

**INFRAESTRUTURA DE INVESTIGAÇÃO PARA A BIOMASSA E A BIOENERGIA
BBRI - BIOMASS AND BIOENERGY RESEARCH INFRASTRUCTURE****Reis A.*, Abreu M.*, Pacheco M.*, Bernardo J.**, Silva R.***, Domingues L.***, Teixeira J.A.***, Gírio F.***

* Unidade de Bioenergia e Biorrefinarias, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa, Portugal, francisco.girio@lneg.pt

** Associação BIOREF – Laboratório Colaborativo para as Biorrefinarias, Rua da Amieira, Apartado 1089, 4466-901 São Mamede de Infesta, Matosinhos, joana-bernardo@bioref-colab.pt

*** Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal, jateixeira@deb.uminho.pt

<https://doi.org/10.34637/cies2020.1.4086>

RESUMO

A BBRI é a única Infraestrutura Nacional de Investigação em Biomassa e Bioenergia, que integra o Roteiro Nacional de Infraestruturas de Investigação de Interesse Estratégico em Portugal desde 2014, sendo distribuída por dois nós. O nó de Lisboa tem por base as infraestruturas laboratoriais e piloto existentes na Unidade de Bioenergia e Biorrefinarias (UBB) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) e o nó de Braga, as infraestruturas laboratoriais e tecnológicas do Centro de Engenharia Biológica (CEB) da Universidade do Minho (UM). As atividades científicas da BBRI estão focadas nas tecnologias de conversão de biomassa para obtenção de biocombustíveis avançados, produtos não-energéticos de base biológica e outros biomateriais, inseridas em seis sub-plataformas de investigação (sub-RIs). O trabalho da BBRI nestas 6 sub-RIs encontra-se complementarmente organizado em atividades de formação, serviços e atividades de disseminação, visando a capacitação de novos profissionais em bioenergia sustentável e contribuindo para a excelência da investigação em Portugal no domínio da Bioenergia e Bioeconomia.

PALAVRAS-CHAVE: Biomassa, Bioenergia, Biorrefinaria, Bioeconomia, Biocombustíveis, Infraestruturas

ABSTRACT

BBRI is the only National Infrastructure for Research in Biomass and Bioenergy, which is part of the National Roadmap of Research Infrastructures of Strategic Interest in Portugal since 2014, being distributed by two nodes. The Lisbon node is based on the laboratory and pilot infrastructures existing in the Bioenergy and Biorrefineries Unit of National Laboratory of Energy and Geology and the Braga node the laboratory and technological infrastructures of the Center of Biological Engineering of the University of Minho (UM). BBRI's scientific activities are focused on biomass conversion technologies to obtain advanced biofuels, bio-based non-energy products and other biomaterials, inserted in six research sub-platforms (sub-IRs). BBRI's work in these 6 sub-IRs is complementarily organized in training activities, services and dissemination activities, aiming at the training of new professionals in sustainable bioenergy and contributing to the excellence of research in Portugal in the fields of Bioenergy and Bioeconomy.

KEYWORDS: Biomass, Bioenergy, Biorrefinery, Bioeconomy, Biofuels, Infrastructures

INTRODUÇÃO

O combate às alterações climáticas requer uma abordagem integrada envolvendo, quer todos os setores económicos geradores de bens e serviços quer os cidadãos e seus comportamentos sociais. A bioenergia, a bioeconomia e no geral, a aplicação dos conceitos da economia circular aos recursos utilizados na sua transformação em bens e produtos, a par da eficiência energética, são fundamentais para o sucesso das políticas de descarbonização e das metas nacionais para 2030 (PNEC) e 2050 (RNC). A utilização de biomassa como a maior fonte renovável do Planeta, para a produção de biocombustíveis limpos, combustíveis alternativos, compostos químicos renováveis e biomateriais surge como parte da solução, porém só agora começa a ser considerada em termos de políticas públicas.

É neste contexto que foi criada a BBRI como a única Infraestrutura Nacional de Investigação em Biomassa e Bioenergia, que integra o Roteiro Nacional de Infraestruturas de Investigação de Interesse Estratégico desde 2014. A BBRI é uma infraestrutura distribuída por dois nós - Lisboa e Braga. O nó de Lisboa tem por base as infraestruturas laboratoriais e piloto existentes na Unidade de Bioenergia e Biorrefinarias (UBB) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) e o nó de Braga, as infraestruturas laboratoriais e tecnológicas do Centro de Engenharia Biológica (CEB) da Universidade do Minho (UM).

As atividades científicas da BBRI estão focadas nas tecnologias de conversão de biomassa para obtenção de biocombustíveis avançados, produtos não-energéticos de base biológica e outros biomateriais, inseridas nas seguintes sub-plataformas de investigação (sub-RIs): Açúcares (conversão bioquímica da biomassa); Microalgas; Termoquímica (conversão química e termoquímica da biomassa); Ciências Analíticas para Biocombustíveis; Sustentabilidade em Bioenergia e Biotecnologia molecular para Combustíveis Avançados (Fig. 1.).

