

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CARLOS ALBERTO GALEANO SUAREZ

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DE HEXOSES E
PENTOSES**

SÃO CARLOS/SP

2014

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DE HEXOSES E
PENTOSES**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CARLOS ALBERTO GALEANO SUAREZ

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DE HEXOSES E
PENTOSES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami
Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr.
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Luperni Horta

SÃO CARLOS/SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G152op

Galeano Suarez, Carlos Alberto.

Otimização da produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses / Carlos Alberto Galeano Suarez. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

165 f.

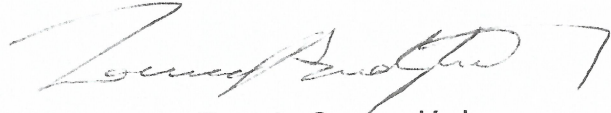
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Engenharia química. 2. Hidrólise enzimática. 3. Celulose. 4. Bagaço de cana. 5. Bioreatores. 6. Batelada alimentada. 7. Xilulose. 8. *S. cerevisiae*. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **CARLOS ALBERTO GALEANO SUAREZ**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 27 DE FEVEREIRO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



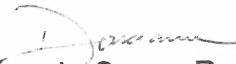
Ruy de Sousa Júnior
Coorientador / UFSCar



Antonio Carlos Luperni Horta
Coorientador / UFSCar



Francisco Maugeri Filho
UNICAMP



Dasciana de Sousa Rodrigues
EMBRAPA



Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar

Dedico este trabalho aos meus pais, Magdalena e Orlando, a meu irmão Jorge, e em especial a minha esposa Inti por todo o apoio e compreensão brindados durante estes anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar-me a vida e forças para não desistir.

À minha orientadora, Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami pelos ensinamentos, ajuda e a confiança depositada na realização deste projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. por todas as orientações, ensinamentos, paciência e dedicação brindados ao longo destes anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Luperni Horta pela colaboração e ajuda brindados na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano e à Prof. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Isabel Rocha e ao Prof. Dr. Eugénio Campos Ferreira da Universidade do Minho (Portugal), que gentilmente colaboraram neste doutorado sanduíche.

A todos os meus companheiros dos Laboratórios de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) e de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar pela amizade e ajuda oferecida. Agradeço especialmente a Adilson, Ana Maria, Claudinha, Cíntia, Dasciana, Edson, Guilherme, Gilson, Marcelo, Mirella, Patrícia, Ursula, Felipe, Renata, Renan, Luciano, aos alunos da turna J da disciplina *Desenvolvimento de Processos Químicos 2 (DPQ2)*, pelos conselhos e amizade que foram muito importantes para a realização deste doutorado.

À minha esposa Inti por todo o apoio, compreensão carinho e ajuda incondicional. A minha família por sua confiança e apoio.

Aos técnicos, Amadeus, Thaís, Thiago e Aline pela ajuda nas análises dos experimentos.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A produção industrial de etanol combustível e de açúcar gera como principal subproduto o bagaço de cana de açúcar, que é queimado nas caldeiras para geração de energia. Entretanto, por ser um material lignocelulósico (constituído basicamente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina), o bagaço pode ser reaproveitado para a produção de bioetanol de segunda geração (2G), que é um biocombustível renovável e ambientalmente amigável. Para que a produção industrial de etanol 2G se torne economicamente viável, é necessário o aproveitamento de todas as frações fermentescíveis presentes no bagaço de cana: fração C6 (celulose) e fração C5 (hemicelulose). Estas frações são submetidas a processos de hidrólise que geram como principais açúcares glicose e xilose respectivamente. É importante, portanto, que o microrganismo empregado para a produção de etanol 2G seja capaz de utilizar todos os açúcares gerados no processo de hidrólise. Neste trabalho foi escolhida a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por ser o principal microrganismo utilizado na produção industrial de álcool combustível, embora, infelizmente, esta levedura seja incapaz de fermentar xilose. No entanto, embora *S. cerevisiae* não utilize xilose, pode fermentar a xilulose obtida pela isomerização de xilose pela enzima xilose isomerase conhecida industrialmente como glicose isomerase. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e avaliar alternativas tecnológicas para a produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses, utilizando *S. cerevisiae* selvagem. Em relação à Fração C6, neste trabalho foram abordados dois aspectos importantes: i) estudo da operação em regime de batelada alimentada de um reator de hidrólise enzimática da fração C6 do bagaço de cana de açúcar, obtendo-se valores de concentração final de glicose de cerca de 200 g.L⁻¹, superiores aos 45 g.L⁻¹ alcançados em reator operado em bateladas simples; ii) modelagem cinética de sistemas complexos (hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos), no qual foi desenvolvido um interpolador utilizando a lógica *fuzzy* como uma ferramenta importante para representar os processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos de forma robusta e confiável. Já em relação à Fração C5, inicialmente aplicou-se técnicas simples de Engenharia Evolutiva, levando à seleção de uma linhagem diferenciada de *S. cerevisiae*, adaptada à assimilação de xilulose em meio mínimo e caracterizada por reduzida formação de xilitol, a qual apresentou uma seletividade de $\sim 7 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$, valor significativamente superior à seletividade alcançada pela linhagem selvagem, de $\sim 2 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$. A linhagem selecionada foi então estudada em cultivos em batelada conduzidos em biorreator de bancada, sob diferentes condições de limitação por oxigênio. Verificou-se que a produção de etanol é favorecida, em

detrimento da formação de xilitol, mantendo-se o fluxo de xilulose consumida acima de 0,5 $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para fluxo de oxigênio consumido de 0,1 $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, alcançando-se nessa condição seletividades em torno de 4 $\text{g}_{\text{etanol}}.\text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$. Para fluxos de oxigênio nulo (cultivo anaeróbico) ou acima de 0,3 $\text{mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, a produção de etanol é drasticamente reduzida, independentemente do fluxo de xilulose assimilado pelas células.

PALAVRAS-CHAVE: hidrólise enzimática, celulose, bagaço de cana, biorreator, batelada alimentada, interpolador *fuzzy*, xilose, xilulose, *S. cerevisiae*.

ABSTRACT

The industrial production of fuel ethanol and sugar generates the main byproduct of sugarcane bagasse, which is burned in boilers for power generation. However, as a lignocellulosic material (consisting basically of three polymers: cellulose, hemicellulose and lignin), bagasse can be reused for the production of second generation bioethanol (2G), which is a renewable and environmentally friendly biofuel. For industrial 2G bioethanol production becomes economically feasible, the use of all fermentable fractions present in the bagasse is required: C6 fraction (cellulose) and C5 fraction (hemicellulose). These fractions are subjected to hydrolysis processes that generate as main sugars glucose and xylose respectively. It is important, therefore, that the microorganism employed for the production of ethanol 2G is able to utilize all the sugars generated during the hydrolysis process. In this work we chose the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to be the main microorganism used in the industrial production of ethanol, although unfortunately, this yeast is unable to ferment xylose. However, while *S. cerevisiae* does not use xylose, can ferment xylulose obtained by isomerization of xylose by the enzyme glucose isomerase. The objective of this study was to develop and evaluate technological alternatives for the production of ethanol 2G from hexoses and pentoses using wild *S. cerevisiae*. In relation to the C6 fraction, in this work two important aspects have been addressed: i) study of the operation regime of a fed-batch reactor enzymatic hydrolysis of the C6 fraction of bagasse from sugarcane, yielding values of final glucose concentration of 200 g.L⁻¹, higher than 45 g.L⁻¹ achieved in batch reactor; ii) kinetic modeling of complex systems (enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates), in which an interpolator was developed using fuzzy logic as an important tool to represent the processes of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials for rugged and reliable manner. Now, in relation to the C5 fraction initially applied simple techniques of Evolutionary Engineering, leading to the selection of a different strain of *S. cerevisiae*, adapted to assimilate xylulose in minimal medium and characterized by reduced formation of xylitol, which demonstrated a selectivity of $\sim 7 \text{ g}_{\text{ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$, significantly higher than the selectivity achieved by the wild strain of $\sim 2 \text{ g}_{\text{ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$. The selected strain was studied in batch cultures conducted in bench scale reactor under different conditions of oxygen limitation. It was found that the production of ethanol is favored over the formation of xylitol, keeping the flow of consumed xylulose above 0,5 mmol.g_{MS}⁻¹.h⁻¹ for flow of oxygen

consumption of $0.1 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, reaching in this condition selectivities around $4 \text{ g}_{\text{ethanol}}.\text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$. For zero flow of oxygen (anaerobic culture) or above $0,3 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ethanol production is drastically reduced, regardless of the flow xylulose assimilated by the cells.

KEYWORDS: Enzymatic hydrolysis, cellulose, sugarcane bagasse, bioreactor, fed batch, xylose, xylulose, *S. cerevisiae*, fuzzy interpolator.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Estrutura microscópica do bagaço de cana de açúcar.	26
Figura 1.2 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.	27
Figura 1.3 – Estrutura da xilana.	28
Figura 1.4 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) para um material lignocelulósico com diferentes pré-tratamentos: (A) Sem pré-tratamento, (B) Hidrotérmico, (C) Ácido, (D) Alcalino.	29
Figura 1.5 – Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose pela endoglucanase, exo-1,4-β-glucanase (CBH) e β-glicosidase (BG). Os quadrados cheios representam as extremidades reductoras e os quadrados abertos extremidades não reductoras. 31	31
Figura 1.6 – Exemplos de diferentes formas de cluster. a) círculos cheios, b) linhas, c) círculos ocos, d) elipse oca.	35
Figura 1.7 – Rotas do metabolismo da D-xilose e da D-xilulose em leveduras.	37
Figure 2.1 – Experimental apparatus for enzymatic hydrolysis.....	50
Figure 2.2 – Comparison of experimental and simulated data of batch operation. Michaelis-Menten with inhibition parameters: $k_e=0.112 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $k_m=15 \text{ g.L}^{-1}$ and $k_i=4.5 \text{ g.L}^{-1}$. Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50° C , pH 4.8, initial enzyme concentration $e(0) = 7.8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842.4 \text{ FPU.L}_{\text{solution}}^{-1}$ and initial potential glucose concentration of $44 \text{ gpotential_glucose.L}_{\text{solution}}^{-1}$	55
Figure 2.3 – (a) Fed enzyme (experimental equals simulated), operational policy P#2, (b) Experimental and simulated data for bagasse (operational policy P#2), (c) Experimental and simulated data for volume (operational policy P#2), (d) Experimental and simulated data for bagasse per volume (operational policy P#2), (e) Experimental and simulated data of glucose in fedbatch operation (operational policy P#2). Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50° C , pH 4.8, initial enzyme concentration $e(0) = 7,8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU.L}_{\text{solution}}^{-1}$ and initial potential glucose concentration of $44\text{gpotential_glucose.L}_{\text{solution}}^{-1}$	56
Figure 2.4 – (a) Experimental and simulated data for bagasse feeding for optimal control theory, (b) Experimental and simulated data for glucose during fed batch with optimal control. Operating conditions are 50° C , pH 4.8, initial enzyme concentration $e(0) = 73,4 \text{ g.L}^{-1} \equiv 7927.2 \text{ FPU.L}_{\text{solution}}^{-1}$ and initial potential glucose concentration of $44 \text{ gpotential_glucose.L}_{\text{solution}}^{-1}$	58

Figure 2.5 – Enzyme price sensitivity analysis.....	59
Figura 2.6 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1 para 7% de sólidos. (a) Enzima alimentada, (b) alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 13,05 \text{ g.L}^{-1} \equiv 1.409,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $77,77 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}}.\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$	67
Figure 3.1 - Percentage of cellulose in the reactor versus percentage of lignin with regard to the substrate composition, during the hydrolysis processes, for the experimental data of Carvalho (19-20). The data are for five different lignocellulosic substrates (filter paper (1); exploded bagasse treated with 4% NaOH, low (2) and high load (3); bagasse treated with 1% H2SO4 and 4% NaOH, low (4) and high load (5)).....	80
Figure 3.2 - First output for the clustering process. (Δ) Center of the cluster for filter paper; (*) Center of the cluster for exploded bagasse treated with 4% NaOH (low percentage of cellulose); (X) Center of the cluster for exploded bagasse treated with 4% NaOH (high percentage of cellulose); (O) Center of the cluster for bagasse treated with 1% H2SO4 and 4% NaOH (low percentage of cellulose); (+) Center of the cluster for bagasse treated with 1% H2SO4 and 4% NaOH (high percentage of cellulose).	81
Figure 3.3 - Second output for the clustering process.....	82
Figure 3.4 - Membership functions for determining the degree of membership (for cellulose load). Each cluster center corresponds to the maximum degree of membership (=1) of a particular linguistic value (for the linguistic variable cellulose load). The straight lines connecting de data points (cluster centers) characterize intermediate degrees of membership within two adjacent linguistic values.	83
Figure 3.5 - Membership functions for determining the degree of membership (for lignin content). Each cluster center corresponds to the maximum degree of membership (=1) of a particular linguistic value (for the linguistic variable lignin content). The straight lines connecting de data points (cluster centers) characterize intermediate degrees of membership within two adjacent linguistic values.	83
Figure 3.6 - Final membership functions to determine the degree of membership (for cellulose load).	84
Figure 3.7 - Final membership functions to determine the degree of membership (for lignin content).	84

Figure 3.8 - Experimental data (percentage of cellulose in the reactor and percentage of lignin with regard to the substrate composition) for the validation experiment, in relation to cluster centers.....	86
Figure 3.9 - Potential glucose concentration profiles. Comparison of experimental and simulated data for synthetic substrate. Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50°C, pH 4.8, enzyme concentration of 1200 FPU.L _{solution} ⁻¹ and initial potential glucose concentration of 66.66 g _{potential_glucose} .L _{solution} ⁻¹	87
Figure 3.10 - Product concentration profiles. Comparison of experimental and simulated data for synthetic substrate. Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50°C, pH 4.8, enzyme concentration of 1200 FPU.L _{solution} ⁻¹ and initial potential glucose concentration of 66.66 g _{potential_glucose} .L _{solution} ⁻¹	87
Figure 4.1 - (a) Colonies observed in Itaiquara baker's yeast YPD plates, (b) Yeast cells and other microorganisms observed in microscope (200x magnification) for Itaiquara baker's yeast suspension, (c) Colonies observed in YPD plates for the isolated wild-type strain, (d) Yeast cells observed in microscope (200x magnification) the isolated wild-type strain.....	104
Figure 4.2 - (a) Growth of mutant strains on minimal defined medium with D-xylulose; (b) Growth of wild-type strain on YP medium with D-xylulose.....	105
Figure 4.3 - Time evolution of cell concentration, consumption of D-xylulose and formation of metabolites during cultivation of <i>S. cerevisiae</i> under fermentative conditions, minimal defined medium. Temperature of 30 °C and pH 5.2 (a) selected colony 1, (b) selected colony 9, (c) selected colony 11 (experiments in duplicate).	109
Figure 4.4 - Evolution of cell concentration, consumption of D-xylulose and formation of products during cultivation of <i>S. cerevisiae</i> under fermentative conditions. Temperature of 30 °C and pH 5.2 (a) selected colony 11 with minimal medium. (b) selected colony 11 with YNB medium.	111
Figure 4.5 - Evolution of cell concentration, D-xylulose consumption and products formation during cultivation of wild-type <i>S. cerevisiae</i> under fermentative conditions. Temperature of 30 °C and pH 5.2 with minimal medium. Experiment in triplicate.	114
Figure 4.6 - Comparison of yeasts on bromocresol agar after two days of incubation. (a) Top: Mutant strain and Bottom: Wild strain. (b) Left: Mutant strain and Right: Wild strain.....	115
Figura 5.1 – (a) Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições aeróbias, (b) Fluxos em xilitol, arabitol e biomassa em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.....	133

