fermentation in a sequential batch strategy with cell recycling of an unconventional yeast is a novelty in this study.

Keywords: Cell recycling. Ethanol yield. Fruit residue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Fluxograma destacando as principais etapas realizadas neste trabalho..... 13
- Figura 2-** Resíduo de melancia in natura (à esquerda) e após processamento (à direita)..... 14
- Figura 3-** Desempenho da produção de etanol de *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 utilizando PMP. *Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística entre si pelo Teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p_{valor} > 0,05$)..... 21
- Figura 4** – Processo fermentativo em meio de polpa de melancia suplementado com ureia (0,3%) (A) e extrato de levedura (0,3%) e peptona (0,5%) (B) utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. *Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística entre si pelo Teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p_{valor} > 0,05$)..... 25
- Figura 5** – Dados experimentais de concentração de açúcares totais, etanol e biomassa de seis bateladas com a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 em sistema de reciclo celular. (A) Primeiro (9 h), segundo (6 h) e terceiro (6 h) reciclo; (B) Quarto (6 h), quinto (6 h) e sexto (3 h) reciclo..... 28
- Figura 6** - Dados experimentais de concentração de açúcares totais, etanol e biomassa de três bateladas (10°, 20° e 30°) com a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2..... 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados do processo fermentativo conduzido com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 utilizando suco de melancia como substrato, em comparação com os resultados obtidos para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 24
- Tabela 2** – Comparação entre os processos sem e com adição de fontes de nitrogênio em meio PMP em 9 h de fermentação alcoólica. * Letras minúsculas iguais em mesma coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% ($p_{\text{valor}} > 0,05$) 26
- Tabela 3** – Parâmetros de produção de etanol e diferença de crescimento celular na fermentação em batelada sequencial. *Letras minúsculas iguais em mesma linha não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% ($p_{\text{valor}} > 0,05$)..... 29
- Tabela 4** – Consumo da fonte de carbono avaliado em meio sintético, utilizando cepas isoladas do conjunto de biomassa do último ciclo em batelada sequencial. *Letras minúsculas iguais em mesma coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% ($p_{\text{valor}} > 0,05$). 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO.....	14
3.2 MICRORGANISMO	14
3.3 MANUTENÇÃO DA LEVEDURA E PREPARO DO INÓCULO	15
3.4 MEIO FERMENTATIVO	15
3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	15
3.6 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO.....	16
3.7 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SUCESSIVA COM RECICLO DE CÉLULAS	16
3.8 EFEITO DO SISTEMA EM BATELADA SEQUENCIAL NAS CÉLULAS DA LEVEDURA.....	17
3.8.1 Avaliação do processo fermentativo com redução da densidade celular	17
3.8.2 Fermentação em meio sintético com diferentes fontes de carbono	17
3.9 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.....	18
3.10 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO.....	19
3.11 MÉTODOS ANALÍTICOS	19
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM A LEVEDURA <i>Wickerhamomyces</i> sp. UFFS-CE- 3.1.2	21
4.1.1 Fermentação alcoólica do meio PMP com levedura industrial <i>S. cerevisiae</i> CAT-1	23
4.1.2 Influência da adição de fontes de nitrogênio ao meio PMP	24
4.2 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SEQUENCIAL COM RECICLO DE CÉLULAS....	27
4.3 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DA LEVEDURA APÓS O RECICLO CELULAR EM FERMENTAÇÃO BATELADA.....	33
5 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A- PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO (2019-2021) VINCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO.....	38

1 INTRODUÇÃO

O desperdício de alimentos tem aumentado globalmente devido a uma série de fatores como o crescimento populacional, econômico e principalmente por falhas durante a cadeia de abastecimento e consumo alimentar (Pramanik *et al.*, 2019). A geração destes resíduos tornou-se um tópico muito discutido pelo poder público e órgãos de grande influência mundial, como a ONU (Organização das Nações Unidas) e FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*). Consequentemente, estas questões se tornaram foco de pesquisas que abordam segurança alimentar, proteção ambiental e valorização de resíduos.

Frutas e vegetais estão entre os alimentos com maior índice de perdas na cadeia produtiva, gerando impactos econômicos, ambientais e sociais. A ONU designou 2021 como o Ano Internacional das Frutas e Vegetais, buscando chamar atenção para a problemática do desperdício e da perda destes alimentos e por inovações tecnológicas que objetivem minimizar as questões ambientais atreladas a estes fatores (ONU, 2021).

A geração destes resíduos precisa ser evitada, reduzida, processada e reciclada para que seja possível desenvolver uma economia circular em um mundo de rápido aumento populacional e expansão urbana. A exploração de tecnologias de aplicação de perdas não evitáveis de alimentos oferece uma oportunidade para mitigação de impactos ambientais. Uma estratégia possível é a utilização na cadeia de produção de biocombustíveis visando a redução na demanda por combustíveis fósseis e de emissão de gases do efeito estufa (Karthikeyan *et al.*, 2018).

Os resíduos de frutas são ricos em carboidratos e minerais, e têm altos teores de açúcares fermentescíveis, podendo ser aplicados como matéria-prima na produção de biocombustíveis. Surge assim uma estratégia para o gerenciamento de resíduos do setor e para a valorização das perdas de alimentos não apropriados para o consumo (Evcán e Tari, 2015; Hegde, Lodge e Trabold, 2018).

Dentre as frutas com maior perda nas colheitas e com potencial de aproveitamento integral ainda pouco explorado, a melancia (*Citrullus lanatus*) é uma cultura desenvolvida principalmente em regiões tropicais com uma produção global de 103 milhões de toneladas no ano de 2018 (FAOSTAT, 2020). Estima-se que cerca de 20% da colheita anual não seja comercializada devido a imperfeições na superfície ou deformidades, permanecendo na lavoura (Fish, Bruton e Russo, 2009). Além disso, um grande percentual é descartado nos locais de comercialização por amadurecimento excessivo, manchas na superfície, regiões esbranquiçadas e amassamentos.

Considerando o cenário brasileiro, com produção de 2 milhões de toneladas no ano de 2018 (FAOSTAT, 2020), as perdas são de aproximadamente 400 mil toneladas. A utilização de resíduos de melancia como substrato na produção de etanol pode fornecer uma alternativa para o acúmulo deste resíduo nas lavouras e valorizar economicamente as frutas não adequadas para comercialização, sendo uma matéria-prima alternativa de baixo custo econômico.

Ainda há poucas informações disponíveis sobre produção de etanol utilizando resíduos de alimentos em que o processo esteja otimizado, possua alto rendimento e tempo de fermentação relativamente curto, que despertem o interesse econômico para adequação e incorporação de plantas industriais. Para garantir o aumento na matriz energética faz-se necessário que o processo possa ser ampliado até atingir o nível comercial, com sistemas fermentativos bem estabelecidos e otimizados, rendimentos elevados a produtos de interesse e microrganismos altamente adaptados ao meio (Bonatto *et al.*, 2020).

Os microrganismos fermentadores são uma parte crucial na produção de etanol, e em escalas industriais este processo é geralmente realizado por leveduras, sendo as cepas de *Saccharomyces* tradicionalmente utilizadas, devido à elevada eficiência e tolerância a etanol (Souza *et al.*, 2018; Zabed *et al.*, 2014). Ainda assim, muitos pesquisadores exploram e caracterizam diferentes espécies de leveduras que possuam características relevantes, iguais ou superiores às encontradas em espécies de *Saccharomyces*, como maior tolerância a inibidores e a elevadas temperaturas e concentração de substratos.

Muitas espécies já foram isoladas de diferentes ambientes, e apresentam-se como um recurso ainda pouco explorado, oferecendo inovação aos processos fermentativos estabelecidos (Nandal, Sharma e Arora, 2020). Cepas não convencionais podem apresentar características interessantes para processos industriais, independente do organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo de interesse científico a exploração de recursos biológicos que permitam vislumbrar o desenvolvimento de novas estratégias fermentativas.

Recentemente, uma nova espécie de levedura *Wickerhamomyces* foi isolada de amostras de madeira em decomposição e apresentou potencial para fermentar hidrolisado de cana de açúcar a etanol na presença de inibidores (Bazoti *et al.*, 2017). Essa mesma espécie foi avaliada para processo baseado no uso de água do mar e efluente de camarão utilizando resíduos de mamão (*Carica papaya*), no qual demonstrou capacidade fermentativa na presença de altas concentrações salinas e inibidores (Bonatto *et al.*, 2021). Sendo assim, por ser uma levedura ainda pouco

explorada, estudos que visem diferentes substratos e sistemas de fermentação são interessantes para avaliar os potenciais desta cepa para produção de etanol.