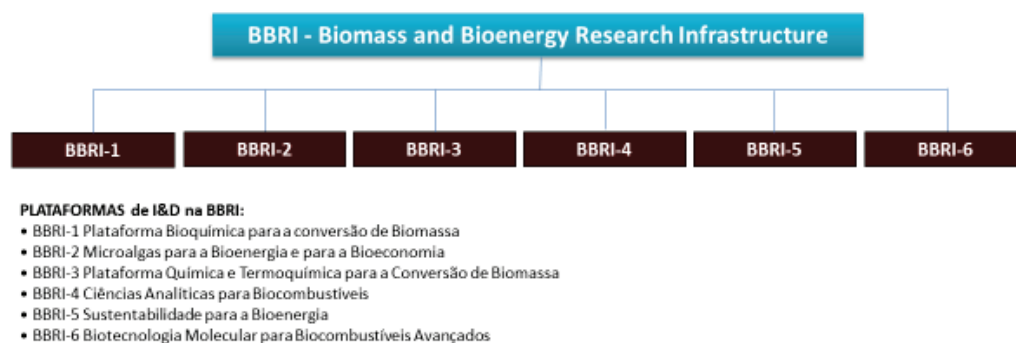


Fig. 1. Plataformas de I&D da BBRI.

O trabalho da BBRI nestas 6 sub-RIs encontra-se complementarmente organizado em atividades de formação, serviços e atividades de disseminação, visando a capacitação de novos profissionais em bioenergia sustentável e contribuindo para a excelência da investigação em Portugal no domínio da Bioenergia e Bioeconomia, estando perfeitamente alinhada com as principais cadeias de valor do Plano de Implementação da Ação #8-Bioenergia e Combustíveis renováveis para o Transporte Sustentável, do SET-Plan Europeu e com a nova estratégia europeia em Bioeconomia.

DESCRIÇÃO DA INFRAESTRUTURA

BBRI 1. Plataforma dos açúcares (conversão bioquímica)

A BBRI desenvolve tecnologias para a conversão bioquímica da biomassa de origem lenhocelulósica em biocombustíveis avançados, incluindo biocombustíveis rodoviários e de aviação do tipo *drop-in* (LNEG) e desenvolve bioreatores inovadores para a integração de processos (UM), bem como ferramentas computacionais para a engenharia metabólica e gestão de dados experimentais. Aproveitando a estrutura de I&D existente no LNEG e UM, a Plataforma dos açúcares distribui-se pelos seguintes Laboratórios/Instalações: Desconstrução da Biomassa (LNEG), Fábricas Celulares e Enzimas (LNEG), Laboratório de Fermentação (UM), Laboratório de Biotecnologia Molecular (UM), Laboratório de Sistemas Biológicos/Bioinformática (UM) e Piloto e *Downstream* (LNEG).

Como objetivos específicos enumeram-se os seguintes: - Desenvolvimento de tecnologias inovadoras e disruptivas para a desconstrução total da biomassa lenhocelulósica de forma eficiente em termos de custo e energia; - Construção de fábricas celulares avançadas e robustas.

BBRI 2. Plataforma de microalgas

A BBRI 2 tem como prioridade o desenvolvimento de I&D aplicados em microalgas para a biocaptação de CO₂, para a colheita de biomassa microalgal e para a produção avançada de biocombustíveis e produtos de base biológica,

aproveitando as instalações existentes do Laboratório de Microalgas (LNEG), Piloto e *Downstream* (LNEG) e Laboratório de Fermentação (UM).

Como objetivos específicos enumeram-se: - Seleção e caracterização de fontes de gases de combustão industrial e de resíduos e efluentes adequados para o cultivo de microalgas para posterior depuração; - Projeto para tratamento eficiente de efluentes vários utilizando microalgas, com simultânea produção de biocombustíveis e bioprodutos; - Desenvolvimento e seleção de métodos eficientes de colheita de biomassa microalgal de baixo custo e baixo consumo energético; - Desenvolvimento de tecnologias disruptivas para extração eficiente de bioprodutos a partir de biomassa microalgal; - Implementação de projetos de biorefinarias baseados em microalgas para bioprodutos e biocombustíveis, incluindo conversões bioquímicas e/ou termoquímicas, com geração mínima de resíduos e amigos do ambiente, bem como a seleção das melhores condições operacionais; - Aquisição de dados para estudos de análise de Ciclo de Vida (*Life-Cycle Assessment- LCA*).

BBRI 3. Plataforma Termoquímica

A BBRI 3 tem como prioridade o desenvolvimento de I & D aplicados sobre a recuperação de energia de diferentes tipos de resíduos de forma a produzir biocombustíveis avançados utilizando tecnologias de conversão termoquímica. Esta plataforma abriga o Laboratório de Gasificação e de Pirólise no nó LNEG.

Os objetivos específicos são: - Seleção das melhores condições para o funcionamento de uma instalação de pirólise de leito fluidizado à escala piloto para processar biomassa e resíduos para a produção de biocombustíveis líquidos e/ou produtos de base biológica; - Seleção das melhores condições para a operação da instalação pressurizada para tratamento hidrotérmico de biomassa húmida e verde para a produção de biocombustíveis líquidos e/ou bioprodutos.

BBRI 4. Ciências Analíticas para Biocombustíveis

A prioridade é o fornecimento de suporte analítico para as cadeias de valor baseadas em biomassa quer através de conversões bioquímicas quer as termoquímicas estudadas nas plataformas BBRI 1, BBRI 2 e BBRI 3. O Laboratório de Biocombustíveis e Biomassa (LBB) da UBB, integrado na rede de laboratórios acreditados do LNEG é atualmente acreditado para combustíveis líquidos e sólidos. Nas instalações no LNEG prestam-se serviços para empresas e outras instituições do setor nomeadamente as pertencentes ao Sistema Científico e Tecnológico Nacional (SCTN) e para suporte analítico de atividades de I&D.

A lista de objetivos específicos inclui: - Prestação de serviços acreditados na análise de biomassa e biocombustíveis; desenvolvimento e apoio de atividades de I&D na análise de biomassa, materiais, biocombustíveis; formação em metodologias analíticas para biomassa, biocombustíveis, biomateriais e bioprodutos.