Figura 5.2 – (a) Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições anaeróbias, (b) Fluxos em xilitol, arabitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.....	136
Figura 5.3 – (a) Batelada B3, Cultivo M1. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições de limitação de oxigênio $y_{O_2}=0,047$ (b) Fluxos em xilitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.....	138
Figura 5.4 – (a) Batelada B4, Cultivo M2. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições de limitação de oxigênio com $y_{O_2}= 0,02$ (b) Fluxos em xilitol, arabitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.	140
Figura 5.5 – Bateladas B5, B6 e B7, Cultivo M2. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições de limitação de oxigênio: (a) $y_{O_2}= 0,024$; (c) $y_{O_2} = 0,004$; (e) $y_{O_2} = 0,010$. Fluxos de metabólitos em função do fluxo de assimilação de xilulose para condições de limitação de oxigênio com: (b) $y_{O_2} = 0,024$; (d) $y_{O_2}= 0,004$; (f) $y_{O_2} = 0,010$. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.....	142
Figura 5.6 – (a) Batelada B8, Cultivo M3. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições de limitação de oxigênio com $y_{O_2}= 0,003$ (b) Fluxos de xilitol, arabitol e etanol em função do fluxo de xilulose para condições de limitação de oxigênio com $y_{O_2} = 0,003$	144
Figura 5.7 – Bateladas B9 e B10, Cultivo M3. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> em condições de limitação de oxigênio (a) $y_{O_2} = 0,001$. (c) $y_{O_2} = 0,002$. Fluxos em xilitol, arabitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose para condições de limitação de oxigênio (b) $y_{O_2} = 0,001$. (d) $y_{O_2} = 0,002$. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.	146
Figura 5.8 – Viabilidade celular ao longo dos cultivos em condições de oxigênio limitado M1, M2 e M3.	147
Figura 5.9 – Valores de seletividade ($\text{mmol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mmol}_{\text{xilitol}}^{-1}$) em função dos fluxos de xilulose e oxigênio, obtidos a partir de: (a) Dados experimentais durante fermentações em batelada, anaeróbia e micro aeróbia (b) Dados <i>in silico</i> simulados com o software Optflux.	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Experimentos de evolução adaptativa em laboratório com leveduras.	40
Table 2.1 - Characterization of pretreated sugarcane bagasse.	49
Table 2.2 - Added enzyme and substrate for P#1, P#2 and P#3.	51
Table 2.3 - Comparison of simulated and experimental data.	60
Table 3.1 - Semimechanistic kinetic models and kinetic parameters used to develop the fuzzy interpolator for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials (Carvalho, 19-20).	76
Table 4.1 – Major applications of evolutionary engineering in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98
Table 4.2 - Main results from SIF experiments carried out with different <i>S. cerevisiae</i> strains. T = 35 °C; initial xylose concentration = ~ 65 g.L ⁻¹ ; initial biomass concentration = ~ 50 g _{DCW} .L ⁻¹ (yeast cells immobilized in calcium alginate beads). Adapted from Moraes, 2013.	103
Table 4.3 - Evolutionary engineering experiments with minimal medium adapted mutants: overall variation of optical density, D-xylulose consumption and xylitol formation for cultivations under fermentative conditions. Temperature of 30 °C and pH 5.2.	106
Table 4.4 - Cultures performance indexes: specific growth rates (μ), cell/D-xylulose yields ($Y_{x/s}$), D-xylulose assimilation rate ($\mu_{D-xylulose}$), specific productivity (Pr_{EtOH}), ethanol/D-xylulose yields ($Y_{EtOH/S}$) and xylitol/D-xylulose yields ($Y_{XOH/S}$) for 3 colonies selected in shake cultures. Temperature 30 °C, pH 5.2.	110
Table 4.5 - Cultures performance indexes: cell/D-xylulose yields ($Y_{x/s}$), D-xylulose assimilation rate ($\mu_{D-xylulose}$), specific productivity (Pr_{EtOH}), ethanol/D-xylulose yields ($Y_{EtOH/S}$) and xylitol/D-xylulose yields ($Y_{XOH/S}$) for wild-type and selected <i>S. cerevisiae</i> (colony 11) in shake cultures. Temperature 30 °C, pH 5.2.	114
Tabela 5.1 - Sequência de experimentos em biorreator sob condições de limitação por oxigênio.	129
Tabela 5.2 – Indicadores de desempenho para o cultivo de <i>S. cerevisiae</i> M2 e M3 sob condições de limitação de oxigênio, tendo xilulose como substrato.	143
Tabela 5.3 – Balanço de carbono para a fermentação de xilulose nas condições aeróbia, anaeróbia e limitadas por oxigênio.	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNTP	Condições normais de temperatura e pressão
C_X	Concentração celular, ($\text{g}_{\text{massa seca}} \cdot \text{L}^{-1}$)
D	Taxa de diluição (F_{feed}/V), (min^{-1})
DO	Densidade óptica
e	Concentração de enzima, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
$e_{\text{acumulada}}$	Enzima acumulada no reator, (FPU)
e_{alim}	Enzima a ser adicionada no reator, (FPU)
F_{alim}	Vazão de alimentação de substrato, ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)
f_1	Fluxo de caixa do processo, (US\$)
f_2	Fluxo de caixa do processo por kg de bagaço tratado ($\text{US} \cdot \text{kg}^{-1}$ de bagaço tratado)
g_{MS}	Peso de massa seca (g)
H	Hamiltoniano
J	Índice de desempenho
k	Taxa constante da hidrólise de celulose, (min^{-1})
k_I	Constante de inibição competitiva, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
km	Constante de Michaelis-Menten, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
$M_{\text{acumulada}}$	Massa acumulada de bagaço consumido, (g)
m_x	Massa celular, (g)
m_s	Massa de substrato, (g)
m_p	Massa de produto, (g)
n_{CO2prod}	Mols de CO_2 produzidas ($\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$)
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidreto
P	Concentração de produto, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
P_0	Concentração inicial do produto, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
PPP	Pentose Phosphate Pathway
P_e	Pressão do gás de entrada, (atm)
P_s	Pressão do gás de saída, (atm)

Q_e	Vazão do gás de entrada, (L.h ⁻¹)
Q_s	Vazão do gás de saída, (L.h ⁻¹)
R	Constante dos gases ideais, (atm.L.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
r	Velocidade de reação, (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
$r_{inicial}$	Velocidade reação inicial, (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
r_{set}	Velocidade reação set, (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
S	Celulose (transformada na concentração de glicose potencial), (g.L ⁻¹)
S_0	Concentração inicial de glicose potencial, (g.L ⁻¹)
S_{alim}	Concentração de substrato na alimentação, (g.L ⁻¹)
SIF	Fermentação e isomerização simultâneas
t	Tempo, (s, min ou h)
t_0	Tempo inicial, (s, min ou h)
t_f	Tempo final, (s, min ou h)
T_e	Temperatura do gás de entrada, (K)
T_s	Temperatura do gás de saída, (K)
u	Variável de controle
V	Volume de reação, (L)
VPF	Via Pentose Fosfato
V_0	Volume inicial de reação, (L)
x	Variável de estado
X	Conversão de substrato
y_{CO_2e}	Fração molar de CO ₂ na entrada
y_{CO_2s}	Fração molar de CO ₂ na saída
y_{N_2e}	Fração molar de N ₂ na entrada
y_{N_2s}	Fração molar de N ₂ na saída
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato a células, (g _{massa seca} .g _{substrato} ⁻¹)
$Y_{X/P}$	Fator de rendimento de células a produto, (g _{produto} .g _{massa seca} ⁻¹)
$Y_{X/M}$	Fator de rendimento de células a metabólito, (g _{metabolito} .g _{massa seca} ⁻¹)
λ	Multiplicador de Lagrange

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1	26
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
1.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	26
1.1.1 CELULOSE	27
1.1.2 HEMICELULOSE.....	27
1.1.3 LIGNINA.....	28
1.2 PRÉ-TRATAMENTO.....	28
1.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CELULOSE	30
1.4 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G).....	32
1.5 INTELIGENCIA ARTIFICIAL EM ETANOL 2G.....	33
1.5.1 LÓGICA <i>FUZZY</i> (NEBULOSA)	33
1.5.2 AGRUPAMENTO DE DADOS (CLUSTERING)	34
1.6 METABOLISMO DE XILULOSE EM <i>S. cerevisiae</i>	35
1.7 ENGENHARIA EVOLUTIVA.....	38
CAPÍTULO 2	43
APROVEITAMENTO DA FRAÇÃO C6 DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR	43
CAPÍTULO 3	68
MODELAGEM CINÉTICA DE SISTEMAS COMPLEXOS: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS.....	68
CAPÍTULO 4	92
ELEVADA SELETIVIDADE ETANOL/XILITOL EM LINHAGEM DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ADAPTADA À ASSIMILAÇÃO DE XILULOSE.....	92
CAPÍTULO 5	121
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA POR <i>S. cerevisiae</i> ADAPTADA: INFLUÊNCIA DOS FLUXOS DE OXIGÊNIO E XILULOSE.....	121
CAPÍTULO 6	157

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	157
CONCLUSÕES	157
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	159
REFERÊNCIAS.....	161

INTRODUÇÃO

A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica tem sido estudada intensivamente. Essa biomassa é essencialmente composta de lignina (20–30%), celulose (33–51%) e hemicelulose (19–34%) (VAN MARIS et al., 2006). As duas últimas frações são polissacarídeos cuja hidrólise (química e/ou enzimática) gera principalmente hexoses a partir da celulose (majoritariamente glicose), e pentoses a partir da hemicelulose (majoritariamente xilose). O bagaço de cana de açúcar é do ponto de vista técnico-econômico, uma das mais promissoras matérias-primas para produção de etanol 2G, pois já foi coletado no campo, estando disponível no sítio industrial para processamento (FURLAN et al., 2013).

O processo de produção de etanol de segunda geração (2G) começa com o pré-tratamento do material seguido da hidrólise enzimática do bagaço (fração C6 da biomassa), a qual envolve a ação sinérgica de vários tipos de celulases. As enzimas que hidrolisam a celulose são divididas em três grupos principais: endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases. Sinergismo é geralmente definido como o aumento da atividade exibido por uma mistura de enzimas comparada com a soma das atividades das enzimas individuais (AL-ZUHAIR, 2008). A hidrólise enzimática é complexa, sendo afetada por vários fatores como: estabilidade e diferença nas propriedades da enzima, adsorção improdutiva da enzima, principalmente sobre a lignina ainda presente após o pré-tratamento, efeitos inibitórios dos produtos, resistência ao transporte de massa e superlotação das enzimas sobre a matriz de substrato, dentre outros (ROTHSCHILD, 1998; WILLIAMS, 2001). Assim, como descrito em Sousa Jr. et al. (2011) o modelo cinético do processo está longe de ser trivial. Estabelecidas as condições de hidrólise, a fermentação alcoólica da glicose é trivial, havendo linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* adaptadas ao ambiente industrial, robustas e aptas a suplantarem a competição com microrganismos contaminantes. Assim, no contexto da produção de etanol a partir da celulose, um grande desafio reside na etapa de hidrólise dessa fração, e o presente trabalho pretende contribuir para a sua otimização por meio da utilização de ferramentas computacionais e da realização de ensaios experimentais.

O aproveitamento da fração hemicelulósica para a produção de etanol 2G requer a incorporação de uma etapa de pré-tratamento simples (como hidrólise a quente por ácido fraco, por exemplo) para extrair seletivamente a hemicelulose e hidrolisá-la, liberando

predominantemente xilose e glicose, além de outras pentoses. Análises econômicas do processo de produção de etanol 2G publicadas recentemente (MACRELLI et al., 2012; FURLAN et al., 2012; DIAS et al., 2013), mostram que o aproveitamento parcial da fração hemicelulósica da biomassa é essencial para viabilizar economicamente a produção industrial de bioetanol. Porém, o grande desafio para a implementação de um processo industrial de obtenção de etanol a partir de pentoses reside justamente na etapa de fermentação, já que *S. cerevisiae* não metaboliza xilose naturalmente (CHU; LEE, 2007).

Para viabilizar a fermentação alcoólica de pentoses em nível industrial, basicamente três abordagens são encontradas na literatura ou em patentes:

a) utilizar microrganismos naturalmente etanologênicos como, por exemplo, as leveduras *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* ou *Candida shehate*. A aplicação desta abordagem, entretanto, apresenta dificuldades: baixa tolerância a etanol desses microrganismos, baixas velocidades de fermentação, inibição por subprodutos originados do pré-tratamento da matéria prima e necessidade de operação em microaerobiose, ou seja, demanda controle muito fino dos níveis de oxigênio dissolvido, em biorreatores de grande porte (OLOFSSON et al., 2008);

b) aplicar técnicas de biologia molecular, modificando a levedura *S. cerevisiae* (ou, menos frequentemente, algum outro microrganismo), de forma a incorporar genes das enzimas da rota catabólica da xilose. Essa é de longe a alternativa em que mais se vem investindo na literatura e na indústria há cerca de duas décadas (WALFRIDSSON et al., 1996), como demonstra o número de patentes depositadas/concedidas sobre o assunto (busca em outubro de 2013 na base Derwent, revelou 128 patentes sobre diferentes OGMs desenvolvidos com esse propósito – a grande maioria usando *S. cerevisiae* como plataforma). Esta abordagem, entretanto, tem também sérias restrições, quando se pensa em sua aplicação para produzir uma *commodity* como o álcool etílico combustível (com baixo preço de mercado e grande escala de produção): dificuldade em se manter a estabilidade genética das linhagens recombinantes; baixos rendimentos em etanol e longos tempos de fermentação; competição com cepas selvagens e/ou com microrganismos contaminantes (bactérias e fungos) em um ambiente industrial não asséptico, em reatores de até 10^6 m³; restrições do marco regulatório para aplicação de OGMs, encarecendo procedimentos no processo industrial;

c) isomerizar *ex-vivo* xilose a xilulose, pentose que é metabolizada por *S. cerevisiae* não modificada. Esta alternativa procura tirar vantagem da robustez dessa

levedura, largamente empregada para produção de etanol de primeira geração, ao mesmo tempo em que evita os inconvenientes do uso de OGMs (RAO et al., 2008; SILVA et al., 2012). Desta forma, utiliza-se a enzima glicose (ou xilose) isomerase (EC 5.3.1.5) para catalisar a isomerização (reação reversível que, entretanto, tem o equilíbrio químico deslocado no sentido da xilose, na razão 5:1), e a levedura selvagem para fermentar a xilulose a etanol (e, dependendo das condições operacionais e da linhagem, em xilitol). Essa ideia foi lançada em 1984, na patente US 4,490,468 (GONG et al. 1984). Nessa patente, os inventores propõem utilizar dois reatores independentes, com recirculação entre eles: um para isomerização enzimática xilose-xilulose (com enzima glicose isomerase, GI, livre ou imobilizada) e outro para a fermentação alcoólica da xilulose por *S. cerevisiae*.

A operação em reatores independentes, como proposto por Gong et al., (1984) permite superar uma dificuldade operacional importante: enquanto que xilose isomerases comerciais têm pH ótimo entre 7 e 8, e temperatura ótima ao redor de 70°C, a condição industrial para fermentação alcoólica tem pH entre 4 e 5 (para minimizar riscos de contaminação) e temperaturas entre 30 e 35°C. Mas, por outro lado, como a conversão de equilíbrio é baixa, há necessidade de grande recirculação entre os biorreatores, aumentando os custos de equipamentos e operacionais.

Alternativamente, a isomerização de xilose usando a enzima GI simultânea à fermentação de xilulose (processo SIF – Simultânea Isomerização e Fermentação), em alguns casos, com a levedura coimobilizada em suporte insolúvel é um processo já reportado na literatura. Tem a vantagem de utilizar a fermentação para deslocar o equilíbrio químico *in situ*: a xilulose produzida é metabolizada imediatamente, permitindo o prosseguimento da reação até conversão total da xilose. Com esta técnica, intensifica-se o processo, que ocorre em um único reator. Silva et al., (2012) propõem a estabilização da enzima a pHs inferiores através de ligações covalentes multipontuais, com a GI suportada em quitosana, e esta envolvida por gel de alginato com a levedura nele imobilizada.

O processo SIF mencionado acima foi estudado em detalhes no âmbito do Projeto Temático “BIOPROCESS SYSTEMS ENGINEERING (BSE) APPLIED TO THE PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM SUGARCANE BAGASSE” (2008/56246-0), BIOEN FAPESP, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano, com significativos avanços no desenvolvimento do biocatalisador e no estabelecimento das condições de isomerização/fermentação (SILVA, 2013, MORAES, 2013 e AQUINO, 2013). Os estudos constataram que aproximadamente 1/3 do substrato assimilado foi convertido no

subproduto xilitol, reduzindo o rendimento em etanol a valores em torno de $0,3 \frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{\text{g}_{\text{substrato}}}$ ¹. Assim, no contexto do desenvolvimento do processo SIF, o presente trabalho pretende contribuir especificamente para o melhor entendimento do metabolismo da D-xilulose por *S. cerevisiae*, buscando identificar condições que levem a um melhor rendimento em etanol.

Assim, sendo o objetivo principal deste doutorado o estudo, de forma integrada, da produção de bioetanol a partir das duas principais fontes de açúcares fermentáveis presentes no bagaço de cana de açúcar, fração celulósica (C6) e hemicelulósica (C5), foi adotada a estrutura descrita a seguir para a presente tese.

O Capítulo 1 apresenta a “REVISÃO BIBLIOGRÁFICA”, onde são abordados os principais conceitos relacionados ao bagaço de cana, pré-tratamento e hidrólise. Apresentam-se também, neste capítulo, os conceitos mais importantes da lógica *fuzzy* e clustering, além de uma revisão relacionada ao metabolismo de xilulose em *S. cerevisiae* pela Via Pentose Fosfato (PPP – Pentose Phosphate Pathway).

No Capítulo 2, “APROVEITAMENTO DA FRAÇÃO C6 DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇUCAR” é apresentado um artigo no qual, utilizando reatores em escala de bancada operados em regime de batelada alimentada, foram avaliadas duas políticas de alimentação diferentes. A primeira política fez uso da alimentação de substrato e enzima, para sustentar altas taxas de produção de glicose. A segunda só considera a alimentação de substrato ao reator em batelada alimentada, e foi definida utilizando a teoria clássica do controle ótimo.

O Capítulo 3, “MODELAGEM CINÉTICA DE SISTEMAS COMPLEXOS: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS” descreve a criação de uma metodologia baseada num sistema “global” de cálculo de velocidades de reação para a hidrólise enzimática da fração C6 do bagaço. Essa nova metodologia incorpora modelos ajustados em distintas condições de operação, utilizando uma técnica associada à lógica nebulosa chamada técnica FCM (do inglês, “Fuzzy C-Means”).

O Capítulo 4, “ELEVADA SELETIVIDADE ETANOL/XILITOL EM LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* ADAPTADA À ASSIMILAÇÃO DE XILULOSE” apresenta a metodologia utilizada para a seleção de uma levedura potencialmente produtora de etanol a partir de uma cepa comercial de *S. cerevisiae* assim como os resultados obtidos em experimentos realizados em câmara rotativa com a linhagem selecionada.

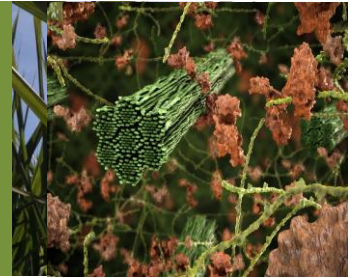
O Capítulo 5, “PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA POR *S. CEREVISIAE* ADAPTADA: INFLUÊNCIA DOS FLUXOS DE OXIGÊNIO E XILULOSE” apresenta os resultados de experimentos realizados em

biorreator, nos quais os fluxos de assimilação de D-xilulose, de produção de etanol e xilitol assim como de formação de biomassa para linhagem de *S. cerevisiae* previamente adaptada ao crescimento em xilulose, foram avaliados em condições aeróbias, anaeróbias e de limitação de oxigênio.

Compõe ainda o texto o Capítulo 6, no qual se apresentam as conclusões e sugestões para a continuidade do trabalho.