Neste cenário, destaca-se a relevância deste estudo na área de desenvolvimento de biotecnologias com potencial para expandir as matrizes energéticas, dando ênfase a processos ambientalmente sustentáveis e com viabilidade de escalonamento. A exploração da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 em sistema de batelada sequencial para produção de etanol, juntamente com o potencial de utilização de uma biomassa ainda pouco explorada, como resíduo de polpa de melancia, apresentam os elementos de novidade deste estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do resíduo polpa de melancia processado como substrato na produção de etanol pela levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2, bem como o reciclo celular e o comportamento de tal levedura no processo fermentativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a capacidade fermentativa da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 para produção de etanol utilizando o resíduo polpa de melancia, baseado na comparação do processo realizado com a levedura *S. cerevisiae* CAT-1.
- Investigar os efeitos da suplementação do meio fermentativo para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2.
- Avaliar o potencial de reciclo celular e a capacidade fermentativa da *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 em sistema de fermentação em batelada sequencial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 1 apresenta esquematicamente o desenho experimental realizado neste estudo relacionado ao desenvolvimento de um bioprocesso para produção de etanol utilizando resíduo de polpa de melancia e uma nova espécie de levedura do gênero *Wickerhamomyces*. Após a extração da polpa da melancia utilizada como substrato no processo, diferentes configurações de fermentação foram conduzidas: com o meio bruto (apenas polpa de melancia) e suplementado com ureia e extrato de levedura + peptona. Além disso, experimentos adicionais com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foram conduzidos para análise e comparação com os resultados obtidos para *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. Posteriormente, baseado nos resultados da primeira etapa, a fermentação em batelada sequencial com reciclo celular foi conduzida. Ao final, experimentos utilizando as células da levedura após os ciclos foram realizados visando elucidar algumas observações realizadas durante o processo.

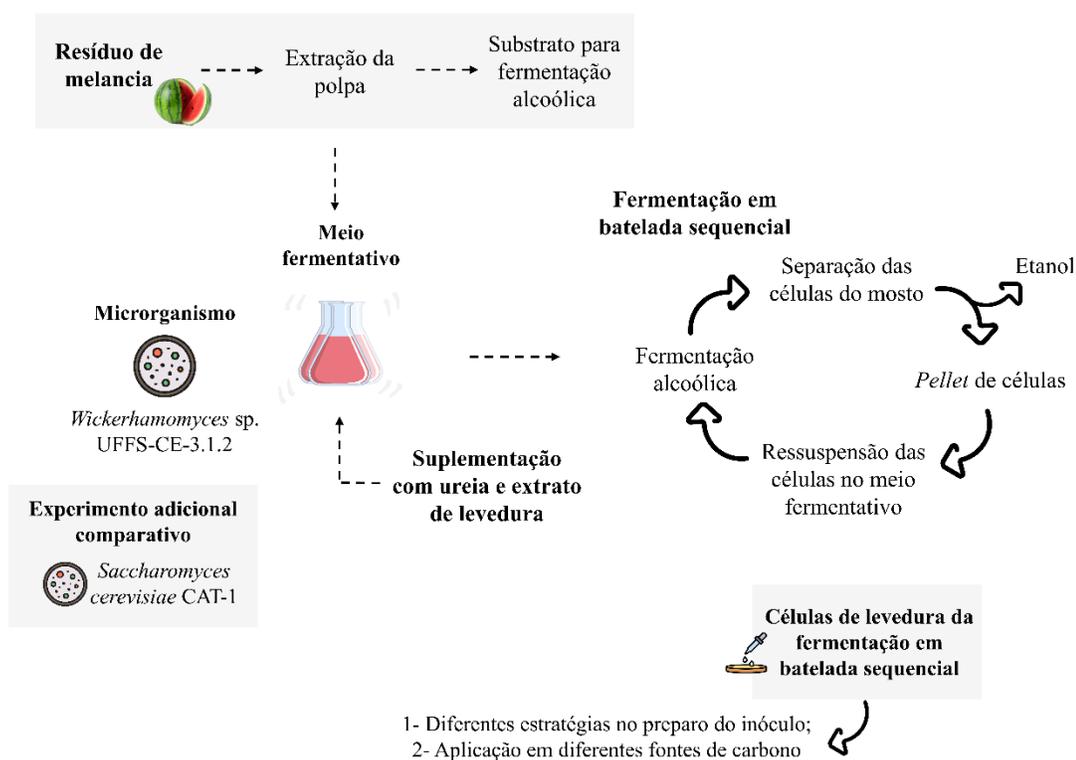


Figura 1- Fluxograma destacando as principais etapas realizadas neste trabalho

3.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO

Os resíduos de melancia foram gentilmente cedidos por um mercado local da cidade de Erechim, RS, Brasil. Os resíduos seriam encaminhados para descarte em aterro sanitário por estarem inapropriados para o consumo, sendo pelo amadurecimento excessivo ou alterações na superfície da fruta. As amostras coletadas foram transportadas e imediatamente processadas (Figura 2).

A polpa do resíduo foi separada das demais partes e processada em liquidificador industrial. O líquido proveniente do processamento foi armazenado em frascos de polietileno e mantido sob refrigeração (-60 °C) até a utilização.



Figura 2- Resíduo de melancia *in natura* (à esquerda) e após processamento (à direita).

3.2 MICRORGANISMO

A principal levedura utilizada neste estudo foi a *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2, isolada de amostras de madeira em decomposição coletadas nas matas do *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (SC, Brasil). A cepa da levedura foi identificada conforme descrito no estudo de Bazoti *et al.*, 2017 (Número de acesso ao GenBank: MF538579 e MF538580). Adicionalmente, para efeito de comparação, foi utilizada a linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, uma cepa industrial cedida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, São Paulo, Brasil) considerada organismo modelo para produção de etanol (Basso *et al.*, 2008).

3.3 MANUTENÇÃO DA LEVEDURA E PREPARO DO INÓCULO

A manutenção da levedura foi realizada em meio YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 2% ágar) e o armazenamento da cultura estoque foi feito a 4 °C. O repique para reativação celular e preparo do inóculo foi realizado em 10 mL de meio YPD em ágar inclinado, mantidos a 30 °C durante 72 h em estufa incubadora BOD (Solab Científica® 200). Após o período de crescimento, as células foram transferidas para 10 mL de YPD líquido e mantidas em BOD durante 24 h a 30 °C.

Para preparo do inóculo, o meio YPD foi separado das células de levedura por centrifugação (Nova Técnica® NT815) a 805 RCF (*Relative Centrifugal Force*) a 4 °C durante 10 min. O *pellet* de células foi utilizado como inóculo da fermentação alcoólica. A contagem de células e estimativa de viabilidade celular foi realizada no início das fermentações alcoólicas por microscopia óptica em câmara de Neubauer (com aumento de 40x) utilizando corante azul de metileno.

3.4 MEIO FERMENTATIVO

O líquido resultante da polpa de melancia processada (PMP) foi utilizado como meio fermentativo, sem quaisquer suplementações. Para o preparo do meio fermentativo, o líquido foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1 para redução da concentração de sólidos insolúveis. Posteriormente, 200 mL do meio filtrado foram colocados em Erlenmeyers e o material foi autoclavado (15 min, 121 °C, 1 atm) e resfriado a temperatura ambiente.

3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O processo fermentativo foi iniciado pela ressuspensão do *pellet* de células da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 no meio fermentativo estéril. A massa celular ressuspensa correspondeu a um inóculo inicial de 10^6 cél. mL⁻¹. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de caldo fermentativo incubados em agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova® 42) em 80 rpm a 30 °C durante 24 h (Bazoti *et al.*, 2017). As amostragens foram realizadas a cada 3 h durante 12 h de fermentação e após uma amostragem foi realizada em 24 h, para quantificação da concentração de etanol, glicerol e açúcares determinados por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), conforme descrito na seção 3.11. Para estimar a

concentração da biomassa foram realizadas medidas de densidade óptica a 600 nm e avaliado conforme descrito na seção 3.9. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O procedimento experimental foi conduzido de maneira idêntica ao descrito para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 utilizando a cepa *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 visando comparar o comportamento da levedura não convencional e da levedura industrial.

3.6 SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO

A fermentação foi realizada utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 com concentração celular inicial de 10^6 cél. mL⁻¹ e foi conduzida em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio fermentativo. O meio PMP foi utilizado como única fonte de carbono e a suplementação foi realizada em dois sistemas: (I) com adição de ureia em uma concentração de 0,3% (m v⁻¹); (II) com adição de extrato de levedura e peptona, em uma concentração de 0,3% e 0,5% (m v⁻¹), respectivamente (Raposo *et al.*, 2017). As amostras foram incubadas em agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova® 42) em 80 rpm a 30 °C durante 24 h (Bazoti *et al.*, 2017). Os resultados são apresentados em termos de concentração de açúcares, etanol e glicerol quantificados por HPLC, e foi realizada a estimativa da biomassa por densidade óptica a 600 nm.

3.7 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SUCESSIVA COM RECICLO DE CÉLULAS

A fermentação em batelada sucessiva foi realizada em Erlenmeyers (500 mL) com 200 mL de meio fermentativo, preparado conforme descrito previamente, e incubado em agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova® 42) a 80 rpm e 30 °C (Bazoti *et al.*, 2017). Após cada fermentação, o meio fermentado foi centrifugado a 805 RCF, 4 °C durante 10 min, para precipitação celular. O sobrenadante (caldo fermentado) foi separado das células que foram ressuspensas em meio fermentativo estéril para reiniciar a fermentação. Este procedimento de centrifugação e ressuspensão foi realizado no reinício de cada ciclo. Durante o processo fermentativo foram realizadas quantificações da concentração de etanol, glicerol e açúcares por HPLC. Foi realizada a contagem das células viáveis para cada início de fermentação e medida de densidade óptica (600 nm) para estimativa da biomassa. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8 EFEITO DO SISTEMA EM BATELADA SEQUENCIAL NAS CÉLULAS DA LEVEDURA

Com a redução do tempo de fermentação durante o processo em batelada sequencial e aumento da densidade celular ($\sim 10^9$ cél mL⁻¹), uma investigação adicional foi conduzida utilizando as células de levedura do último reciclo para avaliação da fermentação alcoólica pela redução da densidade celular para 10^6 cél mL⁻¹. Uma segunda estratégia experimental foi realizada, na qual processos fermentativos com meios sintéticos foram conduzidos utilizando diferentes fontes de carbono e como inóculo foram utilizadas oito colônias derivadas do agrupamento celular do último reciclo.