BBRI 5. Sustentabilidade da Bioenergia

A prioridade da BBRI 5 é o desenvolvimento de modelos abrangentes de ciclo de vida para diferentes cadeias de valor baseadas na biomassa, desenvolvendo, otimizando e avaliando diferentes biorefinarias, quer de base bioenergética quer de base de bioprodutos. A avaliação do desempenho ambiental, energético e económico das cadeias de valor de biocombustíveis e bioprodutos estudadas nas Plataformas BBRI 1, BBRI 2 e BBRI 3 também merece destaque.

Como objetivos específicos surgem: - Atividades de I&D na avaliação da sustentabilidade dos processos em biorrefinarias, incluindo o cálculo das emissões de gases de efeito estufa (GEE) na totalidade das cadeias de valor (de acordo com a metodologia RED-II) e a avaliação das alterações no uso do solo (para a sustentabilidade dos biocombustíveis). Para biomassa sólida e produtos de base biológica, a avaliação da sustentabilidade é baseada nas metodologias da JRC, conforme indicado no relatório COM(2010)11 da Comissão e no SWD(2014)259: Realização de estudos de avaliação tecno-económica, incluindo análise de engenharia de valor para custos de capital e operacionais (*Capital Expenditure - CAPEX* e *Operational Expenditure - OPEX*, respetivamente) de diferentes biorrefinarias.

BBRI 6. Biotecnologia Molecular para Biocombustíveis Avançados

A plataforma BBRI 6 tem como prioridade a aplicação de ferramentas avançadas de biotecnologia molecular, engenharia metabólica e fisiológica, biologia sintética e bioinformática para o desenvolvimento de estirpes industriais robustas que atuem como fábricas celulares de bioenergia (*e.g.*, bioetanol, combustíveis avançados *drop-in* para aviação) e/ou produtos de base biológica de elevado valor (*e.g.*, vitaminas e fragrâncias) bem como a integração desde o início deste trabalho molecular com a intensificação dos bioprocessos. A plataforma desenvolve a sua atividade nas instalações do CEB (UM), nomeadamente no Laboratório de Biotecnologia Molecular (<https://www.ceb.uminho.pt/bfactory/Research/Lab?lab=5>).

Como objetivos específicos da sua atividade de I&D enumeram-se: - Desenvolvimento de estirpes industriais de *Saccharomyces cerevisiae* como plataformas para a produção de energia e produtos de base biológica a partir de biomassa; - Exploração e otimização de microrganismos não-convencionais como forma de complementar o papel

dos modelos industriais na produção dos compostos acima mencionados (*e.g.*, fungo filamentoso *Ashbya gossypii*); - Intensificação de estratégias de pré-tratamento de biomassa e hidrólise enzimática seguindo uma abordagem integrada dentro do conceito de biorrefinaria.

A Fig. 2 apresenta equipamento adquirido pela BBRI instalado nos seus dois nós.

ATIVIDADES DA INFRAESTRUTURA

Pré-tratamentos flexíveis para desconstrução de biomassa (plataforma BBRI 1)

As atividades da plataforma BBRI 1 foram dirigidas para a valorização em cascada de biomassa lenhocelulósica e/ou de microalgas. Entre os métodos de pré-tratamento testados incluem-se a hidrólise diluída, métodos hidrotérmicos, líquidos iónicos, CO₂ de alta pressão, polióis ou ácidos sólidos (Toscan et al. 2017). Os métodos propostos pretendem aumentar o valor potencial de cada corrente no bioprocesso e redução da carga enzimática na subsequente etapa de sacarificação das frações sólidas muito ricas em celulose para posterior conversão em bioetanol, entre outros. Adicionalmente foram testados processos semelhantes ao *organosolv* (Michelin et al. 2018) com álcoois de cadeia curta ou imidazole para produzir frações pré-tratadas adequadas, incluindo polissacáridos e lenhina para estudos posteriores.

Processos químicos para biocombustíveis e bioprodutos (BBRI 1)

As atividades desenvolvidas levaram à produção de diversos bioprodutos, os quais a médio ou longo prazo podem ser considerados como potenciais biocombustíveis ou produtos de alto valor acrescentado. Neste contexto, várias abordagens com líquidos iónicos ou sistemas CO₂/H₂O de alta pressão foram utilizadas com vista à produção de furfural num único passo (Costa Lopes et al. 2018). Outra via estudada foi a produção de oligossacáridos como bioprodutos de valor acrescentado bem como a sua purificação e separação utilizando diferentes tecnologias de membranas. Os estudos com frações de lenhina (Moniz et al. 2018) também mereceram destaque, com especial relevância da obtenção de uma mistura de monofenólicos com grande potencial como bioprodutos. Entre os produtos químicos derivados da lenhina mais frequentemente encontrados estava o seringaldeído. Os extratos ainda permitiram encontrar outros produtos químicos de valor acrescentado, nomeadamente a tricina, com grande potencial de valorização.