CAPÍTULO 1

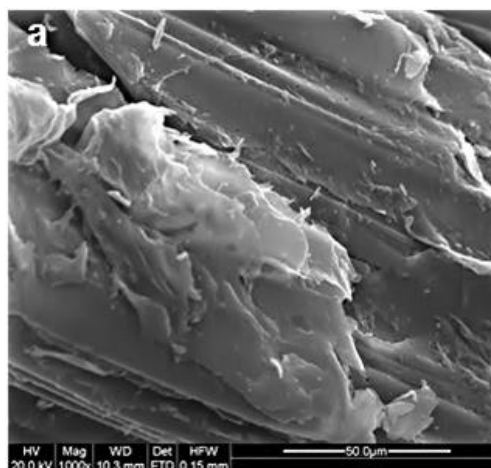
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



1.1 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo lignocelulósico que resulta do processo de produção industrial de açúcar e do etanol de primeira geração, constituído basicamente pelos polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, em proporções que variam segundo as condições climáticas, o tipo de microrganismos a que esteve exposta a cana, idade e período de coleta (RABELO, 2007; REDDY; YANG, 2005; BANERJEE; PANDEY, 2002). Segundo Banerjee e Pandey (2002) a composição química do bagaço apresenta valores de celulose entre 32-48%, hemicelulose 19-24%, lignina 23-32%, e 3,2 a 5,5 % para as cinzas. O bagaço é formado por partículas de diferentes tamanhos, com valor médio de 20 mm, contendo em torno de 50% de umidade (SCHLITTLER, 2006). A Figura 1.1 mostra a microscopia eletrônica de varredura da estrutura da fibra do bagaço.

Figura 1.1 – Estrutura microscópica do bagaço de cana de açúcar.

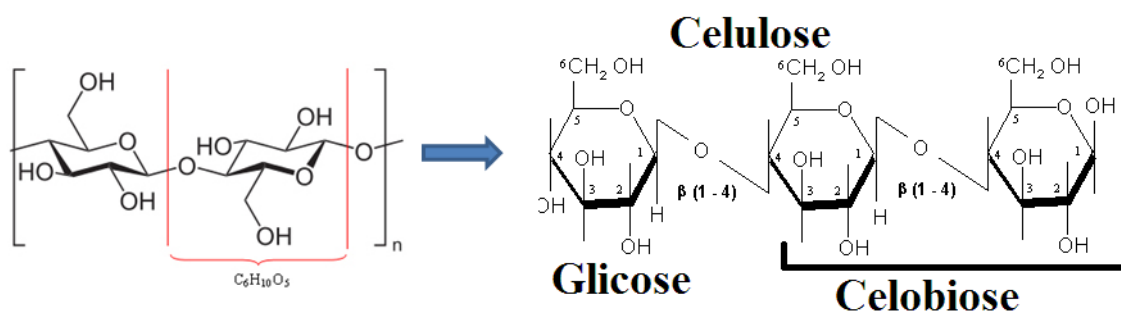


Fonte: <http://pubs.sciepub.com/jmpc/2/1/1/figure/2>

1.1.1 CELULOSE

A celulose é um polímero natural linear de cadeia longa e fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, composto por subunidades de D-glicose (β -D-glicopirranose) ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, formando moléculas de celobiose como mostra a Figura 1.2 (RABELO, 2007). A celulose pode se apresentar na forma cristalina ou amorfa. Nesta última conformação, a celulose encontra-se mais suscetível à degradação enzimática (FENGEL e WEGENER, 1989). Devido às fortes ligações presentes na sua estrutura, a celulose é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (HON, 1996).

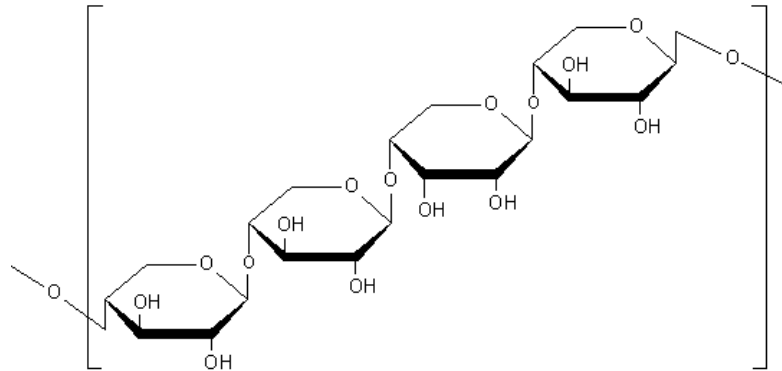
Figura 1.2 - Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cellulose_Sessel.svg

1.1.2 HEMICELULOSE

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos compostos pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses) (HOLTZAPPLE, 1993; SAHA, 2003). Ao contrário das celuloses, as hemiceluloses são amorfas, com estruturas ramificadas, o que as torna mais solúveis e mais susceptíveis à degradação enzimática. A cadeia principal da hemicelulose pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas, apresentando unidades de arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal (FENGEL; WEGENER, 1989). A xilana é o principal carboidrato encontrado em hemiceluloses, sendo composta por unidades de xilose, que se unem por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4 (RAMOS, 2003). A Figura 1.3 mostra a estrutura de uma xilana.

Figura 1.3 – Estrutura da xilana.

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis/carbohydrate-analysis-ii.html>

1.1.3 LIGNINA

A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional ramificada de natureza aromática (SILVA et al., 2009). É a substância que confere rigidez à parede das células, sendo responsável pelo seu suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano (FENGEL; WEGENER, 1989). A presença da lignina reduz a eficiência da hidrólise de materiais lignocelulósicos, devido principalmente à perda das enzimas adicionadas em função da adsorção das mesmas na lignina. Por isso, é recomendável realizar inicialmente um processo de pré-tratamento para promover a deslignificação do material. Então, para que o bagaço de cana possa ser hidrolisado mais eficientemente, é preciso que o mesmo passe primeiramente por etapas de pré-tratamento, onde ocorre a separação da celulose, hemicelulose e lignina (CAVALCANTI, 2013).

1.2 PRÉ-TRATAMENTO

Uma das prioridades de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico é a redução da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos para facilitar a liberação dos polissacarídeos por meio de processos de pré-tratamento (ZHANG et al., 2007). Para as etapas de pré-tratamento, várias metodologias têm sido propostas e desenvolvidas,

podendo-se destacar as que utilizam processos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes (SUN; CHENG, 2002).

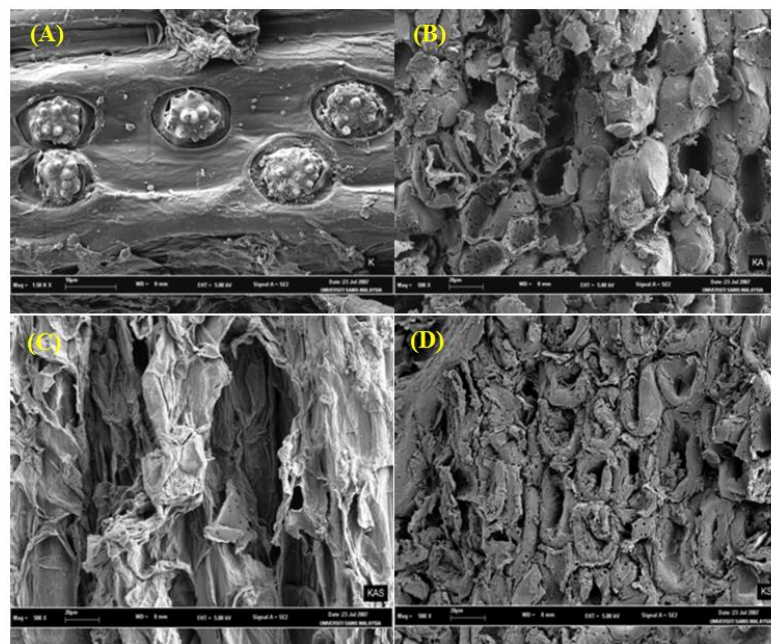
Dentre os diversos métodos existentes para realizar o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, os mais comumente utilizados são:

Termohidrólise: o processo consiste, em se colocar o material sob condições de alta temperatura e pressão, utilizando-se geralmente água quente a pressões acima do ponto de saturação para hidrolisar a hemicelulose (HAMELINCK et al.,2005).

Hidrólise ácida: neste pré-tratamento a biomassa é tratada com ácidos concentrados ou diluídos (ácido sulfúrico, clorídrico ou nítrico) para conseguir a solubilização da hemicelulose e obter uma celulose mais acessível (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Hidrólise alcalina: o pré-tratamento é conduzido com a utilização geralmente de hidróxido de sódio, amônia, ureia ou hidróxido de cálcio. Este processo requer condições de reação mais amenas quando comparado com outros tipos de pré-tratamento (RABELO, 2007). A Figura 1.4 apresenta alterações morfológicas causadas a um material lignocelulósico após vários tipos de pré-tratamento.

Figura 1.4 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) para um material lignocelulósico com diferentes pré-tratamentos: (A) Sem pré-tratamento, (B) Hidrotérmico, (C) Ácido, (D) Alcalino.



Fonte: <http://ispub.com/IJBE/4/2/11040>

Outros pré-tratamentos também comumente utilizados são: deslignificação oxidativa, explosão a vapor, AFEX (*ammonia fiber explosion*), explosão de CO₂, ozonólise e processo organosolv (GÁMEZ et al., 2006; SUN; CHENG, 2005).

Para a realização deste trabalho foi escolhida a hidrólise alcalina, realizada com hidróxido de sódio por utilizar temperaturas e pressões baixas quando comparadas com outras tecnologias de pré-tratamentos. Na hidrólise alcalina, o efeito da base depende do conteúdo de lignina no material. Durante a ativação da celulose com hidróxido de sódio, a água penetra nas fibras da biomassa provocando um inchaço das fibras, rompendo as ligações de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina, aumentando a porosidade e diminuindo a cristalinidade do material (RABELO, 2007; BALAT et al, 2008).

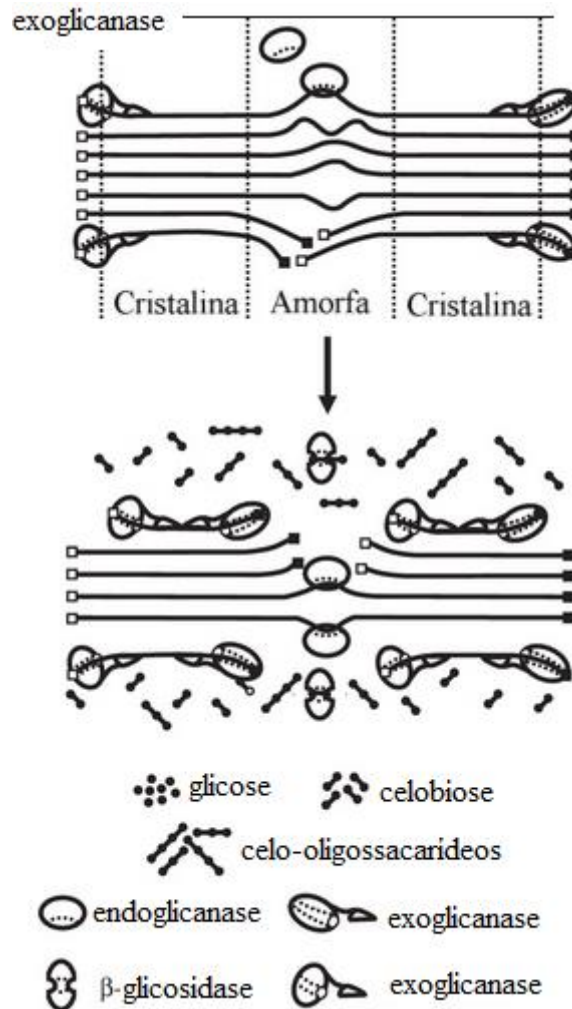
1.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CELULOSE

No processo de hidrólise enzimática, o material lignocelulósico passa primeiramente por etapas de pré-tratamento para remover parte da lignina e/ou aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Durante este processo e dependendo do pré-tratamento utilizado, a maior parte dos açúcares da hemicelulose são solubilizados. Após o pré-tratamento é necessária uma etapa de hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis. No processo enzimático, a hidrólise da celulose é catalisada por enzimas específicas denominadas de celulasas (EKLUND et al., 1990).

As celulasas são altamente específicas em relação ao substrato, reduzindo a produção de subprodutos indesejáveis durante a reação, levando assim, a uma diminuição dos custos em tratamentos complementares para remoção de produtos que podem ser tóxicos para a levedura. Estes complexos enzimáticos são produzidos principalmente utilizando fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* por fermentação submersa, sendo *Trichoderma reesei* o microrganismo mais utilizado industrialmente (WYMAN, 2003; SHEN; XIA, 2004).

As celulasas geralmente são uma mistura de várias enzimas. Pelo menos três grupos principais de celulasas estão envolvidos no processo de hidrólise da celulose (Figura 1.5):

Figura 1.5 – Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose pela endoglucanase, exo-1,4- β -glucanase (CBH) e β -glicosidase (BG). Os quadrados cheios representam as extremidades redutoras e os quadrados abertos extremidades não redutoras.



Fonte: LYND et al., 2002

As endoglucanases ou endo-1,4- β -glucanases atuam aleatoriamente ao longo da molécula de celulose, hidrolisando as ligações internas, preferencialmente da região amorfa (região de baixa cristalinidade), criando cadeias com extremidades livres, atacando interna e aleatoriamente a cadeia de carboidrato, sendo menos efetivas contra celulose cristalina (SUN; CHENG, 2002).

As celobiohidrolases, também chamadas de exo-1,4- β -glucanases, se ligam nas extremidades das cadeias geradas pelas endoglucanases. Estas conseguem hidrolisar a celulose na região amorfa, entretanto, na região cristalina, apresentam maior eficiência,

gerando principalmente celobiose (que é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose).

As β -glicosidases ou celobiasas são responsáveis por clivar a celobiose e outros celo-oligosacarídeos curtos produzidos pelas celobiohidrolases, produzindo duas moléculas de glicose (ver Figura 1.5) (THONGEKKAEW, 2008).

1.4 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

A capacidade de produção de biocombustíveis líquidos de primeira geração, produzidos principalmente a partir de alimentos de consumo da população, como cereais, açúcar e oleaginosas, se encontra limitada. O etanol de milho nos EUA e o etanol do caldo de cana de açúcar no Brasil, dentre outros, precisariam ter sua produção aumentada para atender à crescente demanda global de combustíveis, que quadruplicou entre 2000 e 2008 (SIMS et al., 2010). No entanto, biocombustíveis de primeira geração apresentam desvantagens como impacto negativo nos preços de alimentos e redução pouco significativa dos principais gases do efeito estufa (SIMAS, 2010).

Essas questões têm estimulado o interesse no desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração, produzidos a partir de biomassa não alimentar, um tema de pesquisa que tem sido bastante explorado ao longo das últimas três décadas. Essa biomassa lignocelulósica inclui subprodutos tais como palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais, dentre outros, excluindo-se do aparente dilema: combustível versus alimentos (SIMS et al., 2010).

Os combustíveis de segunda geração podem ser produzidos usando materiais lignocelulósicos via dois principais caminhos: rota bioquímica ou termoquímica. A primeira conta com enzimas e/ou microorganismos dedicados que podem quebrar celulose e hemicelulose para obter os açúcares contidos na biomassa e convertê-los em etanol. Este caminho produz “etanol celulósico”. O etanol celulósico tem um balanço de carbono excelente e pode reduzir emissões de gás carbônico em até 90% quando comparado aos combustíveis de petróleo. A rota termoquímica converte a biomassa através de processos como gasificação e pirólise rápida (BiodieselBR, 2008).

O bioetanol ou etanol celulósico produzido a partir do bagaço de cana de açúcar não concorre com a produção do etanol convencional, que é extraído do caldo, nem com a produção de açúcar. Porém, como o bagaço é usado para fornecer a energia que a usina

precisa, a concorrência direta é com o seu uso para geração de energia elétrica (BRASILAGRO, 2013).

1.5 INTELIGENCIA ARTIFICIAL EM ETANOL 2G

A inteligência artificial atualmente é uma ciência voltada para à resolução de problemas complexos em um vasto campo da pesquisa, esta técnica tem sido empregada com sucesso em diversas aplicações na área da engenharia e dos processos de produção. Uma aplicação que está perfeitamente inserida nesse contexto se refere ao processo de hidrólise de bagaço de cana para gerar etanol 2G, processo que tem como objetivo a retirada de todo o açúcar presente no material lignocelulósico para a produção de álcool, e resulta ser complexo devido as diferentes variáveis e os fenômenos envolvidos, por esta razão, buscou-se investigar o uso de ferramentas baseadas na inteligência artificial, como a lógica *fuzzy*, com o objetivo de desenvolver um interpolador que permita descrever o processo de hidrolise de forma robusta e confiável.

1.5.1 LÓGICA FUZZY (NEBULOSA)

A lógica *fuzzy* proposta por Zadeh, (1965), é uma extensão da lógica binária, admitindo valores intermediários entre 1 e 0 (e não somente 1 ou 0). A um dado elemento de um conjunto nebuloso é atribuído um grau de pertinência em relação ao conjunto. Tal grau de pertinência trata-se de valor numérico entre 0 e 1 (sendo 0 e 1 valores limites de pertinência: 0 = não e 1 = sim).

É importante, também, recuperar o conceito de variável linguística, que corresponde a variáveis descritas por valores linguísticos (conjuntos nebulosos) como “alto”, “baixo”, etc. Tome-se como exemplo uma variável linguística denominada temperatura, cujos valores linguísticos poderiam ser “baixa”, “média” e “alta”. Considerando um valor numérico de 25°C, por exemplo, poderia se dizer que 25°C é uma temperatura “baixa” com grau de pertinência 0,2, uma temperatura “média” com grau de pertinência 0,6, ou uma temperatura “alta” com grau de pertinência 0,2 (ou seja, neste exemplo 25°C estaria mais para uma temperatura “média” do que para “baixa” ou “alta”, em virtude de possuir maior grau de pertinência em relação ao conjunto “média”). Essa noção de elementos associados a um grau

de pertinência em relação a valores linguísticos (conjuntos nebulosos) de variáveis linguísticas é a noção básica de sistemas nebulosos.