3.8.1 Avaliação do processo fermentativo com redução da densidade celular

Uma investigação adicional foi realizada com as células da levedura após o último reciclo celular. Para tal, ao finalizar o processo de batelada sequencial as células foram separadas do mosto fermentado por centrifugação (Nova Técnica® NT815) a 805 RCF, 4 °C durante 10 min. Na sequência, as células do último reciclo foram reintroduzidas em 200 mL de meio PMP, apenas com redução da densidade celular.

A fermentação foi iniciada com inóculo de 10^6 cél mL⁻¹, preparado pela ressuspensão de uma alíquota da biomassa centrifugada após a última batelada. O meio fermentativo foi preparado conforme seção 3.4, e as condições experimentais foram realizadas conforme seção 3.5. O processo foi avaliado por 24 h, e as amostras foram quantificadas em termos de açúcares, etanol e glicerol utilizando HPLC.

3.8.2 Fermentação em meio sintético com diferentes fontes de carbono

Ao final dos ciclos as células foram transferidas para uma placa de petri com meio YPD utilizando a técnica de esgotamento de inóculo para separar colônias. Após crescimento por 48 h a 30 °C, oito colônias foram separadas por processo de repique para placas com YPD para aumento da quantidade de células (72 h, 30 °C). Posteriormente, as oito colônias foram avaliadas para diferentes fontes de carbono visando comparar com o desempenho das células da levedura em estoque.

As colônias isoladas foram repicadas para meio YPD (2% glicose), YPF (2% frutose), YPS (2% sacarose), YPX (2% xilose) e YPG (2% glicerol) e foram mantidas durante 72 h a 30 °C.

Posteriormente, o inóculo foi preparado transferindo as células para meio YP líquido (sem ágar), com a respectiva fonte de carbono durante 24 h a 30 °C.

O inóculo respectivo de cada fonte de carbono foi adicionado ao meio fermentativo em relação de 10% (v v⁻¹). O meio para o processo fermentativo foi preparado com uma única fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose, xilose ou glicerol) com concentração de 5% (m v⁻¹) (Yamakawa *et al.*, 2020). O procedimento experimental foi realizado em Erlenmeyers (125 mL) com 25 mL de meio fermentativo composto, além da fonte de carbono, por 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ fosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄), 3 g L⁻¹ fosfato de monopotássio (KH₂PO₄) e 0,05 g L⁻¹ sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) (Yamakawa *et al.*, 2020).

As amostras foram mantidas em agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova[®] 42) a 30 °C, 80 rpm durante 24 h, sendo amostrado ao início (0 h) e ao final (24 h) do processo fermentativo. O experimento foi realizado em triplicata, e as amostras foram quantificadas em HPLC. Os resultados são apresentados em termos de consumo da fonte de carbono (%).

3.9 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

Para estimar a concentração de biomassa nos processos fermentativos foi elaborada uma curva de calibração de densidade óptica (600 nm) *versus* concentração de células em termos de massa seca (g L⁻¹). Quatro suspensões concentradas de células de levedura preparadas de mesma maneira foram utilizadas para este procedimento. Sendo assim, a levedura estoque foi repicada para meio YPD sólido e mantida em crescimento durante 72 h. Posteriormente, transferidas para YPD líquido. Três das amostras de suspensão celular foram filtradas em cadinho de vidro tipo Gooch (50 mL) com filtro de fibra de vidro 22 µm previamente seco (105 °C por 24 h) e pesados. Após a filtração, as três amostras foram secas a 65 °C em estufa de circulação de ar até massa constante e transferidas para dessecador para atingir temperatura ambiente. As amostras foram pesadas para estimar a massa celular (g L⁻¹). A concentração da amostra de suspensão de células não filtrada foi estimada pela massa seca quantificada na triplicata. Com concentração estimada, a amostra não filtrada foi utilizada em diferentes diluições que foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis em 600 nm. A curva de calibração (Equação 1) foi validada com faixa de densidade óptica de 0,08 a 0,7 (R² 0,99).

$$\text{Células (g L}^{-1}\text{)}=0,5034*\text{OD}$$

(Equação 1)

3.10 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

A determinação do rendimento fermentativo ($Y_{P/S}$), produtividade de etanol (p_E), rendimento de biomassa ($Y_{X/S}$), eficiência de fermentação em termos de rendimento teórico máximo (η_E) e coeficiente de rendimento de biomassa em etanol ($Y_{P/X}$) foram calculados, conforme equações abaixo. Sendo, $EtOH_p$ a concentração de etanol produzida ($g L^{-1}$), S_f e S_o as concentrações final e inicial de substrato ($g L^{-1}$), X_f e X_o refere-se à concentração celular ($g L^{-1}$) e t corresponde ao tempo de fermentação (h) (Shuler, Kargi, 2002).

$$Y_{P/S} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(EtOH_p)}{(S_f - S_o)} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$\eta_E (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,511} * 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

$$Y_{X/S} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(X_f - X_o)}{(S_f - S_o)} \quad \text{(Equação 4)}$$

$$p_E \left(\frac{g}{L h} \right) = \frac{EtOH_p}{t} \quad \text{(Equação 5)}$$

$$Y_{P/X} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(EtOH_p)}{(X_f - X_o)} \quad \text{(Equação 6)}$$

3.11 MÉTODOS ANALÍTICOS

A quantificação dos açúcares totais, etanol e glicerol das amostras de fermentação foram determinados por HPLC, utilizando um cromatógrafo Shimadzu equipado com detector de índice de refração RID-10A, operado com coluna Aminex[®] Biorad HPX-87H, utilizando fase móvel de ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,005 mol L^{-1}$, modo isocrático, volume de injeção de $20 \mu L$, vazão de $0,6 mL min^{-1}$ e temperatura de $45 \text{ }^\circ C$. A fase móvel foi preparada utilizando H_2SO_4 (Sigma-Aldrich) na concentração adequada ($0,005 mol L^{-1}$), filtrada a vácuo em membrana $0,45 \mu m$, e degaseificada

em banho ultrassônico (UNIQUE USC-1800A) por 40 minutos. Para quantificar os açúcares das amostras de fermentação utilizando a coluna Aminex[®] Biorad HPX-87H foi necessário realizar hidrólise das amostras com enzima invertase (Sigma-Aldrich, EUA), sendo este procedimento necessário para evitar que ocorresse a hidrólise catalisada pelo eluente (H₂SO₄) das ligações de glicose-frutose durante o tempo das injeções no cromatógrafo (Fish, Bruton e Russo, 2009). A hidrólise enzimática foi realizada com 200 µL de amostra e 200 µL de enzima invertase a 50 °C durante 30 min. A atividade enzimática foi determinada utilizando sacarose como substrato, e o produto da hidrólise foi quantificado por método padrão utilizando p-hidroxibenzohidrazida 0,5%. Após a hidrólise, as amostras foram preparadas para quantificação em HPLC.

O preparo das amostras foi realizado pela diluição (1:10) em fase móvel e filtradas em membrana de acetato de celulose de 25mm e 0,45 µm de tamanho médio de poros (Millipore[®]). A concentração dos compostos foi determinada por curvas de calibração construídas utilizando reagentes padrão (Sigma-Aldrich) para HPLC.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA), efeitos e comparação de médias (Teste de Tukey) foram realizadas utilizando um nível de confiança de 95% ($p_{valor} < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM A LEVEDURA *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2

O meio PMP apresentou concentração de açúcares totais de $76,89 \pm 2,32 \text{ g L}^{-1}$, sendo três açúcares majoritários: glicose e frutose (monossacarídeos) e sacarose (dissacarídeo). Estes são os principais açúcares utilizados como substratos na fermentação, o que favorece a conversão a etanol pela levedura pela assimilação facilitada. O perfil experimental da produção de etanol pela levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 durante a fermentação do meio PMP são representados na Figura 1. Os resultados são expressos em termos de açúcares totais, etanol, glicerol e biomassa.

A maior produção de etanol ($35,06 \pm 0,71 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida após 9 h, resultando em um rendimento fermentativo de $0,496 \pm 0,035 \text{ g g}^{-1}$. Após 9 h, a produção de etanol, consumo de açúcares e produção de glicerol estabilizaram, não apresentando diferença estatística entre as amostragens após este período ($p_{\text{valor}} > 0,05$).