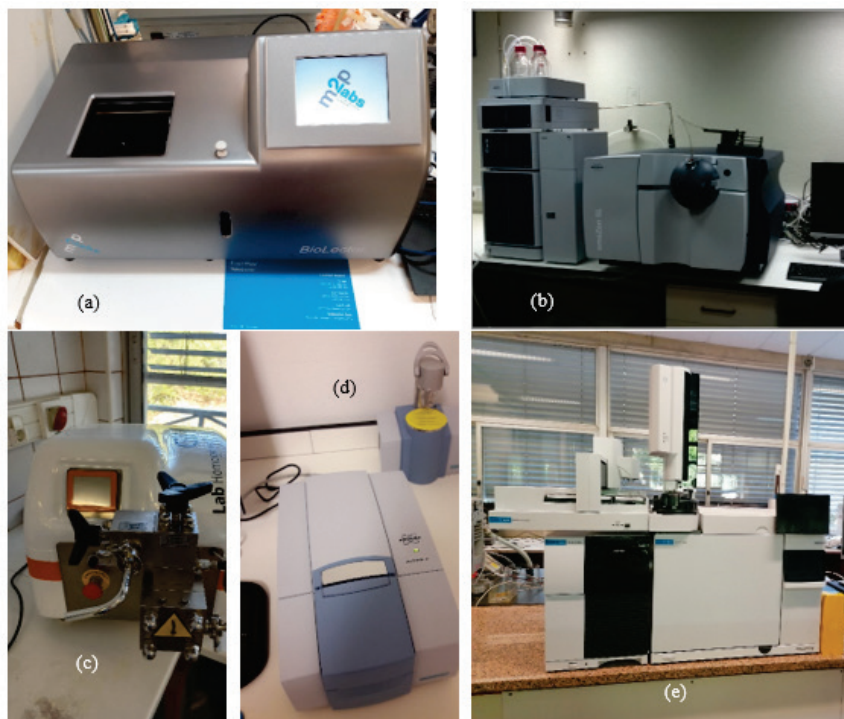


Fig. 2. (a) Biolector. (b) Cromatógrafo líquido de alta eficiência com espectrómetro de massa (HPLC-MS). (c) Homogeneizador de contacto para rotura celular. (d) FTIR. (e) Cromatógrafo gasoso com espectrómetro de massa (GC-MS).

Construção de Plataformas Microbianas para Bioprocessamento Consolidado (BBRI 1)

No âmbito das plataformas baseadas em *Clostridium* para fermentação escura e produção de biocombustíveis e bioprodutos de valor acrescentado, vários bioresíduos e subprodutos orgânicos foram comparados em fermentações descontínuas à escala de bancada com controle de pH para produção de H₂ e ácido butírico (Moura *et al.* 2017). Os resíduos da indústria alimentar foram utilizados como substrato modelo para a produção não estéril de H₂ e uma célula de combustível foi integrada no processo de produção de eletricidade (Ortigueira *et al.* 2019). Todas as correntes de fermentação recuperáveis foram dirigidas para estudos de ampliação de escala e avaliação do impacto do aquecimento global. Foram desenvolvidos também estudos de fermentação de *syngas*, que incluíram seleção de microrganismos acetogénicos para a síntese de ácidos orgânicos C₂ e C₄. Os perfis de fermentação de CO, CO₂ e H₂ foram caracterizados para adaptar a composição de *syngas* mais adequada passível de ser utilizada como substrato microbiano. Finalmente foram obtidas as melhores soluções de integração de plataformas de conversão biológica e termoquímicas a fim de produzir ácido butírico para posterior esterificação enzimática com 1-butanol para se obter butirato de butilo.

Processos integrados de bioconversão (BBRI 1)

Pela aplicação do princípio de biorrefinaria, intensificaram-se os processos de bioconversão pela seleção da melhor estratégia para integrar etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação microbiana, juntamente com *downstream processing* para conversão de resíduos lenhocelulósicos em biocombustíveis e/ou bioprodutos (Marques *et al.* 2017). O LNEG e a UM têm vindo a desenvolver tecnologias inovadoras e ambientalmente amigas para o pré-tratamento, bem como para estimular as etapas subsequentes de bioconversão, em especial a conversão de hemicelulose. No sentido de otimizar processos de sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) desenvolveu-se trabalho nas seguintes áreas: 1) construção de novas estirpes industriais robustas de *Saccharomyces cerevisiae* para co-fermentação de açúcares C₅-C₆; 2) produção *in situ* de novas hemicelulases eficientes e de baixo custo. Aplicando essa estratégia, foi implementada a produção de etanol de segunda geração (2G), com a produção de 23 kg de etanol/100 kg de substratos de madeira com 86% de rendimento. Foi também utilizada a técnica avançada da citometria de fluxo para avaliar o desempenho das leveduras quando desenvolvidas em hidrolisados de lenhocelulósicos, através da monitorização da viabilidade celular. Esta informação, obtida em tempo real, facilita a otimização e o aumento de escala do processo (LNEG).

Biorrefinarias avançadas à base de microalgas para biocombustíveis e bioprodutos (BBRI 2)

Através do trabalho desenvolvido no LNEG a microalga *Scenedesmus* removeu com sucesso o CO₂ de gases de combustão industrial e nutrientes de diferentes águas residuais (explorações de avicultura, suinocultura e bovinocultura, indústria cervejeira, de laticínios e esgotos urbanos) com rendimentos de remoção de 95 a 100% para o azoto, 63-99% para o fósforo e 48-70% para carência química de oxigénio (CQO) (Marchão *et al.* 2018; Ferreira *et al.* 2018, 2019). A produtividade da biomassa utilizando águas residuais foi maior (exceto para o efluente de avicultura) do que no meio sintético (Bristol), sendo o maior valor obtido em efluentes da indústria cervejeira. Também aqui se utilizou a citometria de fluxo para monitorizar o estado fisiológico da microalga *Scenedesmus* quando cultivada em efluente da indústria cervejeira (Marchão *et al.* 2018). O trabalho desenvolvido no nó da Universidade do Minho (Geada *et al.* 2018) permitiu delinear estratégias para o processo de produção de microcistina pela cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (sistemas e modo de cultivo, culturas mistas, condições ambientais, colheita, rotura celular e extração da microcistina e otimização de metodologias de purificação) especialmente no que se refere à redução de custos de operação (OPEX).