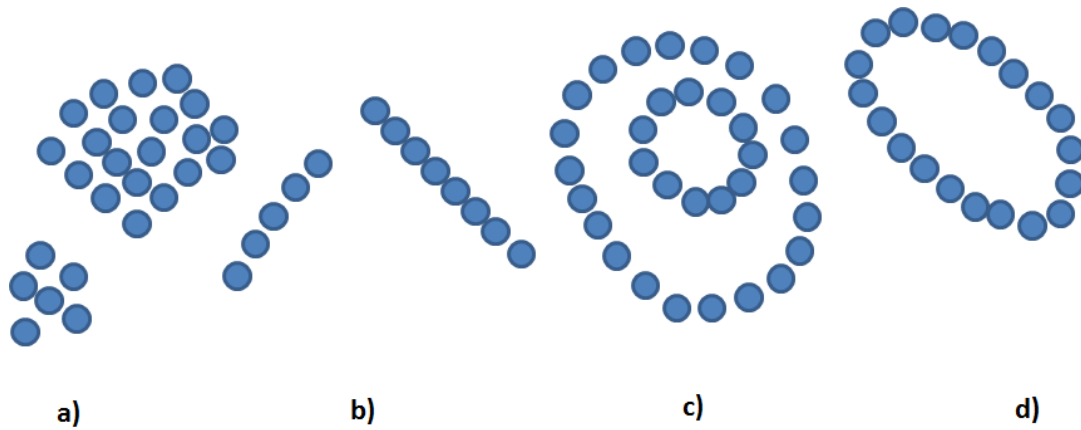
A lógica *fuzzy* tem sido aplicada em muitos campos, desde teoria de controle a áreas como entretenimento, finanças, indústria, sismologia, medicina e transporte (NUCCI, 2003). No campo da biotecnologia, como no caso dos processos fermentativos (que envolvem muitas reações biológicas que tornam o processo mais difícil de se controlar), o controle pode ser configurado pela experiência dos operadores humanos. Tal experiência pode ser descrita, geralmente, em termos de regras linguísticas (de variáveis linguísticas) do tipo “SE-ENTÃO” (HONDA; KOBAYASHI, 2004), como no seguinte exemplo: “SE a temperatura é “alta”, ENTÃO aumente o fluxo de refrigerante”.

Entre alguns trabalhos reportados na literatura sobre o uso da lógica *fuzzy* em bioprocessos, podem ser citados Sousa e Almeida (2001), que desenvolveram um algoritmo *fuzzy* para controle supervisorio de um bioreator na produção de Cefalosporina C, Horiuchi e Hiraga (1999), que aplicaram um controle *fuzzy* durante a produção em grande escala de uma vitamina recombinante (VB2) e Fonseca et al., (2013), que propuseram um controlador *fuzzy*-PI e uma estratégia de controle para regular a temperatura numa cuba de fermentação. Estes trabalhos fazem parte dos resultados bem sucedidos durante pesquisas em bioprocessos.

1.5.2 AGRUPAMENTO DE DADOS (CLUSTERING)

É uma técnica que procura fazer agrupamentos naturais de dados automaticamente, segundo seu grau de semelhança, para produzir uma representação concisa do comportamento de um sistema de dados (CHIU, 1994). Um cluster pode ser definido como um grupo de dados que são mais semelhantes entre si do que a dados pertencentes a outros grupos (Nelles, 2001). Na Figura 1.6 é possível observar alguns exemplos.

Figura 1.6 – Exemplos de diferentes formas de cluster. a) círculos cheios, b) linhas, c) círculos ocos, d) elipse oca.



O usuário deve definir que tipos de clusters serão procurados, definindo um critério de semelhança. O mais usual é considerar que esta medida de similaridade seja a distância de todos os dados até o centro do cluster. Neste caso, o centro do cluster representa o cluster e, portanto, é chamado de protótipo do cluster. Para outros critérios de similaridade, o protótipo do cluster pode ser diferente, como por exemplo, uma linha na Figura 1.6b ou um centro de círculo/elipse e seu raio nas Figuras 1.6c e 1.6d. Normalmente, o usuário deve especificar qual será o critério de similaridade e o número de clusters a serem detectados. De forma resumida, as técnicas de agrupamento podem ser distinguidas de acordo com propriedades como: tipo de variáveis às quais elas podem ser aplicadas (contínuas, inteiras, binárias); critério de similaridade; número de clusters fixo ou auto-adaptativo, partições “rígidas” ou nebulosas (Nelles, 2001).

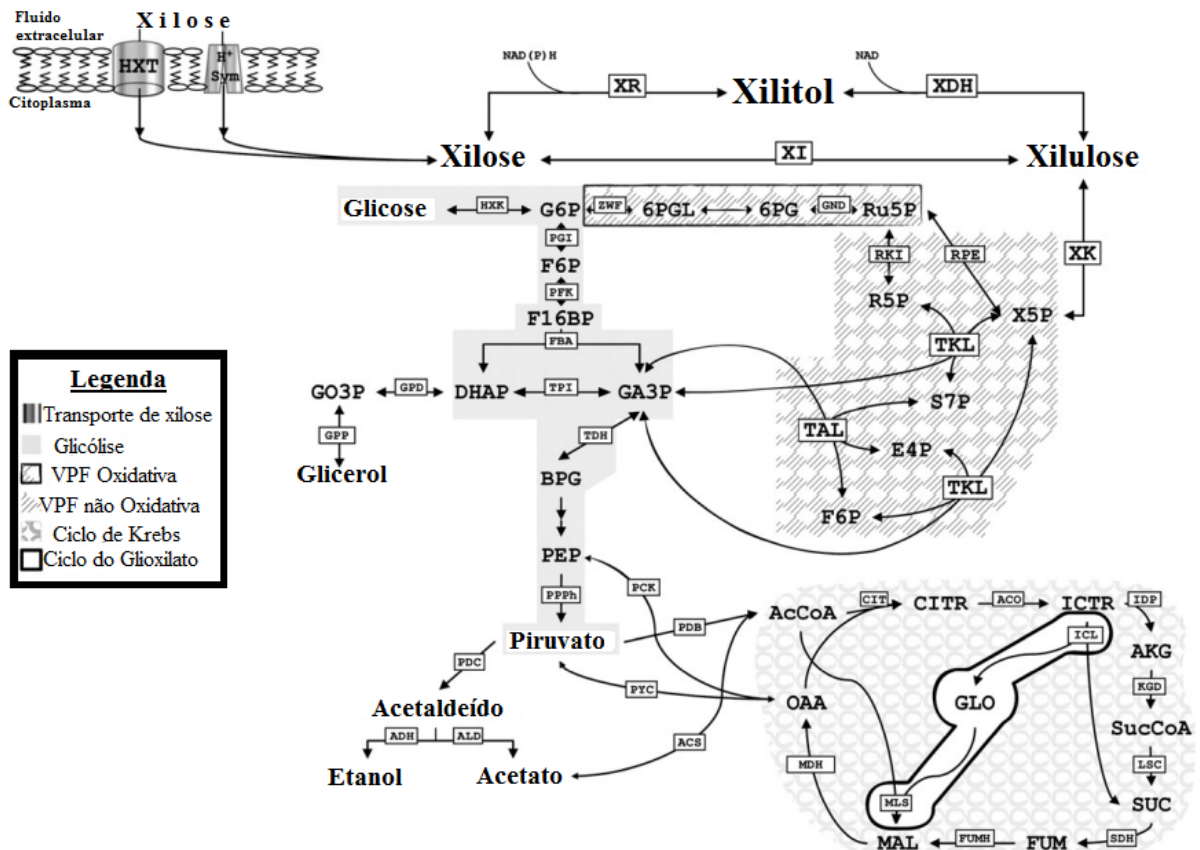
1.6 METABOLISMO DE XILULOSE EM *S. cerevisiae*

Como já foi dito anteriormente, para que a produção industrial de etanol 2G se torne economicamente viável, é de crucial importância o aproveitamento não só da fração C6 (hexoses) da biomassa lignocelulósica, mas também da fração C5 (pentoses). A principal pentose presente nos materiais lignocelulósicos é a xilose, que compreende mais de 60% dos açúcares recuperáveis derivados da hemicelulose, e pode ser fermentada em etanol por leveduras, fungos e bactérias (CHIANG et al., 1981a).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* principal microrganismo utilizado na produção industrial de etanol não é capaz de fermentar xilose. Porém, pode fermentar o seu isômero xilulose, a etanol. A isomerização é catalisada pela enzima xilose (ou glicose) isomerase que é utilizada comercialmente no processo de produção de xarope de alto teor de frutose (SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990; GONG et al. 1981).

Conforme mostra a Figura 1.7, o metabolismo da xilose em bactérias começa pela ação da enzima xilose isomerase, convertendo D-xilose em D-xilulose. Posteriormente, a D-xilulose é fosforilada pela ação da enzima xiluloquinase, gerando D-xilulose-5-fosfato, a qual é metabolizada pela via das pentoses (HAHN-HÄGERDAL; PAMMENT, 2004). Já em leveduras e demais organismos eucariotos (Figura 1.7), a conversão de D-xilose a D-xilulose ocorre em duas etapas: primeiro D-xilose é reduzida a D-xilitol, pela enzima xilose redutase. Em seguida, D-xilitol é oxidado a D-xilulose, pela enzima xilitol desidrogenase. Da mesma forma que em bactérias, a D-xilulose é fosforilada pela ação da enzima xiluloquinase, gerando D-xilulose-5-fosfato (PITKÄNEN et al., 2003). A D-xilulose-5-fosfato é metabolizada na via pentose fosfato não oxidativa, ingressando na via glicolítica até o piruvato. Em anaerobiose, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase a acetaldeído, que é então reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. Já em aerobiose, piruvato é oxidado em vários produtos através do ciclo de Krebs, na cadeia respiratória (ver Figura 1.7) (PITKÄNEN et al., 2003, CHU e LEE, 2007).

Figura 1.7 – Rotas do metabolismo da D-xilose e da D-xilulose em leveduras.



Fonte: HAHN-HÄGERDAL et al., 2004.

Chiang et al. (1981a) constataram que *S. cerevisiae* e outras leveduras fermentativas produzem etanol, xilitol e glicerol a partir de D-xilose e D-xilulose, indicando que estas leveduras possuem as enzimas responsáveis pela oxidorredução de pentoses.

Jeppson et al. (2002) explicaram que uma das principais causas da excreção de xilitol é um desequilíbrio redox provocado pelas duas primeiras enzimas da rota do metabolismo de xilose (xilose redutase e xilitol desidrogenase) que possuem cofatores diferentes, redutases com preferência por NADPH e desidrogenases que utilizam apenas NAD⁺.

Senac e Hahn-Hägerdal (1990) realizaram cultivos anaeróbios de *S. cerevisiae* em batelada usando glicose ou xilulose como fontes de carbono, obtendo concentrações celulares de 0,74 e 0,37 g_{MS}.L⁻¹, respectivamente, e taxa de consumo de açúcar de 3,94 mmol.g_{MS}⁻¹.h⁻¹ para a glicose e 0,39 mmol.g_{MS}⁻¹.h⁻¹ para xilulose. Os autores relataram que nos

cultivos usando glicose, o balanço de carbono fechou, enquanto que nos cultivos usando xilulose, em torno de 25% do carbono consumido não pôde ser contabilizado. Yu et al. (1995) explicaram que o carbono não contabilizado foi provavelmente perdido como dióxido de carbono na via das pentoses fosfato, uma vez que não foram detectados outros compostos carbônicos nas análises de HPLC, e não foi observada nenhuma perda notável de etanol por meio de evaporação ou de oxidação. O trabalho relata também, que sob a limitação de oxigênio, o carbono não contabilizado aumenta de 50% a 65%. A atividade aumentada da cadeia respiratória gera dióxido de carbono adicional em comparação com a fermentação anaeróbica.

Jeppsson et al. (1996) cultivaram *S. cerevisiae* em quimiostato sob condições anaeróbicas usando como substrato glicose e uma mistura de glicose/xilulose. A co-utilização de xilulose foi acompanhada por formação de etanol, acetato e arabitol. A atividade da enzima xiluloquinase estava ausente durante o metabolismo em glicose, mas foi detectada durante a utilização simultânea de xilulose e glicose.

1.7 ENGENHARIA EVOLUTIVA

A evolução é o conjunto de transformações biológicas ou mudanças das características hereditárias de populações ao longo de gerações sucessivas. Os processos evolutivos dão origem à diversidade em todos os níveis de organização biológica, incluindo espécies, organismos e moléculas como o DNA e as proteínas (KUTSCHERA; NIKLAS 2004). Segundo Klipp et al. (2009) a evolução é um processo aberto, sem uma meta pré-definida e que não necessariamente leva aos fenótipos desejados. No entanto, muitas características dos seres vivos se assemelham a um ideal teórico ou a uma solução hipotética que um engenheiro iria projetar.

Nas últimas duas décadas, a biologia evolutiva tornou-se uma ferramenta útil e de grande importância, sendo agora fundamental no rastreamento de doenças e identificação de espécies em ambientes médicos, farmacológicos ou de conservação (BULL; WICHMAN, 2011). Assim, a engenharia evolutiva torna-se uma estratégia interessante que pode auxiliar na obtenção de novas linhagens de levedura, melhorando a eficiência de estes microrganismos na produção de etanol 2G a partir de fontes lignocelulósicas, as quais são ricas em pentoses como xilose e arabinose.

Um exemplo da aplicação da engenharia evolutiva na produção de etanol é o trabalho realizado por Kuyper et al. (2005), no qual uma linhagem de *S. cerevisiae* modificada geneticamente foi cultivada em quimiostato prolongado sob condições anaeróbias, obtendo uma estirpe que apresentava melhores taxas de consumo de glicose e xilose, e, um aumento na capacidade de transporte (V_{max}) e na constante de afinidade para xilose (K_m), quando comparada com a linhagem inicial.

Wisselink et al. (2009) realizaram fermentações com uma linhagem de *S. cerevisiae* modificada geneticamente, utilizando três diferentes tipos de misturas como substrato (glicose/xilose/arabinose, xilose/arabinose e só arabinose). A estratégia utilizada consistia em bateladas repetidas com repetidos ciclos de crescimento, o que permitiu obter uma linhagem com melhores taxas específicas de consumo de xilose e arabinose, além de reduzir em até 40% o tempo de cultivo.

Sanchez et al. (2010) aplicaram as técnicas da engenharia evolutiva em cultivos em quimiostato, sob condições aeróbias e anaeróbias, usando xilose/arabinose como fonte de carbono, durante 400 h, para evoluir uma cepa de *S. cerevisiae* modificada geneticamente, conseguindo aumentar a taxa de consumo de xilose e arabinose e melhorar a produção de etanol.

Cadière et al. (2011) realizaram bateladas de longa duração usando gluconato como fonte de carbono. Gluconato é um substrato de difícil assimilação pela *S. cerevisiae*, sendo metabolizado pela via das pentoses fosfato. Linhagens que evoluíram, apresentando maior capacidade de consumo do gluconato foram selecionadas. Uma análise dos fluxos metabólicos com glicose marcada revelou um aumento de 6% na via das pentoses fosfato na cepa evoluída, além de outras alterações metabólicas como: redução na produção de acetato, aumento nas taxas de fermentação e na produção de compostos de aroma. Características que combinadas representam um valor agregado na vinificação moderna.

Sonderegger e Sauer (2003) aplicaram a engenharia evolutiva para a seleção de uma linhagem de *S. cerevisiae* modificada geneticamente capaz de crescer eficientemente sob condições anaeróbias. Para isto, foi necessário realizar uma adaptação lenta, na qual foram realizados cultivos em quimiostato inicialmente sob condições microaeróbias, e posteriormente novas linhagens da levedura foram submetidas a condições anaeróbias. Este procedimento totalizou 260 gerações de seleção, sendo um forte indicativo das múltiplas mutações necessárias para obter um novo fenótipo.

Dragosits et al. (2013) realizaram experimentos de evolução adaptativa em laboratório (EAL) e suas aplicações na biotecnologia. A EAL é uma metodologia usada em

estudos biológicos para obter informações sobre os mecanismos da evolução e as mudanças adaptativas acumuladas em populações microbianas durante a seleção em longo prazo sobre condições de crescimento especificadas. Um fator importante durante a procura por novos fenótipos é o intervalo de tempo para o experimento de seleção. Na Figura 1.8, é possível observar diferentes experiências de EAL realizadas entre 100 e 2000 gerações, trabalho que toma geralmente algumas semanas ou até alguns meses.

Tabela 1.1 – Experimentos de evolução adaptativa em laboratório com leveduras.