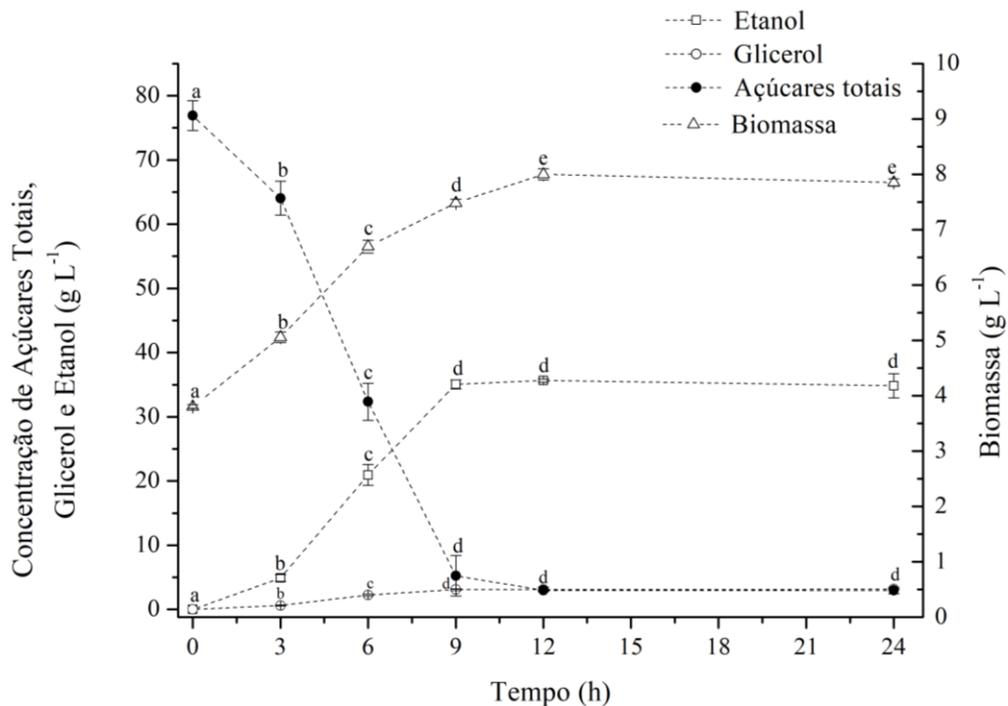


Figura 3- Desempenho da produção de etanol de *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 utilizando PMP. *Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística entre si pelo Teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p_{\text{valor}} > 0,05$).

Os resultados evidenciam que a concentração de açúcares diminui rapidamente entre 3 h e 9 h à medida que o etanol é produzido. Com base no teor de açúcares, o processo fermentativo atingiu $95 \pm 1,97\%$ do rendimento teórico em 9 h.

O crescimento da levedura no meio aumentou rapidamente, acompanhando a redução do teor de açúcares e aumento da concentração de etanol, e estabilizando após 12 h de fermentação. Este aumento acentuado de células é esperado em operação de sistema batelada, em que as células apresentam alta taxa de crescimento e baixa taxa de manutenção da biomassa (Shuler, Kargi, 2002). Interessante observar que o aumento da densidade celular ocorre rapidamente logo nas primeiras horas de fermentação, estando em $3,80 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ em 0 h e $5,05 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ em 3 h. Este resultado evidencia que o período de adaptação das células no meio PMP foi curto, resultante da elevada densidade celular e pela presença de altas concentrações de mono- e dissacarídeos facilmente assimiláveis pelas células, acarretando rápida adaptação pela regulação dos processos metabólicos. Em escala industrial é desejável que a fase de adaptação das células seja a menor possível, o que pode tornar ainda mais vantajoso o uso de meio PMP.

Os dados de fermentação obtidos são relevantes, principalmente considerando os esforços recentes de caracterização e avaliação de leveduras do gênero *Wickerhamomyces* isoladas de diferentes ambientes. Esta levedura tem apresentado resultados interessantes para produção de etanol, o que tem despertado interesse e aumentado os estudos relacionados. Em hidrolisado de resíduo industrial de cana-de-açúcar a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 tolerou altas concentrações de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (Bazoti *et al.*, 2017). Em estudo sequencial e complementar com a mesma levedura, constatou-se que o ajuste de pH em 7,0 favoreceu a conversão dos açúcares a etanol e foi favorável a levedura para consumo de xilose, com consequente aumento do rendimento fermentativo (Bonatto *et al.*, 2020). A levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 apresentou resultados promissores em sistemas baseados em água do mar e efluente de camarão utilizando resíduos de mamão papaia (*Carica papaya*) como substrato (Bonatto *et al.*, 2021). Outras cepas de *Wickerhamomyces* apresentaram elevados rendimentos e características importantes para o desenvolvimento de processos robustos de fermentação alcoólica, como *Wickerhamomyces anomalus* X19 que utilizando substrato de seiva de tamareira apresentou rendimento de etanol de 90% em relação ao máximo teórico (Atitallah, Ben *et al.*, 2020). Neste cenário, fica evidente a colaboração deste estudo para os avanços nas

pesquisas referentes a esta levedura ao utilizar um substrato pouco explorado e um microrganismo com elevado potencial fermentativo que apresentou eficiência fermentativa superior a 95%.

O perfil de produção de glicerol também foi avaliado e observou-se um aumento gradativo no mesmo período em que ocorreu decréscimo dos açúcares e produção de etanol, atingindo $3,10 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ em 9 h. A avaliação da presença de glicerol em sistemas de produção de etanol é relevante por ser o segundo maior subproduto de fermentação alcoólica em processos industriais com *S. cerevisiae* e está diretamente relacionada ao balanço redox da célula, podendo afetar o desempenho da produção de etanol (Gutierrez, 1991; Wang *et al.*, 2020). Dependendo da matéria-prima e do processo, a biossíntese de glicerol pode consumir de 4 a 10% da fonte de carbono biodisponível durante a fermentação, sendo uma questão importante e significativa na indústria de etanol (Wang *et al.*, 2020). Portanto, a produção de glicerol apresentada foi menor que 4% da concentração de açúcares disponíveis, estando menor do que o esperado para o processo.

A concentração residual de açúcares ao final da fermentação foi de 7,26% da inicial, sendo que não houve diferença estatística ($p_{valor} > 0,05$) nas concentrações de açúcares e de etanol após as 9 h de processo, evidenciando que a fermentação alcoólica poderia ser cessada. Sendo assim, em experimento posterior, considerou-se o final da fermentação alcoólica o momento em que a concentração de açúcares totais era igual ou inferior a 7% da concentração inicial.

4.1.1 Fermentação alcoólica do meio PMP com levedura industrial *S. cerevisiae* CAT-1

O processo fermentativo foi conduzido para a levedura *S. cerevisiae* CAT-1, uma cepa industrial com elevada capacidade fermentativa e organismo modelo para produção de etanol. Esta etapa adicional foi realizada objetivando comparar o desempenho da levedura não convencional *Wickerhamomyces* sp. UFFS CE-3.1.2 em relação a uma levedura adaptada a sistemas industriais. Na Tabela 1 são apresentados resultados comparativos aos obtidos para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2.

Tabela 1 – Resultados do processo fermentativo conduzido com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 utilizando suco de melancia como substrato, em comparação com os resultados obtidos para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. * Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística entre si pelo Teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p_{valor} > 0,05$)

Levedura	Concentração inicial de açúcares (g L ⁻¹)	Produção de etanol		
		Tempo de fermentação (h)	Concentração (g L ⁻¹)	Rendimento (g g ⁻¹)
<i>Wickerhamomyces</i> sp. UFFS-CE-3.1.2	76,89 ^a ± 2,32	9	35,06 ^a ± 0,71	0,49 ^a ± 0,05
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	68,44 ^b ± 3,29	9	33,25 ^b ± 0,23	0,54 ^a ± 0,03

Os dados experimentais demonstram que em um mesmo tempo de fermentação e com rendimento pouco menor a levedura não convencional (*Wickerhamomyces* sp. UFFS CE-3.1.2) apresentou um desempenho fermentativo comparável ao obtido para uma cepa industrial. Este fator amplia possibilidades de estudos futuros em co-cultura para as cepas avaliadas e evidencia o potencial industrial da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS CE-3.1.2. Ambas as leveduras apresentaram boa adaptabilidade ao substrato e comportamento fermentativo similar.

4.1.2 Influência da adição de fontes de nitrogênio ao meio PMP

A fim de testar a influência da adição de fontes de nitrogênio na produção de etanol pela levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 no meio PMP, foram realizados experimentos em batelada adicionando extrato de levedura + peptona e ureia, separadamente. Na Figura 4 são apresentados os resultados do processo fermentativo para ambas as condições.

A adição de fontes de nitrogênio não afetou o tempo de fermentação, mantendo-se em 9 h a máxima concentração de ambos os processos. Entretanto, a produção de etanol, rendimento fermentativo e a concentração de biomassa no meio foram afetadas de maneiras diferentes. Dados adicionais a Figura 4 são apresentados na Tabela 2.