Conversão termoquímica de biomassa e resíduos para produção de biocombustíveis e outros produtos de base biológica (BBRI 3)

Resíduos ricos em biomassa e lenhina foram valorizados por gasificação para produzir *syngas*, o qual por sua vez foi limpo, tratado e dirigido para *upgrading* por termocatálise para melhorar a sua qualidade e rendimento (Pinto *et al.* 2017). A redução de contaminantes tais como tar, H₂S e NH₃ foi levada a cabo utilizando reatores de leito fixo em dois andares, e calcário de baixo custo e catalisador à base de níquel. Deram-se reações de *cracking*, *reforming* e *water gas shift*. O *syngas* após *upgrading* apresentava maior percentagem em H₂ e CO₂ e menores teores em hidrocarbonetos gasosos e em CO. Plásticos e pneus usados foram misturados com diferentes tipos de biomassa em bruto e tratada para reações de pirólise (Pinto *et al.* 2018). Foram testadas diferentes condições experimentais para produção de bio-óleos de forma a melhorar a obtenção de hidrocarbonetos líquidos. A autohidrólise de biomassa a 210°C e a hidrólise ácida produziram mais líquidos de pirólise e conversão total.

No âmbito do BBRI foi adquirida uma peletizadora [Fig.3.(a)] da empresa italiana Smartwood SRL (<https://www.smartwood srl.com/en/>) para produção de *pellets* a partir de biomassa, sendo testada no LNEG com bagaço de azeitona (mais escuros) e carolo de milho (mais claros) [Fig.3.(b)].



Fig. 3. (a) Peletizadora modelo PLT-100 – P002. (b) Pellets obtidos a partir do bagaço de azeitona e carolo de milho.

Caracterização de matérias-primas e biocombustíveis/bioproductos (BBRI 4)

A atividade da plataforma BBRI 4 foi focada com sucesso no suporte analítico à caracterização físico-química de matérias-primas, biocombustíveis e produtos de base biológica (Dias *et al.* 2020). Também foi dada especial atenção às metodologias e protocolos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ao longo de dois passos principais: i) preparação das amostras por correção de pH, e ii) o teste de diversas condições de operação. A BBRI 4 iniciou o desenvolvimento de uma metodologia de análise composicional de alto rendimento baseada na tecnologia de Infravermelho Próximo (NIR) (Dias *et al.* 2020; Mesquita *et al.* 2017). A plataforma BBRI 4 focou-se em *Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence* (WD-XRF) para deteção de contaminantes inorgânicos e avaliação qualitativa de metais em diferentes matérias-primas.

Sustentabilidade da Bioenergia (BBRI 5)

Um modelo de processo foi desenvolvido com o *software* SuperPro Designer para avaliação de uma biorrefinaria à base de microalgas utilizando *Synechocystis* para fixar CO₂, para produção direta de etanol utilizando design inovador de fotobioreatores, sem a necessidade de unidades de hidrólise e fermentação, e sendo continuamente extraído por meio de uma membrana de pervaporção (Lopes *et al.* 2019). Foi também simulada uma biorrefinaria de pequena escala alimentada por matérias-primas lenhocelulósicas, integrada com uma plataforma de digestão anaeróbia baseada em resíduos suinicultura, utilizando o *software* de modelização e de *design* de processo Aspen Plus (Lopes *et al.* 2019a). Foram considerados dois produtos: isobuteno e xilo-oligossacarídeos (XOS). O modelo de processo simulou a bioprodução de isobuteno utilizando uma estirpe de *Escherichia coli* geneticamente modificada (GMO), juntamente com a remoção e purificação de XOS de alto valor acrescentado, obtido após um pré-tratamento hidrotérmico da matéria-prima.

Na avaliação das alterações no uso do solo foi realizada a conceção, construção, desenho, validação e implementação de 3 bases de dados georreferenciados (mapeamento) de Portugal continental para avaliar áreas/solos para implementação de culturas energéticas, áreas/solos/águas para culturas de microalgas e espécies agrícolas/silvícolas cultivadas (incluindo seus resíduos) com potencial energético para seu aproveitamento ambiental, social e economicamente sustentável para a produção de biocombustíveis. O *software* ArcGIS foi utilizado como ferramenta do Sistema de Informação Geográfica (SIG), introduzindo os mapas existentes nos sites oficiais de instituições portuguesas e de Instituições Europeias que apresentavam dados relativos ao tipo de solo, necessidades hídricas e condições edafoclimáticas em formato *shapefile* ou *raster*, para avaliar as áreas para implantação da biomassa de interesse. Após a análise e seleção dos dados de interesse em cada mapa no ArcGIS, é apresentado o cruzamento de todos os mapas, sugerindo áreas adequadas e prevendo produções de biomassa para a implementação de cada cultura em Portugal Continental. Nas condições do estudo, o cardo (72 kha, 1085 kt), paulownia (81 kha, 26 kt) e microalgas (29 kha, 1616 kt) apresentaram a maior viabilidade de serem explorados como biomassa para energia em solos degradados e marginais (Abreu *et al.* 2020). É importante especificar que a nível da sustentabilidade dos solos, as culturas energéticas dedicadas apresentam um duplo propósito, a produção de biocombustíveis, eletricidade ou calor e a recuperação de solos com baixo risco de ILUC (*Indirect Land-use Change*) como: os solos contaminados, onde as culturas são capazes de solucionar e aliviar a poluição do solo derivada da presença de agentes polimetálicos e outros elementos tóxicos; os terrenos marginais (por exemplo, solos salinos) onde é reduzido o risco de conflitos de uso da terra devido à competição por alimentos e ração, gerando receitas adicionais aos proprietários de terras, contribuindo positivamente para o crescimento económico, e por último, nos solos pobres em matéria orgânica (degradados) onde é possível o cultivo de espécies para sua posterior recuperação, podendo ser novamente utilizados como áreas adequadas para a instalação de culturas agrícolas.