Espécie, linhagem	Tipo de cultivo	Tempo de seleção	Referencia
Limitação por Nutriente			
<i>S. cerevisiae</i>	Quimiostato (limitação de glicose)	250 gerações	Ferea et al., 1999
<i>S. cerevisiae</i>	Quimiostato (limitação de glicose)	500 gerações	Duham et al., 2002
<i>S. cerevisiae</i> capable	Quimiostato (meio mínimo, anaeróbio, xilose)	170 gerações	Sonderegger and Sauer, 2003
<i>S. cerevisiae</i>	Quimiostato (limitação de maltose)	➤ 25 gerações	Jansen et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i> CEN PK ΔPDC156	Quimiostato e shaker (meio sintético, independência C2)	Nd	Jansen et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i>	Quimiostato (limitação de glicose)	200 gerações	Jansen et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i> RWB 217	Quimiostato e batelada (xilose)	Nd	Kyuper et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i>	Arabinose, meio sintético	3500 horas	Wisselink et al., 2007
<i>S. cerevisiae</i>	Quimiostato e bateladas sequenciais (glicose, xilose e arabinose)	40 dias	Wisselink et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> DBY11331	Quimiostato (limitação de sulfato)	188 gerações	Araya et al., 2010
<i>S. cerevisiae</i> TMB3061	Quimiostato (meio sintético, xilose e arabinose)	20 a 65 gerações	Garcia Sanchez et al., 2010
<i>S. cerevisiae</i> CEN-PK	Galactose, meio mínimo	400 gerações	Hong et al., 2011
<i>S. cerevisiae</i> CEN.JB27 ΔPYC1	Meio mínimo, seleção de crescimento em glicose	Nd	Zelle et al., 2010
<i>S. cerevisiae</i> , sfca* Pyc	Quimiostato e batelada (limitação de nitrogênio)	30 dias	Zelle et al., 2011
<i>S. cerevisiae</i> SC288	Limitação de glicose	100 gerações	Wenger et al., 2011

<i>S. cerevisiae</i>	Fermentação em xilose	Nd	Shen et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i>	Quimiostato e batelada (uso de xilose, produção de etanol)	120 gerações	Zhou et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i> CMB.GSOD1	Cultivo aeróbio em xilose	10 ciclos	Scalcinati et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i> Δjen1	Meio mínimo, lactato.	10 transferências	De Kok et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i>	Meio YNB, tolerância a hidrolisados lignocelulósicos	463 gerações	Almario et al., 2013
Condição ambiental de estresse			
<i>S. cerevisiae</i> CEN-PK	Quimiostato e batelada (múltiplos abiotic estresse)	> 68 gerações	Cakar et al., 2005
<i>S. cerevisiae</i> CEN-PK	Contínuos pulsos de CoCl ₂	256 transferências	Cakar et al., 2009
<i>C. albicans</i>	Fluconazole	330 gerações	Seimeckl et al., 2009
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	Meio YP Galactose 0,5 M NaCl	300 gerações	Dhar et al., 2011
<i>S. cerevisiae</i> BL7	Meio YP, 0 – 25 g.L ⁻¹ CuSO ₄	Nd	Adamo et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i>	Meio SD, 1,17% NaCl, 37 °C	25 gerações	Gray and Goddard 2012
<i>S. cerevisiae</i> W303	Meio YP, 6- 8% de etanol	14 gerações	Avrahami;Moyal et al., 2012
<i>S. cerevisiae</i>	Sais e estresse oxidativo	300 gerações	Dhar et al., 2013
Miscellaneous			
<i>S. cerevisiae</i> Amyol	Estresse cytokinesis lactato.	Nd	Rancati et al., 2008
<i>S. cerevisiae</i> EC1118	Meio SD, gluconato e propriedades enological	240 gerações	Cadiere et al., 2011, 2012

Fonte: DRAGOSITS et al., 2013.

Em resumo, a engenharia evolutiva ou a EAL é uma técnica que pode ser aplicada para melhorar a diversidade e as propriedades das espécies microbianas, como por exemplo, o uso de diferentes substratos, tolerância a maiores concentrações de etanol ou de inibidores e ainda temperatura mais altas, trazendo várias vantagens para a Engenharia de Bioprocessos, assim como avanços significativos na obtenção de produtos pelas chamadas “fábricas de células microbianas”.

Finalmente, a maioria dos estudos encontrados na literatura utilizando engenharia evolutiva, foi realizado empregando linhagens de *S. cerevisiae* modificadas geneticamente. Ainda não foram reportados estudos sobre engenharia evolutiva usando cepas

de *S. cerevisiae* selvagens e tendo xilulose como fonte de carbono para melhorar a produção de etanol 2G, sendo este um aspecto explorado no presente trabalho.

CAPÍTULO 2 APROVEITAMENTO DA FRAÇÃO C6 DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR



Neste capítulo é apresentado um artigo no qual são descritas duas formas de operação de reatores de hidrólise de celulose – sequência de bateladas simples e batelada alimentada – esta última compreendendo duas políticas de alimentação diferentes. Estas políticas foram desenvolvidas com base em equações cinéticas simples, validadas usando reatores em escala de bancada. A primeira política fez uso da alimentação de substrato e enzima, para sustentar altas taxas de produção de glicose. O equacionamento inclui um modelo cinético de Michaelis-Menten pseudo-homogêneo, com inibição pelo produto. A segunda estratégia, por sua vez, considerou somente a alimentação de substrato ao reator em batelada alimentada, e foi definida utilizando a teoria clássica do controle ótimo. As simulações das estratégias de alimentação descritas neste capítulo foram realizadas pela doutoranda em Engenharia Química do PPG-EQ/UFSCar, Inti Doraci Cavalcanti Montano, utilizando o software MATLAB. Para maiores detalhes de como foram obtidos os perfis de alimentação Cavalcanti (2013).

**Artigo: POLÍTICAS OPERACIONAIS ÓTIMAS EM REATOR PARA A
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Artigo publicado na Revista Bioenergy Research, editada por Springer Science+Business Media.

**OPTIMAL BIOREACTOR OPERATIONAL POLICIES FOR THE ENZYMATIC
HYDROLYSIS OF SUGAR CANE BAGASSE**

**Inti Doraci Cavalcanti-Montaña, Carlos Alberto Galeano Suarez, Ursula Fabiola
Rodríguez-Zúñiga, Raquel de Lima Camargo Giordano, Roberto de Campos Giordano
and Ruy de Sousa Júnior***

Department of Chemical Engineering – Federal University of São Carlos

Rod. Washington Luís – Km 235 – CEP 13565-905 – CP 676 - São Carlos/SP – Brazil

Phone: +(55) (16) 3351 8713, Fax: +(55) (16) 3351-8266

* ruy@ufscar.br

ABSTRACT

The consolidation of the industrial production of 2nd generation (2G) bioethanol relies on the improvement of the economics of the process. Within this general scope, this paper addresses one aspect that impacts the costs of the biochemical route for producing 2G bioethanol: defining optimal operational policies for the reactor running the enzymatic hydrolysis of the C6 biomass fraction. The use of fed-batch reactors is one common choice for this process, aiming at maximum yields and productivities. The optimization problem for fed-batch reactors usually consists in determining substrate feeding profiles, in order to maximize some performance index. In the present control problem, the performance index and the system dynamics are both linear with respect to the control variable (the trajectory of substrate feed flow). Simple Michaelis-Menten pseudo-homogeneous kinetic models with product inhibition were used in the dynamic modeling of a fed-bath reactor, and two feeding policies were implemented and validated in bench-scale reactors processing pre-treated sugarcane bagasse. The first approach applied classical optimal control theory. The second policy was defined with the purpose of sustaining high rates of glucose production, adding enzyme (Accellerase® 1500) and substrate simultaneously during the reaction course. A methodology is described,

which used economical criteria for comparing the performance of the reactor operating in successive batches and in fed-batch modes. Fed-batch mode was less sensitive to enzyme prices than successive batches. Process intensification in the fed-batch reactor led to glucose final concentrations around 200 g.L⁻¹.

Keywords: enzymatic hydrolysis; cellulose; bagasse; sugar cane; bioreactor; fed-batch.

NOMENCLATURE

D is the dilution F_{feed}/V (min⁻¹)

e is enzyme concentration (g.L⁻¹);

e_{accumulated} is enzyme accumulated in the reactor (FPU);

e_{feed} is enzyme to be added into the reactor (FPU);

F_{feed} is substrate feeding flow rate (L.min⁻¹);

f_i is process cash flow (US\$);

f_{i2} is process cash flow per kg of treated bagasse (US\$/kg bagasse treated);

H is the Hamiltonian;

J is the performance index;

k is the rate constant of cellulose hydrolysis (min⁻¹);

k_i is a (competitive) glucose inhibition constant (g.L⁻¹);

k_m is the Michaelis-Menten constant (g.L⁻¹);

M_{accumulated} is accumulated mass of bagasse consumed (g);

P is the product concentration (g.L⁻¹);

P₀ is the initial product concentration (g.L⁻¹);

r is reaction rate (g.L⁻¹.min⁻¹);

r_{initial} is initial reaction rate (g.L⁻¹.min⁻¹);

S is cellulose (transformed in potential product concentration) (g.L⁻¹);

S_{feed} is substrate concentration in the feed (g.L^{-1});

S_0 is the initial potential product concentration (g.L^{-1});

t is time (s, min or h);

t_0 is initial time (s, min or h);

t_f is final time (s, min or h);

u is control variable;

V is reaction volume (L);

V_0 is initial reaction volume (L);

x is state variable;

X is substrate conversion.

λ is Lagrange multiplier.

INTRODUCTION

Cellulosic residues (among them sugar cane bagasse) have an important positive feature as raw materials for liquid biofuels: they do not impact significantly the “food *versus* fuels” competition. An example is the production of second generation (2G) bioethanol from sugar cane bagasse by the biochemical route, via the enzymatic hydrolysis of the biomass.

Sugar cane bagasse is a byproduct from the sugar and alcohol industry in Brazil. It consists of particles having a mean size of 20 mm, containing approximately 40% of the cane mass and humidity around 50% [1]. The bagasse composition depends on weather conditions and on the type of microorganisms to which the cane was exposed in the field. Banerjee and Pandey [2] report that sugarcane bagasse contains 32-48% of cellulose, 19-24% of hemicellulose, 23-32% of lignin and 3.2 to 5.5% of ash.

The enzymatic hydrolysis of the cellulose present in the bagasse stems (the biomass C6 fraction) is due to the synergistic action of three groups of enzymes [3-4]. Endoglucanases (or endocellulases) randomly attack amorphous regions within the polymeric chain, releasing reducing and non-reducing ends. These are then attacked by exocellulases or cellobiohydrolases (which are classified as of type I or II, as they attack reducing or non-

reducing ends), releasing cellobiose. This, ultimately, has its β -1 \rightarrow 4 bonds hydrolyzed by β -glucosidase. This process is extremely complex, and is affected by several factors: inhibitory effects by the products, non-productive adsorption of the enzyme, mainly on the lignin still present after the pretreatment, resistance to mass transport, steric and "jamming" effects [5-6], among others. Thus, the kinetic modeling of the process is far from trivial, as described in Sousa Jr et al. [7]. Many kinetic models have been developed for the enzymatic hydrolysis of cellulose, but few are currently used in optimization or process control. Engineering practice for design and optimization has been based mainly on different empirical and semi-empirical approaches (non-mechanistic and semi-mechanistic models), including simple kinetic equations. Pseudo-homogeneous models, with two or three parameters, are frequently applied. They describe in very a simplified way the phenomena occurring in this complex system, but may show a good adherence to experimental data [7].

Cellulose hydrolysis using high loads of solids is an attractive alternative, reducing operation costs and water demands, and increasing the concentration of product [8]. Besides, the reduction of the impact of enzyme costs is still an important issue for the feasibility of the 2G-biochemical route, despite the recent progress towards cheaper enzyme cocktails.

Fed-batch reactors may minimize process costs. Yields and productivities may be increased using rational feed policies of substrates and catalysts to the reactor. Hodge et al. [9] developed an optimization strategy for cellulose hydrolysis for solid percentages higher than 15%, when inefficient stirring and mixing in tank reactors may become a problem. Starting from a previously developed model for batch operation [10], and considering modifications to account for effects of feeding in fed-batch operation, a feeding policy (profile) was developed (based on optimal control theory) to maintain the insoluble solids concentration at a manageable level. Therefore, sugar concentration within the tank reactor may be increased without using a high initial load of insoluble solids.

In the work by Morales-Rodríguez et al. [11], three different feedback (PI) control strategies were developed and evaluated using a first-principles model of the hydrolysis process. A (re-calibrated) model of Kadam et al. [10] was used to test the performance of three control strategies.

In Chandra et al. [12], fed-batch hydrolysis experiments were conducted under the same conditions as batch hydrolysis with the exception that four loads of pre-treated substrates were added to the hydrolysis reaction at various specified times as opposed to adding all the substrate at the beginning of the reaction. All enzyme was added at the

beginning of the reaction. Accessibility is a key factor governing the ability of the cellulases to catalyze the hydrolysis, and addition of a xylanase resulted in significant improvements in both hydrolysis yields and measured accessibility. The authors conclude that addition of ancillary enzymes or use of pretreatments that create more accessible substrates are required for an efficient hydrolysis at low enzyme loadings and high loads of solids.

More recently, Gupta et al. [13] carried out enzymatic hydrolyses at elevated solid loads (up to 20% w/v). A fed-batch strategy was implemented to enhance the final sugar concentration to 127 g.L⁻¹. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysates were fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production of 34.78 g.L⁻¹ and 52.83 g.L⁻¹, respectively, were achieved.

In this work, two different feeding policies were designed, based on simple kinetic equations, and validated using bench-scale reactors. The first one feeds only the substrate to the semi-continuous reactor, and was defined using classical, off-line optimal control theory (here called policy P#1). The second policy (P#2) made use of both substrate and enzyme feeding, for sustaining high rates of glucose production.

Cash flows for these two strategies were assessed and compared with a series of sequential batches (policy P#3), taking into account the costs of the feedstock, of the catalyst and the prices of ethanol (in 2012, in Brazil). The methodology allowed evaluation of the best operational mode of the reactor (batch *versus* fed-batch) using this metrics, for different scenarios with respect to the price of the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Enzyme and substrate

The commercial complex of cellulases Accellerase ® 1500, from *Trichoderma reesei*, donated by Genencor ® (Palo Alto, CA), was used. According to the manufacturer, this complex contains multiple enzymatic activities, different exoglucanases and endoglucanases, beta-glucosidase and a hemicellulase, too. This complex has its best operational stability between 50-65 °C and pH 4.0- 5.0. However, in long term assays, 50 °C is a better choice to minimize temperature inactivation. To determine the complex overall activity, the method of total reducing sugars (TRS) was applied, making use of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and Whatman filter paper No. 1 [14-16].

Steam exploded sugar cane bagasse was donated by the Center for Sugarcane Technology (CTC – Piracicaba/SP).

Pretreatment procedures

Steam exploded bagasse was washed using a ratio of 1:20 (dry bagasse:boiling H₂O). Next, delignification was sought using a ratio of 1:20 (dry bagasse:NaOH solution 4 % w/w), in autoclave for 30 min, at 1 atm and 121 °C. After the removal of lignin, the remaining solid was thoroughly washed with hot water, being the last wash carried out with 50 mM citrate buffer, pH 4.8. Table 2.1 shows the characterization of samples of steam exploded bagasse before and after the pretreatment with NaOH. The analytical methodology for sugarcane bagasse was developed by Rocha et al. [17] and validated by Gouveia et al. [18].

Table 2.1 - Characterization of pretreated sugarcane bagasse.

Samples	Cellulose %	Hemicellulose %	Lignin %	Ashes %
Steam exploded Sugarcane bagasse	52.24	4.23	34.36	5.88
Steam exploded sugarcane bagasse, treated with 4 % NaOH	70.12	3.79	19.32	4.25

Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse

Hydrolysis experiments were carried out in 200 mL-bench-scale jacketed reactors, with mechanical stirring (Rushton impeller). Experiments were carried out in batch and fed-batch modes (with feeding policies detailed in the subsection “reactor modeling and optimization”). Initially (at the start-up of each run) 0.39 g of the enzymatic extract Accellerase® 1500 was added to each batch assay and into the P#2 fed-batch process (both in 37.3 mL of sodium citrate buffer, 50 mM, at pH 4.8). For fed-batch with optimal control theory (in this case, only substrate feeding), 3.67 g of the same enzyme complex was initially

added into the reactor (also in sodium citrate buffer). Pre-treated wet bagasse (15.56 g, with 82% of humidity, i.e., 12.7 g of liquid phase), containing 70% of cellulose (see Table 2.1), corresponding to a potential glucose concentration of $44 \text{ g}_{\text{potential_glucose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solution}}$ (in the reactor), was initially supplemented to the systems. Samples were collected from the supernatant for glucose analysis. Figure 2.1 shows the experimental setup.

Figure 2.1 – Experimental apparatus for enzymatic hydrolysis.

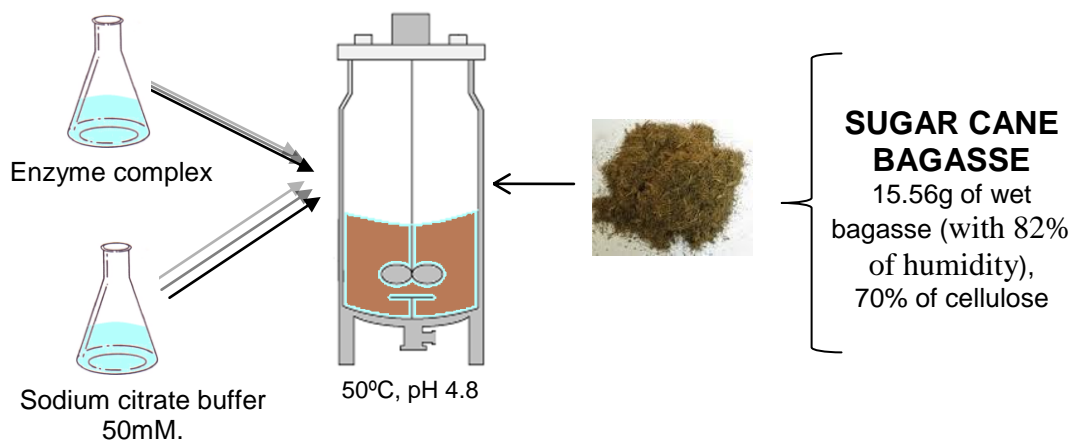


Table 2.2 summarizes the added enzyme and substrate for the three cases (P#1, P#2 and P#3). As one can see, final volumes for P#1 and P#2 were higher than the total capacity of one single bench-scale reactor. At this point, it must be explained that before the maximum capacity of one single reactor was achieved, the reaction medium was homogeneously divided (to avoid reactor flooding) into more than one single reactor (operating under the same conditions, off course).

Table 2.2 - Added enzyme and substrate for P#1, P#2 and P#3.