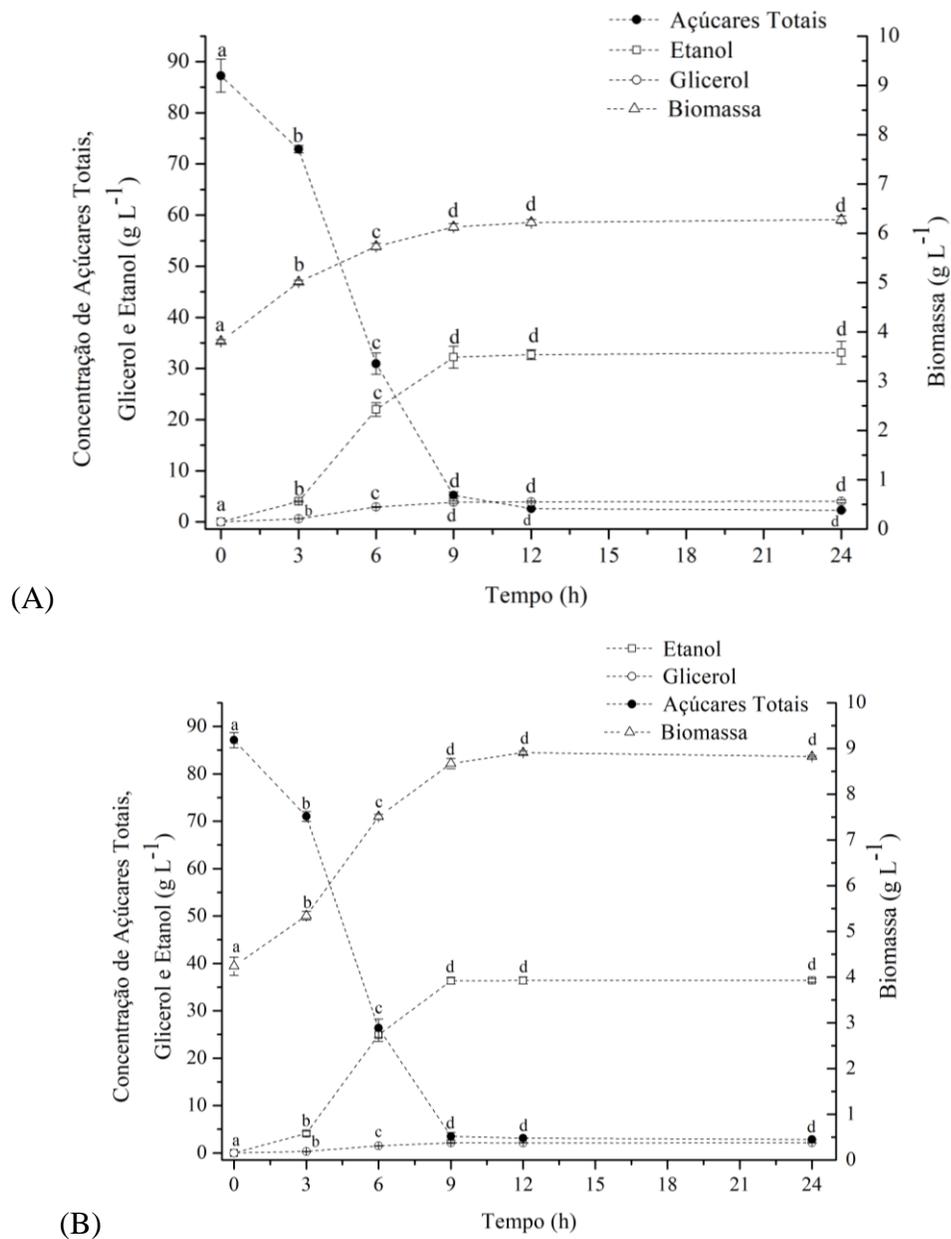


Figura 4 – Processo fermentativo em meio de polpa de melancia suplementado com ureia (0,3%) (A) e extrato de levedura (0,3%) e peptona (0,5%) (B) utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. *Letras minúsculas iguais em mesmo composto não apresentam diferença estatística entre si pelo Teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p_{valor} > 0,05$).

Tabela 2 – Comparação entre os processos sem e com adição de fontes de nitrogênio em meio PMP em 9 h de fermentação alcoólica. * Letras minúsculas iguais em mesma coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% ($p_{\text{valor}} > 0,05$)

Condição	Açúcares (g L ⁻¹)	Etanol (g L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	Eficiência fermentativa (%)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)
PMP	76,89 ^a ± 2,32	35,06 ^a ± 0,71	0,49 ^a ± 0,05	95,17	0,052 ^a ± 0,01
PMP + Ureia (0,3%)	87,26 ^b ± 3,23	32,21 ^b ± 2,14	0,39 ^b ± 0,04	72,38	0,028 ^b ± 0,02
PMP + Extrato de levedura (0,3%) e peptona (0,5%)	87,11 ^b ± 1,60	36,32 ^a ± 0,68	0,43 ^c ± 0,01	81,59	0,053 ^a ± 0,01

O consumo de açúcares foi afetado pela adição de extrato de levedura e peptona, resultando na absorção de 96% da concentração inicial de açúcares, em contrapartida a 93% no processo sem adição de nitrogênio (Figura 3). O aumento da biomassa também foi afetado positivamente na presença de extrato de levedura e peptona, sendo observado aumento de $4,43 \pm 0,22$ g L⁻¹ em 9 h de processo fermentativo, 1,2 vezes maior que o aumento observado para o meio sem adição de nitrogênio (ver $Y_{P/X}$ em Tabela 2). Estes fenômenos podem estar atrelados à assimilação metabólica do extrato de levedura e da peptona, que são fontes com alto teor de aminoácidos, como o glutamato (Yue *et al.*, 2012). A maior absorção de açúcares também pode ser resultante da presença de extrato de levedura. Este resultado corrobora com o observado por Atitallah *et al.* (2020) que evidenciou aumento da absorção de sacarose na presença de extrato de levedura.

Entretanto, mesmo observando a redução da concentração de glicerol no processo com adição de extrato de levedura e peptona, não houve aumento do rendimento fermentativo (Tabela 2). Isso pode ter ocorrido porque o meio fornecido para a levedura foi favorável para aumentar a taxa de crescimento e reduzir a energia para uso direto na biossíntese dos carboidratos. Considerando que a combinação de fontes de carbono e nitrogênio equilibradas possibilita que vias metabólicas mais complexas, e conseqüentemente mais lentas, sejam favorecidas, resultando em aumento de massa celular, e não necessariamente na formação de produtos de metabolismo fermentativo, como etanol (Shuler, Kargi, 2002). Esta hipótese é sustentada pelos dados experimentais de maior consumo de açúcares, aumento da massa celular, redução do teor de glicerol e menor rendimento fermentativo.

Em se tratando da adição de ureia, não foram observadas alterações no consumo de açúcares em comparação com o meio sem adição de nitrogênio. Entretanto, a adição de ureia prejudicou o processo fermentativo, reduzindo a concentração de etanol ($32,21 \pm 2,14 \text{ g L}^{-1}$), atingindo 72,38% do rendimento teórico, aumentando a produção de glicerol e reduzindo a síntese de biomassa (ver $Y_{P/X}$ em Tabela 2). Pressupõe-se que a concentração de ureia possa ter afetado o balanço redox da célula, o que pode ter resultado na desregulação osmótica e consequente aumento da concentração de glicerol (Gutierrez, 1991). O fato de a ureia não ter se apresentado como uma fonte de suplementação adequada para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 corrobora com dados recentemente publicados por Bonatto *et al.* (2021), que mostrou que a suplementação de ureia em um meio fermentativo composto por resíduos de mamão papaia (*Carica papaya*) afetou negativamente a fermentação alcoólica.

Os resultados mencionados demonstram que a utilização de fonte de nitrogênio não é necessária no meio PMP. Pode-se inferir a partir deste fato que concentrações suficientes de aminoácidos livres estão presentes no meio, e representam fator relevante para a economia do processo. Essa constatação corrobora com resultados apresentados por Fish, Bruton e Russo (2009) que constataram a presença de nitrogênio amino livre em suco de melancia, que apesar de apresentar variação a depender do cultivar, foram essenciais para o desempenho do processo fermentativo utilizando a levedura *S. cerevisiae* (Ethanol RedTM). Sendo assim, para experimentos posteriores, o meio PMP foi utilizado como única fonte de nutriente para a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS.CE.3.1.2.

4.2 FERMENTAÇÃO EM BATELADA SEQUENCIAL COM RECICLO DE CÉLULAS

A fermentação em batelada sequencial com reciclo celular foi conduzida durante 30 ciclos. Ao final de cada processo as células de levedura foram separadas do caldo fermentado e reinscridas em novo meio fermentativo. A duração dos ciclos de fermentação variou ao longo dos experimentos e foi cessada quando a concentração de açúcares totais era igual ou inferior a 7% da inicial. Sendo assim: (I) o primeiro ciclo foi finalizado em 9 horas de fermentação; (II) do segundo ao quinto ciclo a fermentação foi cessada em 6 horas; e (III) do sexto ao trigésimo ciclo a fermentação foi conduzida por 3 horas. Os resultados desse processo são apresentados nas Figura 5 e 6 e Tabela 3.