Ferramentas computacionais para engenharia metabólica (Biotecnologia Molecular BBRI 6).

Várias ferramentas computacionais e vários algoritmos foram desenvolvidos e implementados tais como *plugins* para merlin (www.merlin-sysbio.org) (Dias et al., 2018), para acelerar a reconstrução de modelos, tais como SamPler, Transport Systems Tracker (TranSyT), a restrição de biomassa baseada na Otimização In Silico (BioISO)) e o ProTReND- Base de dados de Rede Reguladora Transcricional Procariótica (http://bit.ly/ProTReND_DB). Um estudante de mestrado reconstruiu a rede GSM de *Lactobacillus rhamnosus* no âmbito desta infraestrutura. Foi patenteado um novo método de produção de n-butanol utilizando expressão heteróloga de vias anaeróbicas (International Patent, WO/2019/185843, 2019).

Estirpes industriais modificadas de *S. cerevisiae* como plataformas para a produção de bioenergia e produtos de base biológica a partir de biomassa (Biotecnologia Molecular BBRI 6).

As atividades desenvolvidas na plataforma levaram à construção de leveduras robustas para a produção sustentável de produtos de alto valor a partir de biomassa bem como à exploração de novas estratégias para intensificação do pré-tratamento e hidrólise enzimática de biomassa lenhocelulósica. Estirpes industriais de *S. cerevisiae* foram modificadas de forma a avaliar qual de duas vias de assimilação de xilose é a mais eficiente tendo em conta a produção de bioetanol a partir de biomassa (Cunha et al., 2019). As vias em estudo foram as que consistem numa xilose isomerase (via XI) e numa combinação de xilose redutase/xilitol desidrogenase (via XR/XDH). Até ao momento, estas vias tinham sido usadas largamente em fermentações de *S. cerevisiae* para vários fins sem que nunca houvesse uma comparação da sua eficiência quando usadas separadamente ou em conjunto. Os resultados obtidos indicaram claramente que a via XI é benéfica para se atingir altas produtividades e rendimentos em etanol a partir de xilose, mas que na presença de inibidores derivados do pré-tratamento da biomassa a presença das duas vias é vantajosa para a fermentação. Adicionalmente, com o objetivo de concentrar as capacidades hidrolíticas e fermentativas para bioprocessos consolidados num único microrganismo, a engenharia de estirpes de *S. cerevisiae* foi feita através da expressão de enzimas hemicelulolíticas à superfície celular (“cell surface display”), criando um biocatalizador para o bioprocessos consolidado (Cunha et al., 2020a). Esta estratégia permitiu a produção de bioetanol a partir de licor de hemicelulósico não-detoxificado derivado do pré-tratamento hidrotérmico de caroço de milho, não havendo necessidade de adição catalisadores hidrolíticos externos ao processo. Esta estratégia de produção de bioetanol provou ser mais eficiente do que a sacarificação e fermentação simultânea com adição de hemicelulases comerciais. Estas e outras estratégias aplicadas em *S. cerevisiae* para a produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica foram recentemente analisadas e discutidas (Cunha et al., 2020b).

Para além do bioetanol, também foi desenvolvida uma estratégia biotecnológica sustentável de sacarificação e fermentação simultânea para a produção do adoçante xilitol aplicando para o efeito uma estirpe modificada de *S. cerevisiae* previamente construída na plataforma. O bioprocessos foi otimizado através de desenho experimental utilizando diferentes cargas de substrato (caroço de milho pré-tratado) e concentração de enzima. No final, obteve-se a concentração máxima de 47 g/L xilitol com 6,7 % de caroço de milho pré-tratado e 24 FPU/g de concentração de enzima (Baptista et al., 2020). Com esta mesma estirpe, a plataforma desenvolveu um estudo com o objetivo de testar o efeito de soluções aquosas de solventes eutécticos profundos na hidrólise enzimática de xilano e a subsequente bioconversão da xilose obtida em xilitol (Romaní et al., 2020). A mistura estudada consistiu em Cloreto de colínio: Ureia ([Ch] Cl: U) a 50 % e 20 % (% peso) usando diferentes rácios molares. O maior rendimento de xilose (81,4 %) foi obtido com ([Ch] Cl: U) a um rácio 1:1 e 20 % em água. A produção de xilitol foi depois otimizada num processo de sacarificação e fermentação simultânea, atingindo-se um rendimento de xilitol de 66,04 %. Adicionalmente, a plataforma também tem vindo a estudar o potencial de novas matérias-primas para a produção de biocombustíveis avançados, nomeadamente biomassa marinha (algas) (del Río et al., 2020).

Exploração do fungo filamentososo *Ashbya gossypii* para a produção de biocombustíveis avançados e produtos de base biológica a partir de substratos renováveis (Biotecnologia Molecular BBRI 6).