Feed Policy	Initial enzyme Added	Total enzyme added	Initial substrate added (cellulose transformed into potential glucose, g)	Total substrate added (cellulose transformed into potential glucose, g)	Initial Volume (L)	Final Volume (L)
	(g)	(g)				
P#1 ^a	3.67	3.67	2.2	77.5	0.05	0.36
P#2 ^a	0.39	3.67	2.2	54.4	0.05	0.25
P#3 ^b	0.39	3x0.39	2.2	3x2.2	0.05	3x0.05

- a. Eight days of reactor operation
- b. Three batches of two days, two cleaning days

Sugar quantification

Glucose and cellobiose were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Shimadzu SCL-10A chromatograph with detection by refractive index Shimadzu RID-10A, column Aminex HPX-87H (300×7.8 mm, Bio-Rad) with 0.005 mol.L⁻¹ H₂SO₄ as mobile phase, at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ and oven temperature of 45°C.

BIOREACTOR MODELING AND OPTIMIZATION

The optimization problem for fed-batch reactors usually consists in determining substrate feeding profiles, in order to maximize some performance index. In optimal control theory [19], when the performance index and the system dynamics are both linear with respect to the control variable, the problem either results in bang-bang control or in a singular arc (intermediate) control.

Here, a simple Michaelis-Menten (MM) kinetic model with product inhibition, from Carvalho et al. [20], was applied for the dynamic modeling of the fed-batch reactor (as shown in equations 2.1a-2.1d).

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_{feed} \cdot S_{Feed}}{V} - r - \frac{F_{feed} \cdot S}{V} \quad (2.1a)$$

$$\frac{dP}{dt} = r - \frac{F_{feed} \cdot P}{V} \quad (2.1b)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{feed} \quad (2.1c)$$

With

$$r = \frac{k_e \cdot S}{km \cdot (1 + \frac{P}{ki}) + S} \quad (2.1d)$$

Two feeding policies were defined in this work, and validated using bench-scale reactors. The first policy, P#1, predicts feeding of substrate but not of enzyme, and was defined using classical optimal control theory. The application of optimal control theory to our case leads to the set of equations that follows:

$$\frac{d\underline{x}}{dt} = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), t) = \dot{\underline{x}} = \underline{f}'(\underline{x}) + \underline{g}(\underline{x}) \cdot u \quad (2.2a)$$

Where

$$f' = \begin{bmatrix} -r \\ r \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$g = \begin{bmatrix} (S_{feed} - S) \\ -P \\ V \end{bmatrix}$$

$$x = \begin{bmatrix} S \\ P \\ V \end{bmatrix}$$

$$u = D = F_{feed} / V$$

The inequality constraints are

$$u_{min} \leq u \leq u_{max} \text{ (with } u_{min} = 0 \text{ and } u_{max} = F_{feed\ max} / V \text{)}.$$

The initial conditions are

$$x(0) = \begin{bmatrix} S_0 \\ P_0 \\ V_0 \end{bmatrix}$$

The performance index is minimized at a fixed final time:

$$J = -P(tf) - X(tf) \tag{2.2b}$$

Where X (tf) is the substrate conversion at the final time, see Appendix A for the formulation of the problem.

In the present case, the singular arc does not exist, and then the only optimal control solution was a bang-bang strategy. Solving numerically the two-point boundary value problem encompassing the ordinary differential equations (in time) for the state (equations 2.1a-2.1c) and co-state variables (equations A10), it is possible to determine the moment to switch the feed mass flow $u(t)$ between u_{min} and u_{max} .

The rationale behind the second feeding policy, P#2, was to pursue high rates of glucose production throughout the run, with the simultaneous addition of enzyme and

substrate during the reaction course (equations 2.3a-2.4). Extra enzyme must be loaded in order to compensate the inhibition of the old enzyme during the reaction course. At this point, it must be stressed that the reaction rate used to describe the kinetic behavior of the system (equation 2.1d) does not consider all the mechanisms that contribute for reducing the concentration of active enzymes in the system. In fact, the ineffective adsorption of enzyme on lignin, jamming effects (overcrowding of enzymes on the substrate matrix), inhibition by cellobiose, thermal inactivation of the enzymes, none of these phenomena are explicitly considered in the kinetic model. More than that, all enzymes of the pool are grouped in only one (pseudo)-catalyst. All these phenomena are nonetheless lumped in the constants of equation 2.1d, a pseudo-homogeneous model, and the significant point is that this simplified approach provided a good adherence to the experimental data. The model parameters were re-tuned using batch runs, and the acceptable accuracy of the model predictions for the fed-batch assays (see the results section) can be considered a positive validation test for this approach.

Policy P#2 is defined by the following equations:

$$e_{feed} = e.V.108 - e_{accumulated} \quad (2.3a)$$

$$e = \frac{r_{initial}.km.(1 + \frac{P}{ki}) + S_0}{k.S_0} \quad (2.3b)$$

$$F_{feed} = \frac{r.V}{S_{feed} - S_0} \quad (2.4)$$

Equations 2.3a-2.3b present the law to add additional quantities of enzyme, e_{feed} , to maintain a high reaction rate (close to $r_{initial}$) as the reaction proceeds, despite the formation of enzyme inhibitor (the product P). In equations 2.3a-2.3b, the dimension of the enzyme concentration in the reactor (necessary to maintain r close to $r_{initial}$), e , is $g.L^{-1}$; the dimension of enzyme to be added into the reactor, e_{feed} , is FPU (Filter Paper Unit). Therefore, “ e ” should be multiplied by the reactor volume, V , and by 108 (since 1 g of our enzyme complex is equivalent to 108 FPU). Besides, from the term “ $e.V.108$ ” in equation 2.3a, it is necessary to subtract the enzyme already fed ($e_{accumulated}$) at the moment in consideration.

Equation 2.4, in turn, shows the substrate feeding flow rate, F_{feed} . It is calculated as a function of the rate of consumption of substrate, r (aiming that $dS/dt = 0$, i.e., the substrate is replaced as it is consumed).

RESULTS AND DISCUSSION

Initially, a validation of the Michaelis-Menten model with product inhibition from Carvalho et al. (in press) was done, using fresh experimental data obtained in batch mode. It is noteworthy that Michaelis-Menten parameters ($k_e = 0.105 \pm 0.015 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $k_m = 8.78 \pm 4.89 \text{ g.L}^{-1}$ and $k_i = 3.34 \pm 1.30 \text{ g.L}^{-1}$) from Carvalho et al. [20] were obtained from assays in flasks under orbital shaking. In this work, the models are used for the optimization of the operation of bench-scale reactors with impeller systems. Therefore, manual fine-tuning of some model parameters was tried. However, a good fit was obtained with parameters very similar to those from Carvalho et al. [20]. Figure 2.2 presents the results.

Figure 2.2 – Comparison of experimental and simulated data of batch operation. Michaelis-Menten with inhibition parameters: $k_e=0.112 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $k_m=15 \text{ g.L}^{-1}$ and $k_i=4.5 \text{ g.L}^{-1}$. Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50°C , pH 4.8, initial enzyme concentration $e(0) = 7.8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842.4 \text{ FPU.L}_{\text{solution}}^{-1}$ and initial potential glucose concentration of $44 \text{ g}_{\text{potential_glucose.L}_{\text{solution}}^{-1}}$.

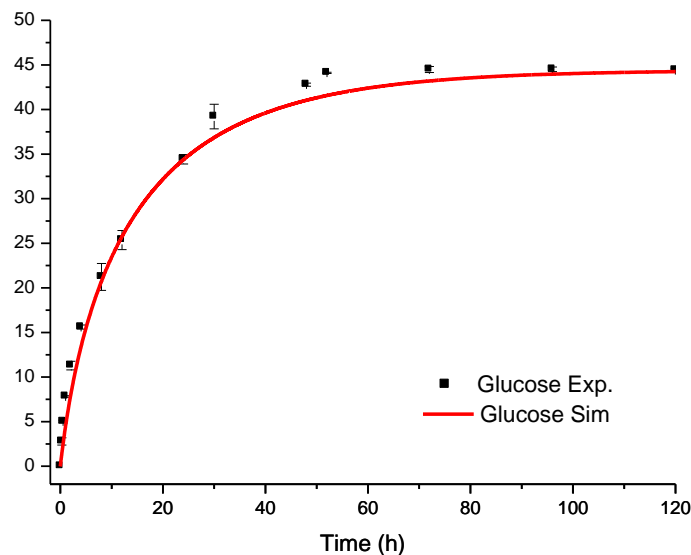
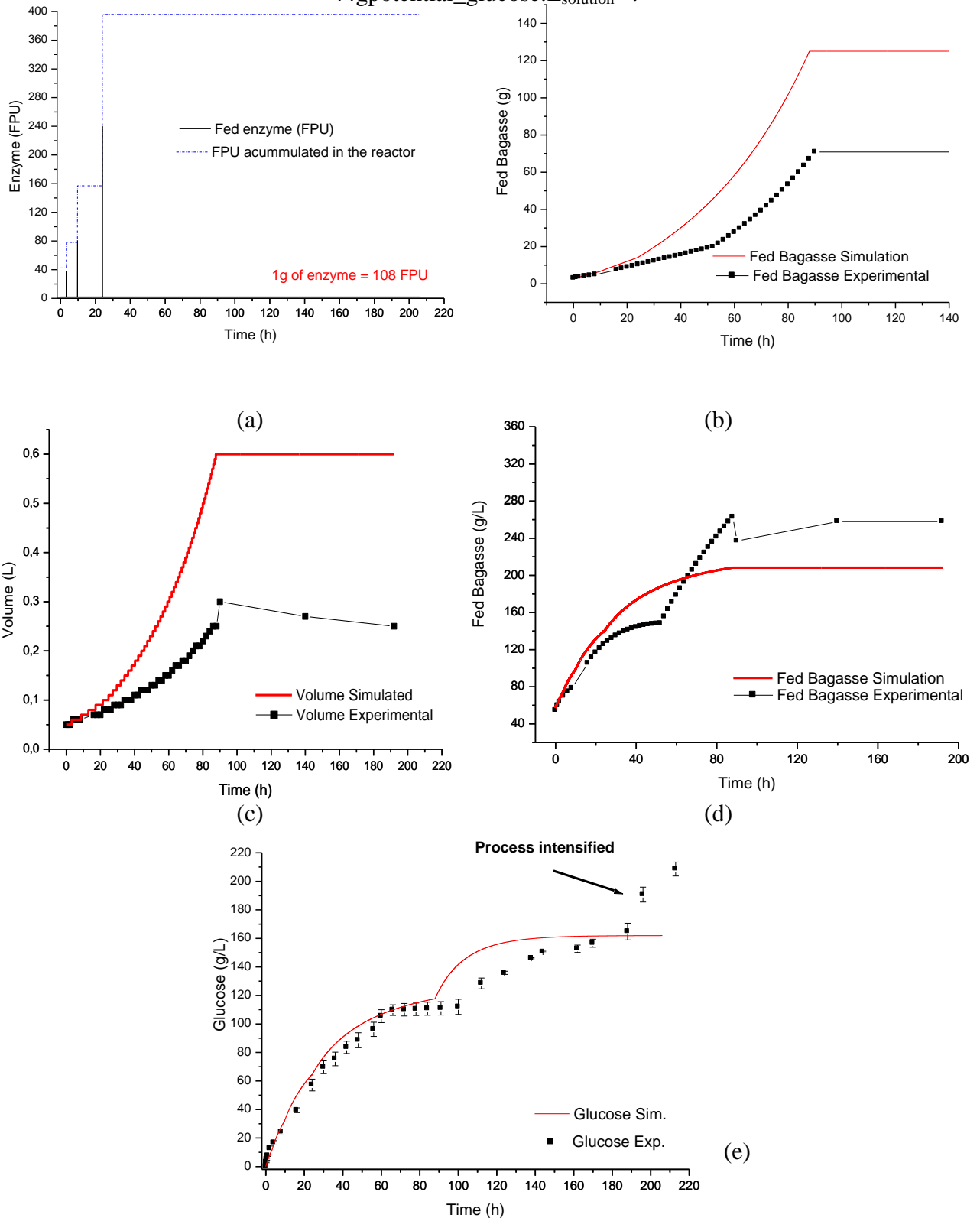


Figure 2.3 – (a) Fed enzyme (experimental equals simulated), operational policy P#2, (b) Experimental and simulated data for bagasse (operational policy P#2), (c) Experimental and simulated data for volume (operational policy P#2), (d) Experimental and simulated data for bagasse per volume (operational policy P#2), (e) Experimental and simulated data of glucose in fedbatch operation (operational policy P#2). Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50 °C, pH 4.8, initial enzyme concentration $e(0) = 7,8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU.L}_{\text{solution}}^{-1}$ and initial potential glucose concentration of $44 \text{ gpotential_glucose.L}_{\text{solution}}^{-1}$.



The dynamic model allowed evaluation of different operational modes of the reactor. Figures 2.3a-2.3c show simulated and experimental results for the feeding policy P#2 (simultaneously adding enzyme and substrate during the reaction course).

The interruption of the substrate feeding occurred at around 87 h in the experimental assay, when a final batch process was carried out. This was the time in which the batch phase started in the simulations (see Figure 2.3b). Due to the increase of the apparent medium viscosity, experimentally it was not possible to follow the simulated bagasse feeding profile, as seen in Figure 2.3b. The reactor volume along time, is presented in Figure 2.3c (experimental and simulated results). The main reason for the difference between experimental and simulated volumes was the lower addition of bagasse (and, consequently, of water from bagasse humidity) in the experimental assays. Besides, during the reaction course, evaporation of water from the system occurred. This is an intensification of the process since the concentration of glucose increased due to the hydrolysis reactions and to the evaporation of water. Evaporation contributed to experimental volume decrease (and, consequently, to the intensification of glucose concentration). This effect is more apparent from 90 h, when the feeding of substrate had stopped. The total decrease of volume during the final batch phase was of approximately 50 mL, due to evaporation. Figure 2.3d shows that when dividing the fed bagasse by the reactor volume, experimental and simulated situations become alike.

The combined effects of evaporation and overestimation of the theoretical reactor volume compensated the lower feeding of solid substrate, and high concentrations of glucose could be achieved (as shown in Figure 2.3e).

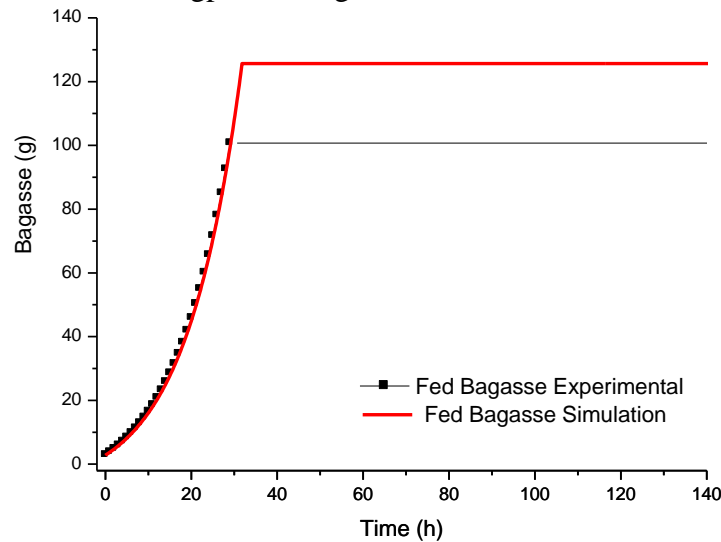
The end of substrate feeding generated a discontinuity in the first derivative of glucose curves (Figure 2.3e, mainly in the simulated results), which can be explained by the instantaneous reduction of the dilution effect caused by the feeding of new substrate.

It should be stressed that the long runs shown in these figures (almost 10 days) can certainly be reduced if greater enzyme loads were used. Of course, the final decision concerning the load of enzyme extract must be based on the economics of the process—operational costs of the reactor versus enzyme price. Nevertheless, the methodology herein is immediately applicable in any case. Having reliable models of the dynamics of the system, it is only a matter of simulating different start-up conditions in order to be able to discriminate which operational strategy should fit best in each case.

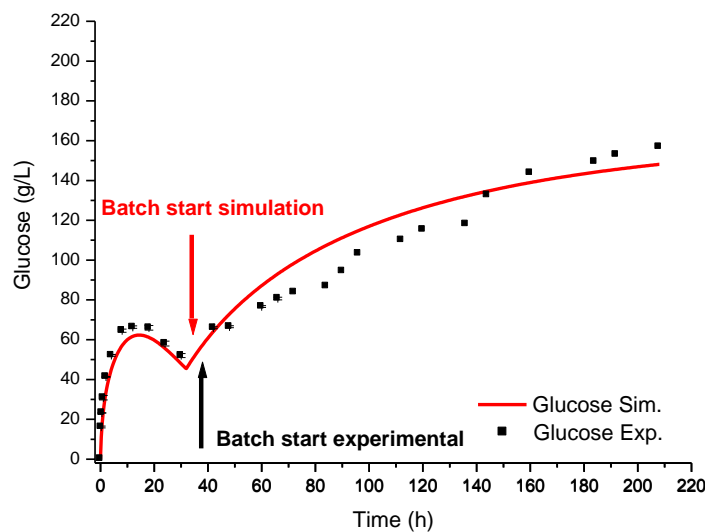
Figure 2.4a, b shows the comparison between experiments and simulated data for optimal control (P#1).

Figure 2.4 – (a) Experimental and simulated data for bagasse feeding for optimal control theory, (b) Experimental and simulated data for glucose during fed batch with optimal control.

Operating conditions are 50 °C, pH 4.8, initial enzyme concentration $e(0) = 73,4 \text{ g.L}^{-1} \equiv 7927.2 \text{ FPU.L}_{\text{solution}}^{-1}$ and initial potential glucose concentration of 44 $\text{gpotential_glucose.L}_{\text{solution}}^{-1}$.