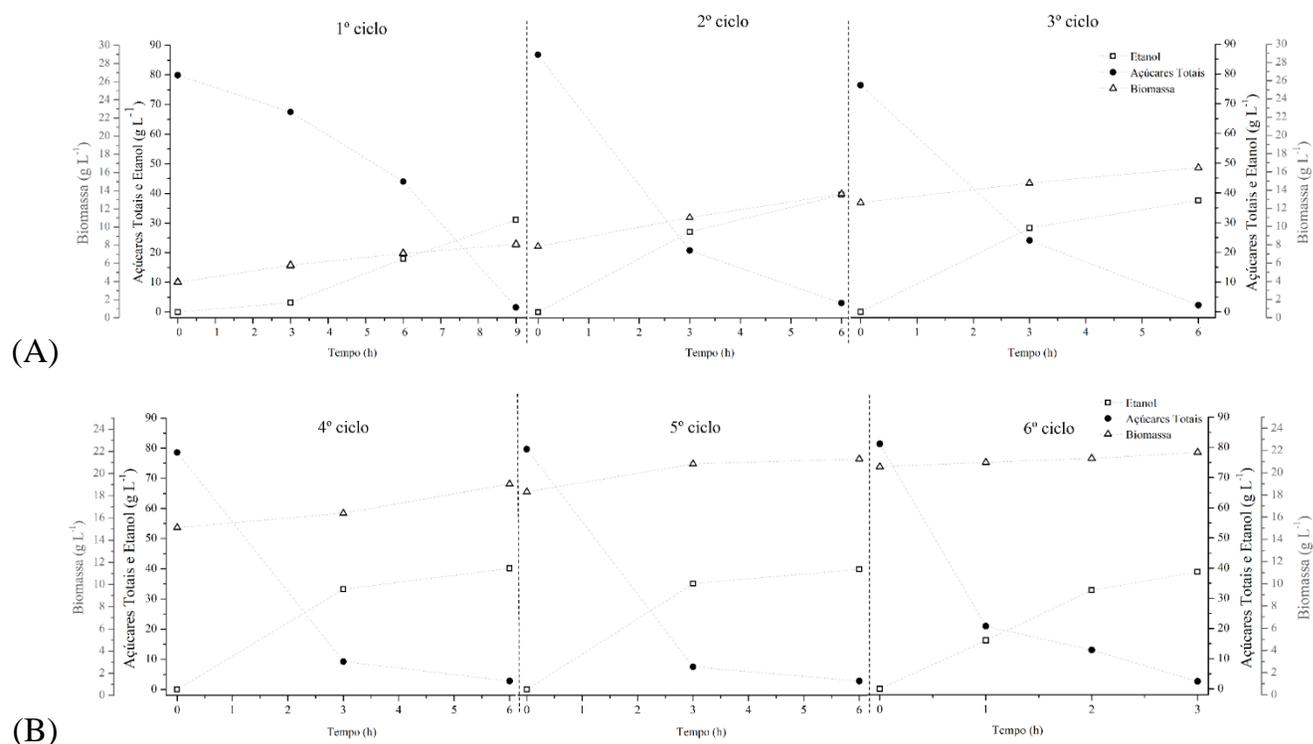


Figura 5 – Dados experimentais de concentração de açúcares totais, etanol e biomassa de seis bateladas com a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 em sistema de reciclo celular. (A) Primeiro (9 h), segundo (6 h) e terceiro (6 h) reciclo; (B) Quarto (6 h), quinto (6 h) e sexto (3 h) reciclo.

*Linhas tracejadas de coloração cinza estão sendo utilizadas para facilitar a visualização dos dados experimentais, não representando necessariamente tendência de comportamento cinético linear entre as amostragens. **Linhas tracejadas de coloração preta entre reciclos indica quando a fermentação foi interrompida e reiniciada.

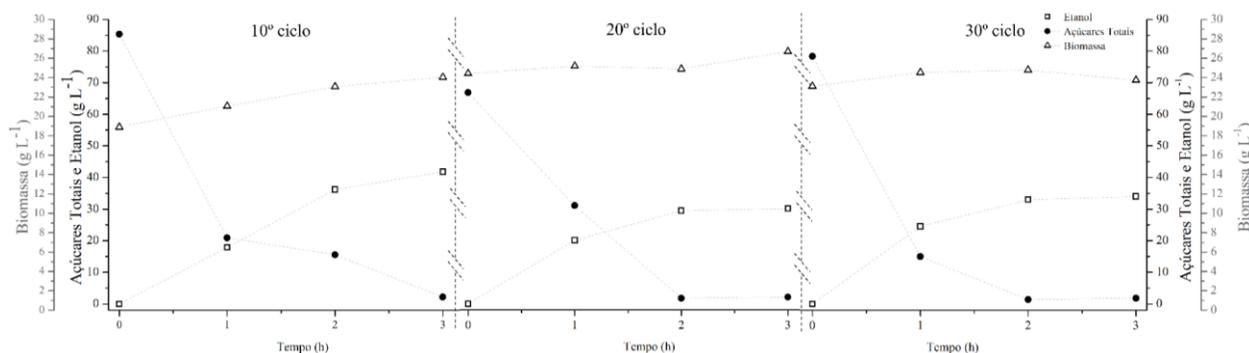


Figura 6 - Dados experimentais de concentração de açúcares totais, etanol e biomassa de três bateladas (10º, 20º e 30º) com a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2.

*Linhas tracejadas de coloração cinza estão sendo utilizadas para facilitar a visualização dos dados experimentais, não representando necessariamente tendência de comportamento cinético linear entre as amostragens. **A descontinuidade das linhas que dividem os gráficos indica visualmente que há espaço temporal/amostral entre os ciclos apresentados.

Tabela 3 – Parâmetros de produção de etanol e diferença de crescimento celular na fermentação em batelada sequencial. *Letras minúsculas iguais em mesma linha não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% ($p_{valor} > 0,05$).

Parâmetros	Ciclos					
	1	2	6	10	20	30
Concentração inicial de açúcares totais (g L^{-1})	$79,88 \pm 1,95$	$86,96 \pm 1,32$	$81,12 \pm 3,88$	$85,39 \pm 0,53$	$67,58 \pm 0,96$	$78,36 \pm 2,42$
Tempo de fermentação (h)	9	6	3	3	3	3
Concentração final de etanol (g L^{-1})	$31,05^a \pm 1,44$	$39,58^b \pm 0,68$	$38,77^b \pm 0,91$	$41,82^b \pm 0,92$	$30,43^a \pm 1,26$	$33,98^c \pm 0,72$
Rendimento fermentativo ($Y_{P/S}$) (g g^{-1})	$0,397^a \pm 0,028$	$0,472^{b,c} \pm 0,006$	$0,494^{b,c} \pm 0,020$	$0,503^b \pm 0,011$	$0,465^{b,c} \pm 0,024$	$0,444^{a,c} \pm 0,016$
Produtividade de etanol ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$3,45^a \pm 0,16$	$6,60^b \pm 0,11$	$12,92^c \pm 0,30$	$13,94^d \pm 0,31$	$10,14^e \pm 0,42$	$11,33^f \pm 0,24$
Eficiência fermentativa (η) (%)	$77,68^a \pm 5,48$	$92,31^{b,c} \pm 1,08$	$96,60^{b,c} \pm 3,82$	$98,37^b \pm 2,14$	$91,00^{b,c} \pm 4,64$	$86,96^{a,c} \pm 3,14$

De acordo com os resultados, o tempo necessário para que ocorresse o consumo de açúcares foi reduzido ao longo dos ciclos. A primeira batelada foi realizada durante 9 h, embasado em dados previamente discutidos neste estudo. Logo no segundo ciclo fermentativo a redução do tempo de fermentação foi evidenciada, sendo que o consumo dos açúcares ocorreu em 6 h de processo. Nessa condição, uma maior produtividade de etanol foi alcançada comparado a primeira batelada (ver Tabela 3). A redução do tempo necessário durante esta etapa do processo pode ser resultante do incremento da concentração de biomassa no meio, que aumentou duas vezes, passando de $3,92 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ no primeiro ciclo, para $7,88 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$ no segundo ciclo.

À medida que as bateladas sequenciais foram conduzidas, uma tendência ao consumo acelerado dos açúcares ocorreu, na qual a amostragem realizada em 3 h (em todos os ciclos) apresenta uma alteração da concentração residual de açúcares no ponto, que pode ser visualizada na sequência gráfica (Figura 5). Conjuntamente a este fato, a propagação celular aumentou intensivamente, atingindo concentração de $21,32 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$ no quinto reciclo celular. O aumento da densidade celular pode ter levado à redução do tempo necessário para o consumo completo dos açúcares para apenas 3 h de fermentação no sexto ciclo, conforme Figura 5 (B).

Outro fenômeno em evidência é a ocorrência de diferentes taxas de absorção de açúcares por uma tendência de consumo mais rápida nas primeiras horas de fermentação. Esta tendência pode ser observada a partir do segundo ciclo, e apresenta maior clareza no sexto ciclo quando as amostragens foram realizadas a cada 1 h (Figura 5). Neste último, a absorção de açúcares na primeira hora do processo fermentativo ocorre rapidamente, e mais lento no segundo momento entre 2 e 3 h de fermentação. A partir desta observação, pressupõe-se que ocorram vias de assimilação preferenciais de algum dos carboidratos que compõem o meio PMP. Destaca-se que o meio é composto majoritariamente por açúcares de fácil assimilação, mas que podem ser absorvidos pela célula em velocidades diferentes. Esta diferença acentuada de absorção dos açúcares no meio PMP pode ser resultante da rápida absorção da glicose, seguida pela taxa mais lenta de absorção para frutose (Berthels *et al.*, 2004).

O catabolismo de carboidratos via glicólise é predominante para obtenção de energia, e a glicose é a fonte de carbono preferida pela maioria dos microrganismos. O consumo preferencial de glicose frente a outros carboidratos, denominado repressão catabólica de carbono, é uma estratégia comum entre leveduras de brotamento e fungos filamentosos (Brown, Ries e Goldman, 2014). Esta hipótese corrobora com extensivos estudos realizados para o organismo modelo *S.*

cerevisiae, que embora apresente consumo concomitante de frutose e glicose, há consumo discrepante para este último açúcar resultante de repressão catabólica, o que geralmente resulta em concentrações residuais maiores de frutose nos meios avaliados (Berthels *et al.*, 2004; Cason, Reid e Gatner, 1987; Semchyshyn *et al.*, 2011). Sendo assim, pressupõe-se que comportamento metabólico similar frente a diferentes fontes de carbono pode ser observado na levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2.