Com um potencial de engenharia genética e metabólica elevado devido ao nível de homologia e sintenia do seu genoma com o de *S. cerevisiae*, este fungo destaca-se pelas suas inatas capacidades de produzir vitaminas (*e.g.*, riboflavina – vitamina B2) e outros compostos de valor acrescentado derivados de ácidos gordos (*e.g.*, ácidos gordos insaturados e lactonas). O potencial deste fungo para fins biotecnológicos tem vindo ser explorado ao longo da última década. Um estudo recente demonstrou o potencial de várias estirpes modificadas deste fungo para a produção de lípidos microbianos (“single cell oil”) a partir de substratos renováveis ricos em xilose, sacarose e glicerol como hidrolisados de caroço de milho, melão de cana de açúcar e crude glicerol proveniente da indústria do biodiesel (Díaz-Fernández et al., 2019). Adicionalmente, as vias metabólicas para a biossíntese *de novo* de lactonas, uma importante classe de fragrâncias com aplicação na indústria cosmética, foram decifradas através de engenharia metabólica. As estirpes modificadas resultantes deste trabalho demonstraram capacidade superior de biossíntese de lactonas a partir de açúcares simples (Silva et al., 2019). A elucidação das vias centrais envolvidas na biossíntese desta classe de compostos abre o caminho à otimização da sua produção a partir de matérias-primas renováveis, já

que até a data, a sua produção biotecnológica tinha sido apenas explorada através de processo de biotransformação de ácidos gordos hidroxilados. Com bases nestes dados, as mais recentes atividades desenvolvidas na plataforma têm-se focado na exploração e desenvolvimento do fungo filamentosos *A. gossypii* como uma fábrica celular para produção de biocombustíveis avançados e compostos de valor acrescentado derivados do metabolismo lipídico (e.g., lactonas) a partir de substratos presentes em matérias-primas renováveis e resíduos industriais (e.g., glicerol).

CONCLUSÕES/COMENTÁRIOS FINAIS

A inclusão da BBRI no Roteiro Nacional das Infraestruturas de Investigação de Interesse Estratégico permitiu apoiar e estimular a atividade científica e tecnológica reconhecida internacionalmente, privilegiando a excelência, a cooperação e a internacionalização, reforçando infraestruturas científicas e de investigação baseadas no conhecimento e na capacidade de prestação de serviços à comunidade nas áreas da Biomassa, Biorrefinarias, Bioenergia e Bioprodutos, designadamente de âmbito social, científico, educacional, empresarial e industrial. O conjunto de plataformas e recursos disponibilizados, geridos e partilhados pela BBRI (equipamento científico de grande porte, instrumentos científicos e recursos humanos altamente qualificados), bem como a prestação de serviços associados estiveram em linha com o progresso das prioridades nacionais e do Plano Nacional de Reformas (PNR) e internacionalmente com o Fórum Estratégico Europeu para as Infraestruturas de Investigação (ESFRI). De salientar o número de 156 publicações científicas em domínios científicos enquadráveis na RIS3 que foram obtidos no biénio 2017-2018 pela BBRI como indicadores de realização. É nesta conjuntura criação de conhecimento e a sua disseminação que se deve ter a aspiração de alavancar a participação de Portugal no próximo Programa-Quadro Europeu de I&I (Horizonte Europa) e outros programas financiadores relevantes na área.

AGRADECIMENTOS

A Infraestrutura de Investigação para a Biomassa e a Bioenergia (BBRI - Biomass and Bioenergy Research Infrastructure)-LISBOA-01-0145-FEDER-022059, é financiada pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização (PORTUGAL2020), do Programa Operacional Regional Lisboa Portugal (Lisboa 2020) e do Programa Operacional Regional Norte Portugal (Norte 2020) sob o acordo de parceria Portugal 2020.

REFERÊNCIAS

- Abreu, M., Reis, A., Moura, P., Fernando, A.L., Luís, A., Quental, L., Patinha, P. and Gírio, F. (2020). Evaluation of the Potential of Biomass to Energy in Portugal—Conclusions from the CONVERTE Project. *Energies*, 13(4), 937, 1-32. doi: 10.3390/en13040937
- Baptista, S.L., Carvalho, L.C., Romani, A., Domingues, L. (2020). Development of a sustainable bioprocess based on green technologies for xylitol production from corn cob. *Industrial Crops and Products*, 156: 112867.
- Costa Lopes, A.M., Morais, A.R.C. and Lukasik, R.M. (2017). Sustainable catalytic strategies for C5-sugars and biomass hemicellulose conversion towards furfural production. In *Production of Platform Chemicals from Renewable Resources*. Fang Z., Smith R.L.J. and Qi X. (eds.), pp. 45-80. Springer, Champ.
- Cunha, J.T., Romani, A., Inokuma, K., Johansson, B., Hasunuma, T., Kondo, A., Domingues, L. (2020). Consolidated bioprocessing of corn cob-derived hemicellulose: engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* as efficient whole cell biocatalysts. *Biotechnology for Biofuels*, 13:138.
- Cunha, J.T., Soares, P.O., Romani, A., Thevelein, J.M., Domingues, L. (2019). Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xylytol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*, 12:20.
- Cunha, J.T., Soares, P.O., Baptista, S.L., Costa, C.E., Domingues, L. (2020). Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic valorization: a review and perspectives on bioethanol production. *Bioengineered*, 11, 883-903.
- del Río, P.G., Gomes-Dias, J.S., Rocha, C.M.R., Romani, A., Garrote, G., Domingues, L. (2020). Recent trends on seaweed fractionation for liquid biofuels production. *Bioresource Biotechnology*, 299:122613.
- Dias, F., Drolc, A., Camões, M.F., Majcen, N.H., Jalukse, L., Leito I., Mosca, A., Šarac, T.M., Oliveira, C., Pustinek, J., Kanduč, K.R., Taylor, P., Teixeira, P. and Trancoso, M. (2020). Measurement of Total Reactive Phosphorus in Natural Water by Molecular Spectrophotometry (SMEWW 4500-P D) In *Practical examples on traceability, measurement uncertainty and validation in chemistry*, vol. 3, Hrastelj N. and Bettencourt da Silva R. (eds.), pp. 1-36. Springer, Champ.
- Dias, O., Rocha, M., Ferreira E.C. and Rocha, I. (2018). Reconstructing high-quality large-scale metabolic models with merlin. *Methods in Molecular Biology*, 1716, 1-36.