(a)



(b)

The experimental feeding of substrate for this policy could follow the calculated profile more closely, but the accumulation of solid residue in the reactor at the end of the feeding phase prevented the completion of the designed feed profile—the addition of bagasse had to be interrupted 3 h before expected. The addition of the enzyme cocktail followed the calculated profile. Despite the smaller amount of substrate added to the reactor, the concentration of glucose closely followed the simulated curve. Again, the intensification

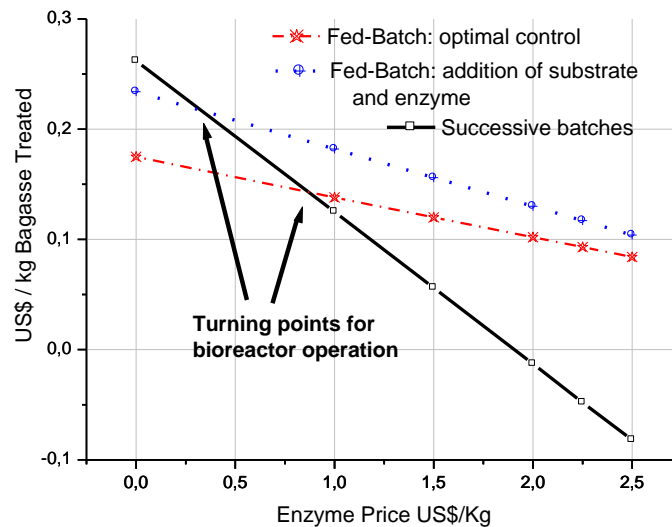
of the process due to evaporation of water (and the smaller addition of water, from the bagasse humidity) compensated the deprival of substrate.

Figure 2.5 presents a comparison between our fed-batch feeding policies and successive batches, regarding the sensitivity with respect to the price of the enzyme. In Figure 2.5, US\$/kg of bagasse (treated), $fi2$, was calculated according to equations 2.5a-2.5b:

$$fi = [Ethanol\ Price.(0.001).(0.46).P.V] - [Enzyme\ Price.(0.001). \frac{e_{accumulated}}{108}] - [Bagasse\ Price.(0.001).M_{accumulated}] \quad (2.5a)$$

$$fi2 = \frac{fi}{[(0.001).M_{accumulated}]} \quad (2.5b)$$

Figure 2.5 – Enzyme price sensitivity analysis.



The term 0.46 in equation 2.5a transforms g of glucose into g of ethanol. The terms 0.001, in turn, are only to convert g into kg. The term 108 is to convert FPU of enzyme into g of enzyme. Both fed-batch policies, P#1 and P#2, are less sensitive to enzyme prices than the successive batches. For P#2, the enzyme price threshold was around 0.35 US\$/kg. This is valuable information for process operation. Except in a narrow portion of the enzyme price range, fed-batch is better than batch.

Table 2.3 shows the comparison of simulated and experimental data for P#1, P#2 and P#3.

Table 2.3 - Comparison of simulated and experimental data.

	P#1 ^a		P#2 ^a		P#3 ^b	
	Simul.	Exp.	Simul.	Exp.	Simul.	Exp.
Glucose concentration (g.L ⁻¹)	145.6	152.8	161.9	190.6	41.7	42.8
Enz/Glucose (g.g ⁻¹)	0.042	0.067	0.038	0.076	0.189	0.184
Productivity (g _{glucose} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	0.758	0.794	0.843	0.992	0.217	0.223
Specific Productivity (g _{gluc} .g _{enz} ⁻¹ .h ⁻¹)	0.124	0.078	0.138	0.068	0.028	0.028
Cash flow (US\$/kg _{bagasse})	0.173	0.093	0.209	0.117	-0.056	-0.048

- Eight days of reactor operation
- Three batches of two days, two cleaning days

Policy P#2 (adding enzyme and substrate) led to higher glucose concentrations and cash flows. However, experimental specific productivity for P#1 and P#2 was lower than those predicted by the simulations. This was due to the fact that less bagasse was fed during the experiments, for both situations, when compared with the simulations. Finally, it is important to say that overall mass balances for fed-batch (P#2) and batch (P#3) experiments in Table 2.3, taking into account the measurements of glucose and cellobiose, had errors of ~5% and ~0%, respectively. For the feeding policy P#1, however, the quantification of glucose and cellobiose (*per se*) was not enough to close the overall mass balance, since ~22% of unconverted cellulose and oligosaccharides were still present at the end of the experiment (which is a further indicative that P#2 is the best feeding policy).

CONCLUSIONS

Three different strategies for the enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse were compared: fed-batch operation adding only the substrate, according to the optimal control theory (P#1); fed-batch operation adding enzyme and substrate, with the goal of sustaining high reaction rates (P#2); and successive batches (P#3).

The model-based strategies (P#1 and P#2) used simple pseudo-homogeneous kinetics to describe the rate of hydrolysis. All strategies were validated against experiments in bench-scale reactors. Sensitivity analyses were done using the price of the enzyme as

parameter, with the purpose of evaluating the best operational mode for the reactor in different scenarios. The ad hoc fed-batch policy P#2 (adding enzyme and substrate), followed by the optimal control fed-batch P#1 provided better revenues than the series of batch runs for the present market values of enzyme, bagasse and ethanol in Brazil (in September 2012). However, there was a threshold where successive batches become advantageous, 0.35 US\$/kg_{enzyme}. Of course, these results are based only in a case study, and have the sole purpose of demonstrating the utility of the tool.

Process intensification in a fed-batch reactor (adding enzyme and substrate simultaneously while the water naturally evaporates) led to glucose concentrations of approximately 200 g.L⁻¹.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-BIOEN), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CTC-Piracicaba for the steam exploded bagasse.

REFERENCES

- [1] Schilittler LAFS (2006) Engenharia de um bioprocesso para produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
- [2] Banerjee R, Pandey A (2002) Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. *Int Sugar J* 104:64-67
- [3] Walker LP, Wilson DB (1991) Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresour Technol* 36:3-14
- [4] Woodward J (1991) Synergism in cellulase systems. *Bioresour Technol* 36:67-75
- [5] Rothschild WG (1998) *Fractals in Chemistry*. Wiley Interscience, New York
- [6] Williams JC (2001) Macroscopic Flow Models. In: Gartner NH, Messer CJ, Rathi A (Eds.). http://www.tft.pdx.edu/docs/revised_monograph_2001.pdf
- [7] Sousa Jr R, Carvalho ML, Giordano RLC, Giordano RC (2011) Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. *Braz J Chem Eng* 28:545-564
- [8] Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, Mcmillan JD (2008) Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour Technol* 99:8940-8948
- [9] Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, McMillan JD (2009) Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 152:88-107
- [10] Kadam KL, Rydholm EC, McMillan JD (2004) Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnol Prog* 20:698-705
- [11] Morales-Rodríguez R, Capron M, Huusom JK, Sin G (2010) Controlled fed-batch operation for improving cellulose hydrolysis in 2G bioethanol production. 20th Eur Symp Comput Aided Process Eng – ESCAPE20

- [12] Chandra RP, Au-Yeung K, Chanis C, Roos AA, Mabee W, Chung PA, Ghatora S, Saddler JN (2011) The Influence of Pretreatment and Enzyme Loading on the Effectiveness of Batch and Fed-Batch Hydrolysis of Corn Stover. *Biotechnol Prog* 27:77-85
- [13] Gupta R, Kumar S, Gomes J, Kuhad RC (2012) Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. *Biotechnol Biofuels* 5:16
- [14] Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428
- [15] Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activity. *Pure Appl Chem* 59:257-268
- [16] Adney B and Baker J (1996) Measurement of cellulase activities: chemical analysis and testing task. Laboratory analytical procedure.
<http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/research/LAP-006.pdf>
- [17] Rocha GJM, Silva FT, Araújo GT, Curvelo AAS (1997) A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: *Proceedings of the V Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components* 5:113-115
- [18] Gouveia ER, Nascimento RT, Souto-Maior AM, Rocha GJM (2009) Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar, *Quím Nova* 32:1500-1503
- [19] Ramirez WF (1994) *Process Control and Identification*. Academic Press, New York
- [20] Carvalho ML, Sousa Jr R, Rodríguez-Zúñiga UF, Suarez CAG, Rodrigues DS, Giordano RC, Giordano RLC, Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *Braz J Chem Eng*, in press.

APPENDIX A

The first step in the development of the mathematical formulation of the optimal control algorithm is the dynamic description of the system to be controlled.

$$\frac{d\underline{x}}{dt} = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), t) = \dot{\underline{x}} \quad (\text{A1})$$

Where $\underline{x}(t)$ is the vector of dimension n of state variables, at time t, $\underline{u}(t)$ is the control vector of dimension m, which specifies the input variables of the system model, \underline{f} is a vector of functions (the system model, in our case mass balances), and $\dot{\underline{x}}$ is the vector of state variables, calculated by the differential equations that constitute the model.

The purpose of the optimal control problem is to determine the control policy that will maximize or minimize a specific performance index, subject to restrictions imposed by the physical nature of the problem. The general performance index (functional) is:

$$J = h(\underline{x}(t_f), t_f) + \int_{t_0}^{t_f} F(\underline{x}, \underline{u}, t) dt \quad (\text{A2})$$

The necessary conditions for optimization in the presence of constraints are conveniently expressed in terms of the "Hamiltonian" (H); the performance index is maximized / minimized by maximizing / minimizing H:

$$\min_{\underline{u}(t), t_f} H = F(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) \quad (\text{A3})$$

By applying the Maximum Principle of Pontryagin, a set of necessary conditions to maximize or minimize the functional are defined as:

$$\dot{\underline{\lambda}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}} \quad (\text{Euler-Lagrange equation, A4})$$

$$\dot{\underline{x}} = \underline{f} = \frac{\partial H}{\partial \underline{\lambda}} \quad (\text{restrictions, the model, equation A5})$$

$$\left[\frac{\partial h}{\partial x}(t_f) - \underline{\lambda}(t_f) \right]^T \delta x_f + \left(H(t_f) + \frac{\partial h}{\partial t}(t_f) \right) \delta t_f = 0 \quad (\text{transversality, equation A6})$$

$$\frac{\partial H}{\partial u} = \underline{0} \quad (\text{singular arc, equation A7})$$

$$\dot{u} = 0 \quad (\text{bang-bang control, A7'})$$

In our case study, the performance index is minimized at a fixed final time:

$$J = -P(tf) - X(tf) = -P(tf) - \{ [I(S_0 \cdot V_0) + (S_{feed} \cdot (V(tf) - V_0)) - (S(tf) \cdot V(tf))] / [I(S_0 \cdot V_0) + (S_{feed} \cdot (V(tf) - V_0))] \} \quad (\text{A8})$$

Through the Hamiltonian (H), the performance index could be maximized / minimized

$$H = \underline{\lambda}^T \cdot (\underline{f}(x) + \underline{g}(x) \cdot u) = \lambda_1 \cdot [-r + (S_{feed} - S)D] + \lambda_2 \cdot (r - PD) + \lambda_3 \cdot (VD) \quad (\text{A9})$$

Applying the Euler-Lagrange equation:

$$\dot{\lambda}_1 = \lambda_1 \cdot \{ D + (e \cdot k) / [S + km \cdot (P/ki + 1)] - (S \cdot e \cdot k) / [S + km \cdot (P/ki + 1)]^2 \} - \lambda_2 \cdot \{ (e \cdot k) / [S + km \cdot (P/ki + 1)] - (S \cdot e \cdot k) / [S + km \cdot (P/ki + 1)]^2 \}$$

$$\dot{\lambda}_2 = (-\lambda_1 \cdot S \cdot e \cdot k \cdot km) / \{ ki \cdot [S + km \cdot (P/ki + 1)]^2 \} + \lambda_2 \cdot \{ u + (S \cdot e \cdot k \cdot km) / [ki \cdot (S + km \cdot (P/ki + 1))^2] \}$$

$$\dot{\lambda}_3 = -\lambda_3 \cdot u \quad (\text{A10})$$

Finally, considering the transversality condition for fixed final time ($\delta t_f = 0$) and free final conversion:

$$\lambda_1(t_f) \cdot = V / [S_{feed} \cdot V + V_0 \cdot (S_0 - S_{feed})]$$

$$\lambda_2(t_f) = -1$$

$$\lambda_3(t_f) = [S \cdot V_0 \cdot (S_0 - S_{feed})] / [S_0 \cdot V_0 + S_{feed} \cdot V - S_{feed} \cdot V_0] \quad (A11)$$

Para a realização dos experimentos relatados no artigo, a alimentação experimental de substrato foi realizada manualmente, pela falta de um sistema automático de alimentação contínua para esse tipo de material. No procedimento adotado, a alimentação foi realizada a cada 1 hora, e a quantidade de substrato alimentado era equivalente à soma da quantidade simulada de bagaço alimentada durante esse período de tempo. Esta abordagem permitiu a alimentação de quantidades consideráveis de substrato de uma vez só (principalmente na parte mais exponencial), contribuindo para o aumento da viscosidade aparente do meio (CAVALCANTI, 2013).

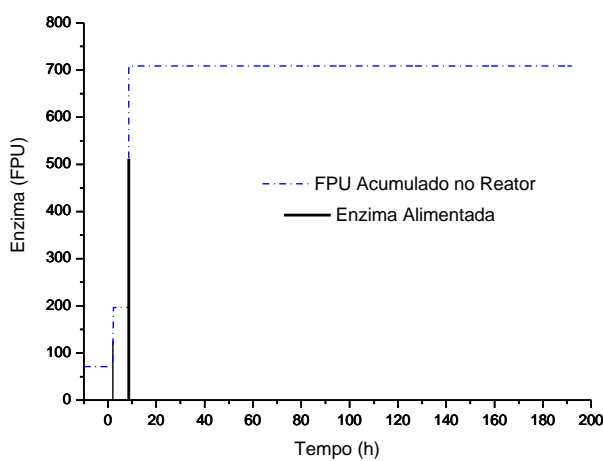
Outro experimento foi realizado juntamente com os alunos da disciplina “10606-2 - Desenvolvimento de Processos Químicos 2 (DPQ2) (turma J)”, supervisionada pelo Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr., durante o segundo semestre do ano 2012. Nesse experimento, a alimentação foi realizada a cada 15 minutos (ver Figura 2.6), apresentando melhores resultados, no que diz respeito ao acompanhamento do perfil de alimentação e ao controle da viscosidade aparente do meio.

Esse experimento foi realizado utilizando a política de alimentação (P#2), mas com carga inicial de sólidos igual a 7% (ver Figura 2.6), ou seja, correspondente a uma concentração de glicose potencial de $77,77 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}} \cdot \text{L}^{-1} \text{ solução}$ (no reator). O procedimento experimental utilizado foi o mesmo descrito no artigo, com as seguintes variações: 0,66g do extrato enzimático Accellerase® 1500, 29,54 mL de tampão citrato de sódio, 50 mM, a pH 4,8 e 25,46g de bagaço pré-tratado úmido (com 80,36% de umidade, ou seja, 20,46g de fase líquida), contendo 70% de celulose. As Figuras 2.6a - 2.6c mostram os resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#2 com carga inicial de sólidos igual a 7%.

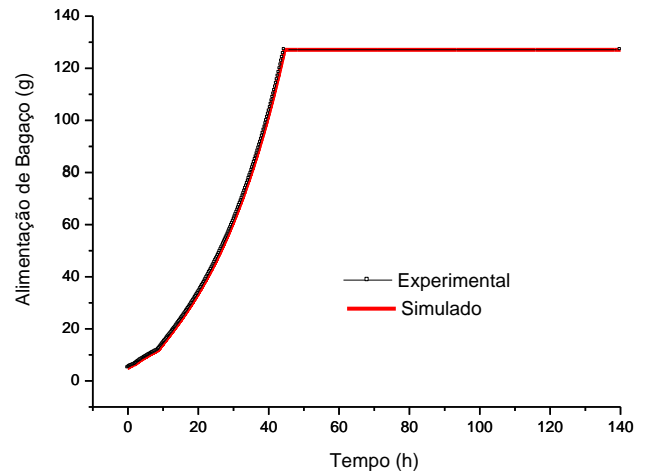
A Figura 2.6a mostra o perfil de alimentação de enzima. São alimentados dois pulsos de enzima ao longo do experimento, sendo adicionados antes das primeiras 10h. A Figura 2.6b apresenta o perfil (simulado e experimental) da alimentação de bagaço pré-tratado. Pode-se observar que realizando a alimentação de bagaço de cana pré-tratado em curtos intervalos de tempo (ou seja, o mais próximo possível ao perfil obtido nas simulações), é possível validar o perfil simulado sem contribuir com o aumento da viscosidade aparente do meio, o que se torna um fator importante para viabilizar o processo de sacarificação e fermentação simultânea.

Durante o período de alimentação de bagaço, a variação do volume reacional foi acompanhada, constatando-se que o volume experimental acompanhou perfeitamente o volume simulado.

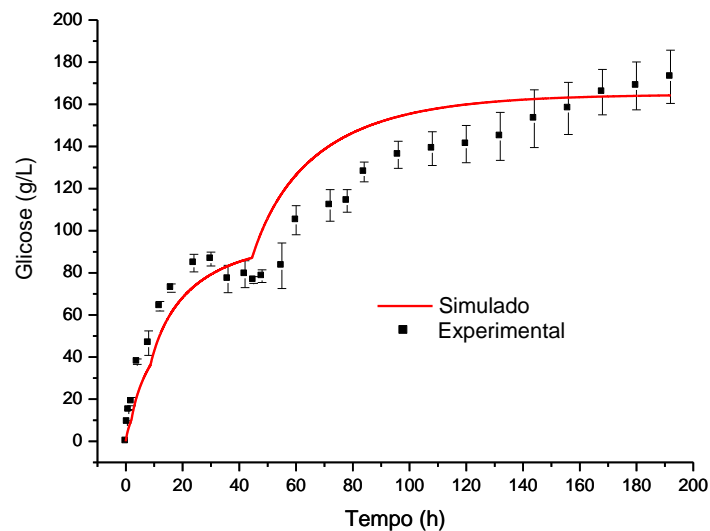
Figura 2.6 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1 para 7% de sólidos. (a) Enzima alimentada, (b) alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 13,05 \text{ g.L}^{-1} \equiv 1.409,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $77,77 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.