Em seis ciclos de fermentação, o tempo necessário para a absorção dos açúcares foi de 3 h, com rendimentos de etanol superiores a 90% do máximo teórico, alta densidade de células de *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 adaptadas ao meio e elevado percentual de viabilidade. Esta estratégia de fermentação com reciclo celular em meio PMP levou a um rápido aumento da biomassa, que consequentemente melhorou o desempenho geral do processo, aumentando em 4 vezes o rendimento fermentativo. É importante realizar uma comparação deste sistema avaliado com o processo industrial. Isso porque a produção industrial de etanol de primeira geração no Brasil é um processo bem estabelecido, que utiliza melaço rico em sacarose como principal carboidrato, advindo da cana-de-açúcar. Este processo ocorre com alta densidade celular (10-17% v v⁻¹ massa seca) utilizando levedura *S. cerevisiae*, e realiza o reciclo celular, que resulta em um processo robusto, com eficiência superior a 90% e produtividades de 10-15 g L⁻¹ h⁻¹ (Basso *et al.*, 2008; Eliodório *et al.*, 2019; Farias e Maugeri-Filho, 2021). Portanto, a estratégia de fermentação utilizada promoveu uma melhora no desempenho de uma levedura não convencional, e em um primeiro momento, alcançou rendimentos similares aos da produção industrial.

Com o avanço dos ciclos, o processo tendeu à estabilidade. Pode-se notar ainda uma tendência de aumento da densidade celular no décimo ciclo (Figura 6), entretanto menor que os observados nos ciclos anteriores. Com o avanço do processo, os incrementos de densidade celular foram reduzidos, e na décima quinta (15^a) batelada atingiu-se a concentração celular de 26,90 ± 0,75 g L⁻¹. A biomassa seguiu com valores aproximados até o processo ser finalizado na trigésima batelada. E a eficiência em termos de rendimento teórico foi mantida próxima a 90% (Figura 6; Tabela 3). A produção de glicerol foi baixa, mantendo-se com resultados similares ao observado em experimentos prévios para todos os ciclos fermentativos, com concentrações próximas a 3,5 g L⁻¹.

Na Figura 6 também é possível visualizar que no vigésimo e trigésimo ciclo o processo poderia ter sido encerrado em duas horas de fermentação, considerando que houve esgotamento do

teor de carboidratos e não houve diferença estatística entre as concentrações de etanol em 2 e 3 h ($p_{valor} > 0,05$). Este fator foi observado mesmo sem aumento significativo na biomassa. A partir disso, pressupõe-se que além do aumento da densidade celular, poderia ter ocorrido a melhora no desempenho da levedura devido à pressão de seleção aplicada. Este comportamento pode resultar na melhora na produção de enzimas alvo que permitem o consumo eficiente dos açúcares disponíveis, aumento da concentração celular e desempenho expressivo de brotamento celular da levedura no meio fermentativo. Ao acelerar o aumento da biomassa, e estando exposto ao ambiente sucessivas vezes, as células podem apresentar vantagens de crescimento e sobrevivência em relação às células originais nas condições de cultivo do estudo (Agrawal, Mao e Chen, 2011; Çakar *et al.*, 2012). Experimentos foram conduzidos a fim de embasar de maneira preliminar a hipótese elencada.

O aumento da concentração celular ao longo dos ciclos influenciou na velocidade da formação do produto, e o crescimento das células recuperadas em cada ciclo contribuiu para manutenção do sistema ao longo de trinta bateladas. O aumento da biomassa atingiu relativa estabilidade após o décimo ciclo, e a eficiência do processo fermentativo não apresentou diferença estatística significativa (Tabela 3). Ao longo dos trinta ciclos de fermentação não foram observadas elevadas perdas de viabilidade celular, demonstrando que a levedura é relevante para estudos que aprimorem o processo fermentativo, que demonstrou elevado rendimento e alta densidade celular. Este fator é relevante, porque a obtenção de altos rendimentos de etanol em uma longa sucessão de ciclos de fermentação alcoólica rápidos utilizando as células de um ciclo como inóculo do próximo é um fator relevante para a viabilidade da produção industrial do sistema proposto (Laluce *et al.*, 2009). Além disso, os resultados obtidos são importantes para o desenvolvimento de estratégias fermentativas visando aumentar a densidade celular para iniciar o reator, buscando atingir a máxima produtividade e estabelecer o processo em sistema de fermentação com células viáveis e elevada atividade metabólica.

Este estudo ainda propôs uma configuração estratégica fermentativa para aumentar o rendimento do sistema, baseado em bateladas sequenciais e reciclo das células da levedura. Embora existam trabalhos disponíveis sobre a produção de etanol a partir de sistemas de batelada sequencial, são escassos os estudos utilizando como substrato resíduos de frutas, como a melancia, nos quais avalia-se o comportamento de leveduras não convencionais em sistemas de batelada

sequencial. Os resultados demonstram a redução de 6 h de fermentação realizando reciclo celular, sem perda de viabilidade e com altos rendimentos em etanol.

4.3 AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DA LEVEDURA APÓS O RECICLO CELULAR EM FERMENTAÇÃO BATELADA

Após a redução em 6 h do tempo necessário para fermentação alcoólica das bateladas sequenciais, esta etapa experimental foi realizada visando compreender se a redução do tempo foi devido ao aumento da densidade celular. Assim, experimentos adicionais foram realizados no qual as células do trigésimo ciclo foram inoculadas em meio PMP com concentração celular reduzida para 10^6 cél. mL⁻¹.

Os dados experimentais demonstraram que ao reduzir a densidade celular no início do processo fermentativo o tempo necessário para fermentação aumentou para 9 h. O rendimento fermentativo desta etapa ($0,486 \pm 0,046$ g g⁻¹) não apresentou diferença estatística significativa ($p_{valor} > 0,05$) em comparação com o processo com a cultura original (Figura 3). Sendo assim, o aumento da densidade celular teve papel importante na redução do tempo necessário para fermentação durante a batelada sequencial. Esta determinação é relevante considerando que em processos futuros o reator de fermentação poderá ser iniciado com densidade celular maior, visando reduzir o tempo necessário para atingir o máximo rendimento do sistema.

No segundo momento, uma etapa adicional foi realizada na qual células do trigésimo ciclo foram separadas e testadas para diferentes fontes de carbono em meio sintético. Para tanto, oito colônias foram testadas separadamente em diferentes fontes de carbono a fim de avaliar o desempenho da cepa após os 30 ciclos. Os dados obtidos neste experimento estão expressos em percentual de consumo da fonte de carbono na Tabela 4.

As colônias apresentaram diferenças entre si e quando comparadas à cultura estoque, conforme dados apresentados. Em relação à glicose, frutose e sacarose, a diferença de consumo de carbono entre as amostras foi menor, visto serem três fontes de carbono facilmente assimiláveis por microrganismos. Ainda assim, mesmo que todas as colônias isoladas tenham apresentado bom desempenho em glicose, as colônias 6, 7 e 8 consumiram 100% da concentração inicial.

Tabela 4 – Consumo da fonte de carbono avaliado em meio sintético, utilizando cepas isoladas do conjunto de biomassa do último ciclo em batelada sequencial. *Letras minúsculas iguais em mesma coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey com 95% ($p_{valor} > 0,05$).

Microrganismo	Consumo da fonte de carbono (%)				
	Glicose	Frutose	Sacarose	Xilose	Glicerol
Cultura estoque	99,49 ^a ± 0,23	99,51 ^a ± 0,15	95,53 ^a ± 0,83	0	21,77 ^a ± 4,00
Isolado 1	99,64 ^{a,b} ± 0,04	99,42 ^a ± 0,01	98,17 ^a ± 0,17	0	21,82 ^a ± 3,96
Isolado 2	99,66 ^{a,b} ± 0,07	99,39 ^a ± 0,04	97,73 ^a ± 0,19	0	12,51 ^b ± 2,29
Isolado 3	99,67 ^{a,b} ± 0,02	99,52 ^a ± 0,03	94,77 ^a ± 3,25	0	0
Isolado 4	99,70 ^{a,b} ± 0,05	99,08 ^a ± 0,54	96,85 ^a ± 0,72	0	7,18 ^{c,d} ± 1,83
Isolado 5	99,76 ^b ± 0,01	99,51 ^a ± 0,02	96,93 ^a ± 0,15	0	0
Isolado 6	100 ^c	99,46 ^a ± 0,01	99,27 ^b ± 0,18	14,16 ^a ± 3,05	3,12 ^e ± 0,99
Isolado 7	100 ^c	99,53 ^a ± 0,02	98,43 ^a ± 0,32	10,75 ^a ± 4,00	6,77 ^d ± 2,51
Isolado 8	100 ^c	99,55 ^a ± 0,04	99,57 ^b ± 0,09	0	11,63 ^{b,c} ± 3,76

A capacidade de consumir xilose apresentada pelas colônias isoladas 6 e 7 destacam-se nos dados experimentais. Principalmente considerando que nenhuma outra ou mesmo a cultura estoque, demonstrou tal capacidade. Em termos de glicerol como fonte de carbono outro cenário é observado, no qual a cultura estoque apresentou melhor desempenho comparado à maioria das cepas isoladas. Nenhuma produção de etanol foi observada para glicerol e xilose.