- Díaz-Fernández, D., Aguiar, T.Q., Martín, V.I., Romani, A., Silva, R. Domingues, L., Revuelta, J.L., Jiménez, A. (2019) Microbial lipids from industrial wastes using xylose-utilizing *Ashbya gossypii* strains. *Bioresource Technology*, 293:122054.
- Ferreira, A, Reis, A., Curcin, S., Vladic, J., Gkelis, S., Melkonyan, L., Avetisova, G., Congestri, R., Acién, G., Muñoz, R., Collet, P. and Gouveia, L. (2019). Combining Microalgae-Based Wastewater Treatment with Biofuel and Bio-Based Production in the Frame of a Biorefinery. In *Grand Challenges in Algae Biotechnology. Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, Hallmann A., Rampelotto P. (eds), pp. 319-369. Springer, Champaign.
- Ferreira, A., Marques, P., Ribeiro, B., Assemany, P., Vieira de Mendonça, H., Barata, A., Oliveira, A.C., Reis, A., Pinheiro, H.M. and Gouveia, L. (2018). Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, 164, 32-38.
- Geada, P., Pereira, R.N., Vasconcelos, V., Vicente, A.A., Fernandes, B. D. (2017). Assessment of synergistic interactions between environmental factors on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystin production. *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 27, 235-243.
- Lopes, T.F., Cabanas, C., Silva, A., Fonseca, D., Santos, E., L., Guerra, L.T., Sheahan, C., Reis, A. and Gírio, F. (2019). Process simulation and techno-economic assessment for direct production of advanced bioethanol using a genetically modified *Synechocystis* sp. *Bioresource Technology Reports*, 6, 113–122.
- Lopes, T.F., Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F., Quintero, J.A. and Aroca, G. (2019a). Techno-economic and life-cycle assessments of small-scale biorefineries for isobutene and xylo-oligosaccharides production: a comparative study in Portugal and Chile. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13, 1321-1332.
- Marchão, L., Silva, T.L., Gouveia, L. and Reis, L. (2018). Microalgae-mediated brewery wastewater treatment: effect of dilution rate on nutrient removal rates, biomass biochemical composition and physiological state. *Journal Applied Phycology*, 30, 1583-1595.
- Marques, S., Matos, C.T., Gírio, F.M., Roseiro, J.C. and Santos, J.A.L. (2017). Lactic Acid Production from Recycled Paper Sludge: Process Intensification by running Fed-Batch into a Membrane-Recycle Bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 120, 63-72.
- Mesquita, D.P., Quintelas, C., Amaral, A.L. and Ferreira, E.C. (2017). Monitoring biological wastewater treatment processes: recent advances in spectroscopy applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 16(3), 395-424.
- Michelin M., Liebenritt S., Vicente, A.A. and Teixeira, J.A. (2018). Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(A), 159-169.
- Moniz, P., Serralheiro, C., Matos, C.T., Boeriu, C.G., Frissen, A.E., Duarte, L.C., Roseiro, L.B., Pereira, H. and Carvalho, F. (2018). Membrane separation and characterisation of lignin and its derived products obtained by a mild ethanol organosolv treatment of rice straw. *Process Biochemistry*, 65, 136-145.
- Moura, P., Ortigueira, J., Valdez-Vazquez, I., Saratale, G.D., Saratale, R.G. and Silva, C.A. (2017). Dark Fermentative Hydrogen Production. In *Microbial Fuels: Technologies and Applications*, chapter 7, 56 pp. Darvishi F. & Hiligsmann S. (eds), CRC Press/Taylor & Francis Group, Florida.
- Ortigueira, J., Martins, L., Pacheco, M., Silva, C. and Moura, P. (2019). Improving the non-sterile food waste bioconversion to hydrogen by microwave pretreatment and bioaugmentation with *Clostridium butyricum*. *Waste Management*, 88, 226-235.
- Pinto, F., Gominho, J., André, R.N., Gonçalves, D., Miranda, M., Varela, F., Neves, D., Santos, J., Lourenço, A. and Pereira, H. (2017). Effect of rice husk torrefaction on syngas production and quality. *Energy Fuels*, 31(5), 5183–5192.
- Pinto, F., Paradela, F., Carvalho, F., Duarte, L.C., Costa, P. and André, R. (2018). Co-Pyrolysis of Pre-Treated Biomass and Wastes to Produce Added Value Liquid Compounds. *Chemical Engineering Transactions*, 65, 211-216.
- Romani, A., Morais, E.S., Soares, P.O., Freire, M.G., Freire, C.S.R., Silvestre, A.J.D., Domingues, L. (2020). Aqueous solutions of deep eutectic systems as reaction media for the saccharification and fermentation of hardwood xylan into xylitol. *Bioresource Technology*, 2020:123524.
- Silva, R., Aguiar, T.Q., Coelho, E., Jiménez, A., José Luis Revuelta, J.L., Domingues, L. (2019). Metabolic engineering of *Ashbya gossypii* for deciphering the de novo biosynthesis of γ -lactones. *Microbial Cell Factories*, 18:62.
- Toscan, A., Morais, A.R.C., Paixão, S.M., Alves, L., Andreus, J., Dillon, A.J.P. and Lukasik, R.M. (2017). High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency. *Bioresource Technology*, 224, 639-647.