Esta abordagem foi considerada para analisar possíveis alterações de consumo de açúcares, devido ao intenso aumento da densidade celular durante as bateladas sequenciais e a exigência de replicação rápida de informações bioquímicas, que poderia ser respondido com falhas na resposta fisiológica celular (Çakar *et al.*, 2012). De maneira preliminar, pode ser observado que as colônias apresentaram diferença estatística para algumas fontes de carbono, como os isolados 6 e 7 frente à xilose. Portanto, sugere-se estudos futuros para avaliar se houve possíveis alterações benéficas para a produção de biocombustíveis de segunda geração, além de explorações mais específicas das colônias 6 e 7.

5 CONCLUSÕES

O resultado do processo de fermentação alcoólica utilizando como substrato polpa de resíduo de melancia e como microrganismo a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 (recentemente isolada de madeira em decomposição) mostrou-se promissor como uma via alternativa ao descarte do resíduo e como um estudo de avaliação de uma levedura que tem demonstrado elevado potencial fermentativo.

Em cinética de 24 h de fermentação observou-se rendimento máximo teórico de 95% em 9 h de processo. Em experimento posterior constatou-se não haver necessidade de suplementação com fontes de nitrogênio, o que demonstra ser vantajoso economicamente para utilização de resíduos de melancia como substrato para fermentação alcoólica. Este estudo ainda propôs uma configuração estratégica fermentativa para aumentar o rendimento do sistema, baseado em bateladas sequenciais e reciclo das células da levedura. Verificou-se que o tempo necessário para fermentação reduziu em 6 h, e esteve fortemente atrelado ao aumento da densidade celular no sistema. Sendo assim, o reciclo das células beneficiou o processo, principalmente pela redução do tempo de fermentação, melhorando em quatro vezes o rendimento fermentativo, e, principalmente, o sistema manteve-se relativamente estável durante trinta bateladas com rendimento teórico máximo acima de 90%. Além disso, as células após as bateladas sequenciais foram separadas em colônias e avaliadas para diferentes fontes de carbono. Foram observadas diferença estatística e dois isolados demonstraram potencial para consumo de pentose.

Destaca-se ainda que são escassos estudos utilizando leveduras *Wickerhamomyces* em estratégia fermentativa de batelada sequencial com reciclo celular, e utilizando resíduo de melancia como substrato. Como perspectivas futuras, acredita-se que planejamentos experimentais possam ser desenvolvidos a fim de otimizar os parâmetros fermentativos e as configurações do processo. Em um segundo cenário, destaca-se a relevância da exploração dos isolados resultantes das bateladas sequenciais com potencial para fermentação de pentoses.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, M.; MAO, Z.; CHEN, R. R. Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 4, p. 777–785, abr. 2011.
- ATITALLAH, I. BEN *et al.* Evaluation of the non-conventional yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) X19 for enhanced bioethanol production using date palm sap as renewable feedstock. **Renewable Energy**, v. 154, p. 71–81, jul. 2020.
- BASSO, L. C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008.
- BAZOTI, S. F. *et al.* Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582–587, nov. 2017.
- BERTHELIS, N. J. *et al.* Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 683–689, maio 2004.
- BONATTO, C. *et al.* Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2445–2450, jan. 2020.
- _____. Utilization of seawater and wastewater from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124501, fev. 2021.
- BROWN, N. A.; RIES, L. N. A.; GOLDMAN, G. H. How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 48–63, nov. 2014.
- ÇAKAR, Z. P. *et al.* Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 171–182, mar. 2012.
- CASON, D. T.; REID, G. C.; GATNER, E. M. S. On the differing rates of fructose and glucose utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 93, n. 1, p. 23–25, 2 jan. 1987.
- ELIODÓRIO, K. P. *et al.* Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. In: GADD, G. M.; SARIASLANI, S. (Eds.). **Advances in Applied Microbiology**. 109. ed. Elsevier, 2019. p. 61–119.
- EVCAN, E.; TARI, C. Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product. **Energy**, v. 88, p. 775–782, ago. 2015.
- FAOSTAT. **Crop statistics**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>.
- FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. **Fuel**, v. 288, p. 119673, mar. 2021.
- FISH, W. W.; BRUTON, B. D.; RUSSO, V. M. Watermelon juice: a promising feedstock supplement, diluent, and nitrogen supplement for ethanol biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 18, 2009.
- GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação

alcoólica. **ESALQ**, v. 48, p. 55–69, 1991.

HEGDE, S.; LODGE, J. S.; TRABOLD, T. A. Characteristics of food processing wastes and their use in sustainable alcohol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, p. 510–523, jan. 2018.

KARTHIKEYAN, O. P. *et al.* Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1025–1039, fev. 2018.

LALUCE, C. *et al.* Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 4, p. 627–637, 1 jun. 2009.

MAGASANIK, B. Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 827–829, out. 2003.

NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. **Renewable Energy**, v. 147, p. 1694–1703, mar. 2020.

ONU - UNITED NATIONS ORGANIZATION. **International Year of Fruits and Vegetables**, 2021. Disponível em: <<https://undocs.org/A/RES/74/244>>

PODPORA, B. *et al.* Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. No. 6, p. 554–563, 21 dez. 2016.

PRAMANIK, S. K. *et al.* The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. **Bioresource Technology Reports**, v. 8, p. 100310, dez. 2019.

RAPOSO, S. *et al.* Nitrogen sources screening for ethanol production using carob industrial wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 827–843, 2017.

SEMCHYSHYN, H. M. *et al.* Fructose and glucose differentially affect aging and carbonyl/oxidative stress parameters in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 7, p. 933–938, maio 2011.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 2002. p. 133–154.

SOUZA, J. *et al.* Improvement of Brazilian bioethanol production – Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 583–591, jun. 2018.

WANG, S. *et al.* Cellulase-added cassava ethanol process boosts ethanol titer and reduces glycerol production. **Industrial Crops and Products**, v. 148, p. 112304, jun. 2020.

YAMAKAWA, C. K. *et al.* Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123374, ago. 2020.

YUE, G. *et al.* The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 48–52, abr. 2012.

ZABED, H. *et al.* Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

ANEXO A- PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO (2019-2021) VINCULADAS AO TEMA DA DISSERTAÇÃO

SCAPINI, T. *et al.* Bioethanol from fruit residue. *In: TREICHEL, H.; ALVES JR., S.L.; FONGARO, G.; MULLER, C. (Org.). Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives.* 1. ed. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 2019, v. 1, p. 139-176.

[Link para acesso](#)

SCAPINI, T. *et al.* Valuation of residue from processing of grape juice for 2G ethanol production. *In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática e Biomassas, 2019, Uberlândia. Anais XXII SINAFERM e XIII SHEB, 2019.*

[Link para acesso](#)

SCAPINI, T. *et al.* Bioethanol production by native yeast using fruit residue. *In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática e Biomassas, 2019, Uberlândia. Anais XXII SINAFERM e XIII SHEB, 2019.*

[Link para acesso](#)

BONATTO, C.; SCAPINI, T.; BAZOTI, S.F.; ALVES JR., S.L.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production of ethanol from orange residues in a system with high salt concentration. *In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2019, Uberlândia. Anais XXII SINAFERM e XIII SHEB, 2019.*

[Link para acesso](#)

FAVARETTO, D.P.C.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A.F.; COLLA, L.M.; BRIAO, V.; TREICHEL, H. Pretreatments in orange waste for bioethanol production. *In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática e Biomassas, 2019, Uberlândia. Anais XXII SINAFERM e XIII SHEB, 2019.*

[Link para acesso](#)

TREICHEL, H.; FONGARO, G.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A.F.; STEFANSKI, F.S.; VENTURIN, B. **Utilising Biomass in Biotechnology: A Circular Approach** discussing the Pretreatment of Biomass, its Applications and Economic Considerations. 1. ed. Springer International Publishing, 2020. v. 1. 93p.

[Link para acesso](#)

BONATTO, C.; SCAPINI, T.; ZANIVAN, J.; DALASTRA, C.; BAZOTI, S.F.; ALVES JR., S.L.; FONGARO, G.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. **Utilization of seawater and wastewater from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol.** *Bioresource Technology*, v. 321, p. 124501, 2020.

[Link para acesso](#)

ZANIVAN, J.; **SCAPINI, T.**; BONATTO, C.; DALASTRA, C.; TREICHEL, H. Utilização de mistura de resíduos de frutas provenientes do consumo doméstico como substrato para a produção de bioetanol. *In: X Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica, 2020, Chapecó. Anais da Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica da UFFS, 2020. v. 10.*

[Link para acesso](#)

BONATTO, C.; ZANIVAN, J.; DALASTRA, C.; **SCAPINI, T.**; CAMARGO, A.F.; STEFANSKI, F.S.; BAZOTI, S.F.; FONGARO, G.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Reducing the water footprint in ethanol production using wastewater from shrimp production. *In: I Congresso Internacional de Ambiente e Desenvolvimento, 2020, Lajeado. Anais do I Congresso Internacional de Ambiente e Desenvolvimento. Lajeado: Editora Univates, 2020. v. 1. p. 128.*

[Link para acesso](#)

SCAPINI, T. *et al.* Produção de etanol de segunda geração utilizando resíduos de melancia como substrato. *In: VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020, Erechim. Anais do VII Simpósio em Ciência e Tecnologia Ambiental e III Encontro Multidisciplinar em Ciências Ambientais da Fronteira Sul, 2020. v. 6. p. 80.*

[Link para acesso](#)