(a)



(b)



(c)

CAPÍTULO 3

MODELAGEM CINÉTICA DE SISTEMAS COMPLEXOS: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS



Neste capítulo é apresentado um artigo a respeito do desenvolvimento de um interpolador *fuzzy* para o cálculo das velocidades de hidrólise de diferentes substratos lignocelulósicos. Este interpolador permite combinar os atributos de diferentes modelos "locais" (ajustados para condições específicas de hidrólise) em um sistema "global" (genérico e abrangente) de predição. Um primeiro passo no sentido deste desenvolvimento foi a classificação (clustering) de um conjunto de dados experimentais de hidrólise disponíveis. Para validação, predições do interpolador aqui proposto foram comparadas com dados experimentais adicionais de hidrólise enzimática de um substrato lignocelulósico sintético.

Artigo: **MODELAGEM CINÉTICA DE SISTEMAS COMPLEXOS:
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS.**

Artigo submetido à Revista *Applied Biochemistry and Biotechnology*, editada por Springer.

**MODELING THE KINETICS OF COMPLEX SYSTEMS: ENZYMATIC
HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES**

**Carlos Alberto Galeano Suarez^a, Inti Doraci Cavalcanti-Montaña^a, Renan Gustavo da
Costa Marques^a, Felipe Fernando Furlan^a, Pedro Luiz da Mota e Aquino^a, Roberto de
Campos Giordano^a and Ruy de Sousa Júnior^{a*}**

^aDepartment of Chemical Engineering – Federal University of São Carlos

Rod. Washington Luís – Km 235 – CEP 13565-905 – CP 676 - São Carlos/SP – Brazil

Fax: +(55) (16) 3351-8266

* ruy@ufscar.br; phone: +(55) (16) 3351 8713

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is mainly composed by cellulose, hemicellulose and lignin. Fuzzy logic, in turn, is a branch of many-valued logic based on the paradigm of inference under vagueness. This paper presents a methodology, based on computational intelligence, for modeling the kinetics of a complex reactional system. The design of a fuzzy interpolator to model cellulose hydrolysis is reported, within the perspective of applying kinetic models in bioreactor engineering. Experimental data for various types of lignocellulosic materials were used to develop the interpolator. New experimental data from the enzymatic hydrolysis of a synthetic substrate, on the other hand, were used to validate the methodology. The accuracy of the results indicates that this is a promising approach to extend the application of models fitted for specific situations to different cases, thus enhancing their generality.

Keywords: cellulose; clustering; enzymatic hydrolysis; enzyme kinetics; fuzzy interpolator; lignin.

INTRODUCTION

Recently, lignocellulosic materials such as sugarcane bagasse and other agricultural wastes have been used as raw material for various products. The worldwide search for renewable energy sources makes the use of lignocellulosic biomass waste a promising alternative to produce bioethanol fuel on a large scale and at a competitive cost.

One of the most popular alternatives for production of bioethanol in industrial scale is the biochemical route, based on the fermentation of the sugar monomers of cellulose and hemicellulose. Two techniques may be used for obtaining fermentable sugars from lignocellulosic materials: acid and enzymatic hydrolyses.

Acid chemical hydrolysis has well known drawbacks: generation of toxic products and corrosiveness of the medium, requiring the use of more costly reactors. Moreover, it is necessary to recover the acid for making the process economically viable. In general, when concentrated acids are used, the monosaccharides released by hemicellulose are degraded due to the fact that the hemicellulose fraction is hydrolysed more rapidly than the fraction of cellulose. The sugars present in hemicellulose are exposed for a longer time in the reaction medium, which results in their degradation (for instance, to furfural). On the other hand, hydrolysis with dilute acid requires the use of high temperatures. For this reason, a relatively high amount of soluble sugars and lignin is degraded, leading to inhibition during the fermentation process (1).

In the enzymatic hydrolysis, cellulose is broken down by a pool of cellulolytic enzymes, and there is no formation of by-products, due to the specificity of enzymes (resulting in a high yield of fermentable sugars). However, it is necessary to pretreat the biomass, to improve its digestibility, and to use high concentrations of enzymes for achieving high conversions of the cellulose, which makes the process more costly (2).

Enzymatic hydrolysis of cellulose yields glucose, which can be further fermented to provide ethanol. It can be operated under mild conditions, avoiding the formation of byproducts which can inhibit the fermentation, such as hydroxymethylfurfural (3), consequently leading to a reduction of the cost of separation of the products (4).

The presence of lignin and hemicellulose hinders the access of cellulases to their substrate; this can reduce significantly the efficiency of the hydrolysis. Therefore, there is a need for pretreatments that weaken the interaction between the main components of the lignocellulosic material. Pretreatments aim at partially separating lignin and hemicellulose

from the cellulose matrix, and disrupting the crystalline structure of cellulose. The result is increased accessibility to cellulose particles, as a consequence of the solubilization and/or partial degradation of hemicellulose and lignin (5). To be considered effective, a pretreatment must meet the following requirements: avoiding the need of reducing the particle size of the biomass, limiting the formation of degradation products that inhibit the microbial fermentation, and minimizing the energy demand. Various types of processes have been used for the pretreatment of lignocellulosic materials (1). The processes described in the literature include: physical processes, such as steam explosion and thermal hydrolysis; chemical processes, such as weak acid and alkaline hydrolysis; biological processes using fungi to solubilize the lignin; finally, a combination of processes, as steam explosion catalyzed by adding H_2SO_4 or CO_2 (6-7). However, the most common methods are based on the use of alkali, acid hydrolysis, steam explosion and hot water, all with the purpose of breaking the associative structure of lignocellulose (8-10).

For the enzymatic hydrolysis to be efficient, it is necessary to optimize the reaction conditions, since the yield of hydrolysis is governed by several factors such as the type of pretreatment of the substrate, inhibition of enzymatic activity by end products of the biodegradation, ineffective adsorption of enzymes (on lignin, for instance) thermal stability of enzymes, duration of the hydrolysis, pH, concentration of substrate in the medium and agitation speed (11).

In enzymatic hydrolysis processes, there are some important phenomena that finally control the overall rates of reaction. For hydrolyses in batch stirred reactors, the overall reaction rate is determined by the rates of three events occurring in sequence: (a) the rate of (external) mass transfer of the enzyme, (b) the rate of diffusion/adsorption of the enzyme on the substrate surface and (c) the rate of the cellulase catalytic action. After a first initial stage, the overall reaction rate is subject to (internal) diffusion and adsorption of the enzyme on the solid substrate. Most authors do not consider the external mass transfer resistances. The adsorption of enzymes and the formation of enzyme-substrate complexes are considered crucial steps in this process. Adsorption of cellulase on the insoluble cellulose has been described as reversible, irreversible and semi-reversible (thus, literature is inconclusive on this subject (12)).

Modeling the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials is probably one of the most challenging subjects in bioreactor engineering science. The challenges of this problem can be grouped into three classes: the complexity of the substrate, the action of the enzymes, and the enzyme-substrate interactions. There are different approaches for this

modeling. Zhang and Lynd (13) grouped kinetic models of the enzymatic hydrolysis of biomass according to the level of detail of their description of the substrate and/or of the activities of the different enzymes that are acting. According to these authors, models can be classified as nonmechanistic, semimechanistic, functionally based and structurally based.

Engineering practice for design and optimization of the hydrolysis bioreactor has been based mainly on different empirical and semi-empirical approaches (nonmechanistic and semimechanistic models), including simple kinetic equations (14). The most common semimechanistic approach is based on pseudo-homogeneous Michaelis-Menten models, i.e., despite being actually a solid, the substrate is treated as a soluble reactant, characterized by its concentration. Bezerra and Dias (15) investigated the kinetics of one exoglucanase in the presence of cellobiose using different enzyme/substrate (Avicel) ratios. It was found that the cellulose hydrolysis rate followed a pseudo-homogeneous Michaelis-Menten model that takes into account competitive inhibition by cellobiose. A second class of semimechanistic rate equations pictures a system closer to the real one, considering that the substrate is in solid form and that the soluble enzyme has to adsorb to (and desorb from) it. Carrillo et al. (16) studied the kinetics of the hydrolysis of pretreated (with sodium hydroxide) wheat straw using different concentrations of a commercial cellulase (Novozymes A/S). Initial rates of an equation derived from a Michaelis-Menten mechanism were measured, assuming solid substrate and soluble enzyme. The initial rate of hydrolysis can be expressed as a function of the initial enzyme concentration in a Modified Michaelis-Menten model.

Finally, in Chrastil's semimechanistic model (17-18), all time constants of the rate of product formation are ranked, taking into account that in a heterogeneous system the time curves depend strongly on rate limiting phenomena such as enzyme (internal) diffusion and adsorption.

Many kinetic rate equations were developed for model substrates such as Avicel, CMC or Solca Floc. However, real substrates do not show the same characteristics as pure cellulose. These substrates may not represent well the hydrolysis of biomass, where cellulose is combined with other components (hemicellulose and lignin). Carvalho et al. (19-20) investigated the kinetics of the enzymatic hydrolysis of three cellulosic substrates (added to the bioreactor in low and high loads): filter paper (FP), used as a de-lignified substrate model, steam exploded sugarcane bagasse (SB) and acid treated SB. The latter two were also treated with 4% NaOH. Kinetic models were fit for these different lignocellulosic substrates,

and different functional forms of the rate equations (Michaelis-Menten-like and Chrastil equations) were tested for different types of substrates.

However, due to the complexity of the reactional system, it becomes difficult to use a single semimechanistic kinetic model for the different hydrolysis conditions that appear while the reaction proceeds. An interesting idea would be to combine the attributes of the different "local" models adjusted by Carvalho et al. (19-20) in a "global" system, calculating the rate of hydrolysis (incorporating models fitted for different hydrolysis conditions). A first step towards this development is the classification of the experimental data from Carvalho (19-20) into an adequate number of clusters. This classification is important for determining kinetically similar regions.

Clustering of numerical data forms the basis of many classification algorithms for pre-processing experimental data. The purpose here is to identify natural groupings in a set of data in order to improve the representation of the system behavior. A popular technique for grouping data is associated with fuzzy logic, and is known as Fuzzy C-Means (FCM), as described in the Theory section of this paper.

The aim of this paper is to develop a fuzzy interpolator for kinetic modeling based on simple models to obtain a "global" model (combining these simple models), covering a broad range of hydrolysis conditions. The present paper intends to assess how the interpolation of simple semimechanistic models adheres to experimental data of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. Three kinetic models were considered: Pseudo-homogeneous Michaelis-Menten, Modified Michaelis-Menten and Chrastil models, all previously fitted by Carvalho et al. (19-20).

MATERIALS AND METHODS

Fuzzy Interpolator Design

Experimental data from Carvalho (19-20), of hydrolysis with different lignocellulosic substrates (filter paper; exploded bagasse treated with 4% NaOH, low and high load; bagasse treated with 1% H₂SO₄ and 4% NaOH, low and high load), were grouped using the FCM clustering technique. The data were clustered into different classes, so that each different class matches a different kinetic model. For clustering, the variables used were

percentage of cellulose load in the reactor and lignin content (percentage) with regard to the substrate composition.

Initially, Carvalho (19-20) carried out filter paper studies in 250 mL Erlenmeyer flasks, in a total reaction volume of 20 mL, with $0.5 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{solution}}$, at pH 4.8, in 50 mM sodium citrate buffer. The experiments were run using a refrigerated incubator (Marconi MA-832) with agitation set at 250 rpm, at 50 °C. The initial substrate concentration of 3.85% ($w_{\text{cellulose}}/w_{\text{total}}$) was considered. For the exploded sugarcane bagasse treated with 4% NaOH, hydrolysis experiments were also performed in 250 ml Erlenmeyer flasks, with a liquid volume of 30 mL, by adding $0.85 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{solution}}$, at pH 4.8, in 50 mM sodium citrate buffer. The initial percentage of 2.9% ($w_{\text{cellulose}}/w_{\text{total}}$), corresponding to a potential glucose concentration of $33.33 \text{ g}_{\text{Glucose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solution}}$, was taken into account. Also, an assay was performed by setting the initial substrate at 6.54% ($w_{\text{cellulose}}/w_{\text{total}}$), corresponding to a potential glucose concentration of $77.77 \text{ g}_{\text{Glucose}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solution}}$. For the bagasse treated with 1% H_2SO_4 and delignified with NaOH 4%, similar procedures were carried out. For the determination of glucose concentration from samples taken during the hydrolysis assays, an enzymatic kit was used by Carvalho (19-20). To calculate the cellulose load in the reactor and the lignin content with regard to the substrate composition along time, taking into account the initial chemical characterization of the substrates (for cellulose, lignin, hemicellulose, ashes) and the consumption of cellulose along time in each experiment of Carvalho (19-20), the following calculations were performed:

$$\% \text{ of cellulose in the reactor} = \frac{100 \cdot \text{remaining cellulose (g)}}{w_{\text{total}} \text{ (g)}} \quad (3.1)$$

$$\text{lignin content} = \frac{100 \cdot \text{lignin (g)}}{\text{lignin (g)} + \text{remaining cellulose (g)} + \text{hemicellulose (g)} + \text{ashes (g)}} \quad (3.2)$$

Based on the clustering, a fuzzy interpolator was generated for the interpolation of different simple semimechanistic models (those presented in Table 3.1). The study was conducted using the software MATLAB.

Table 3.1 - Semimechanistic kinetic models and kinetic parameters used to develop the fuzzy interpolator for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials (Carvalho, 19-20).

MODEL	EQUATION	PARAMETERS
Model 1: Pseudo-homogeneous Michaelis-Menten (MM) model, with inhibition - studies originated with filter paper.	$v = \frac{V_{\max} S}{K_m [1 + (P / K_I)] + S}$	V_{\max} : 0.09 g.L ⁻¹ min ⁻¹ K_m : 45.11 g.L ⁻¹ K_I : 4.13 g.L ⁻¹
Model 2: Pseudo-homogeneous MM with competitive inhibition.	$v = \frac{V_{\max} S}{K_m [1 + (P / K_I)] + S}$	V_{\max} : 0.105 g.L ⁻¹ min ⁻¹ K_m : 8.78 g.L ⁻¹ K_I : 5.91 g.L ⁻¹
Model 3: Modified MM Model with inhibition.	$v = \frac{K E S}{K_m [1 + (P / K_I)] + E}$	K : 0.0033 min ⁻¹ K_m : 22.06 g.L ⁻¹ K_I : 20.18 g.L ⁻¹
Model 4: Chrastil.	$P = P_{\infty} [1 - \exp(-k' E_0 t)]^n$	P_{∞} : 33.33 g.L ⁻¹ k' : 2.49E-7 L.g ⁻¹ min ⁻¹ E_0 : 7.83 g.L ⁻¹ n : 0.33
Model 5: Chrastil b.	$P = P_{\infty} [1 - \exp(-k' E_0 t)]^n$	P_{∞} : 77.77 g.L ⁻¹ k' : 4.96E-8 L.g ⁻¹ min ⁻¹ E_0 : 13.05 g.L ⁻¹ n : 0.30

The command line function *fcm* of MATLAB starts with an initial estimate for the cluster centers, which will be the average position of each cluster. The initial estimate for these cluster centers is probably incorrect. Furthermore, the function *fcm* calculates, for all data points, one degree of membership with regard to each cluster. By iterative updating the position of these cluster centers and the degree of membership of each data point, the function *fcm* iteratively moves the cluster centers within a data set. These iterations are based on minimizing an objective function that represents the distance from any given data point to a cluster center, weighted by the degree of membership of that point.

The information returned by FCM was used to build a fuzzy inference system by creating membership functions to represent the fuzzy qualities of each cluster. The classification was used to generate an inference algorithm to represent the system behavior (rate of hydrolysis according to the conditions of hydrolysis) using a minimum number of *fuzzy* rules. The predictions of the "global" model proposed here were compared with experimental data of enzymatic hydrolysis of a synthetic (cellulosic) substrate.

VALIDATION TEST

Enzyme

The commercial complex of cellulases Accellerase® 1500, from *Trichoderma reesei*, donated by Genencor® (Palo Alto, CA), was used. According to the manufacturer, this complex contains multiple enzymatic activities, different exoglucanases and endoglucanases, beta-glucosidase and hemicellulase. This complex operates at 50°C and pH 4.8. In long term experiments, 50°C is a good choice to minimize temperature inactivation. To determine the complex overall activity, the method of total reducing sugars (TRS) was applied, making use of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and Whatman filter paper No. 1 (21-23).

Enzymatic hydrolysis of a synthetic substrate

Two cellulosic materials were used to compose a synthetic substrate: qualitative filter paper (Satelit, Brazil) and *in natura* sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*), donated by the Center for Sugarcane Technology (CTC) – Piracicaba/SP. The synthetic substrate was prepared from the *in natura* sugarcane bagasse and the filter paper with a ratio of 1:1 (w/w). This was done in order to obtain a substrate with a lignin percentage between 0 – 20% (12%), in order to validate the model interpolator (since this is a new condition, different from Carvalho's (19-20)).

Experimental conditions

The hydrolysis experiment was carried out in erlenmeyer flasks with 50 mL of 50 mM sodium citrate buffer, at pH 4.8 and 20 FPU.g⁻¹_{cellulose} of Accellerase ® 1500, corresponding to 1.2 FPU.mL⁻¹_{solution}. The experiment began with the addition of 4.32 g of synthetic substrate (50% of paper filter-50% of sugarcane bagasse) in order to obtain an initial concentration of potential glucose of 66.66 g.L⁻¹. The synthetic substrate was hydrolyzed at 50°C and 250 rpm, for a total time of 72 h. Experiments were run in triplicate.

Sugar quantification

Glucose and cellobiose were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Shimadzu SCL-10A chromatograph with a refractive index detector Shimadzu RID-10A, column Aminex HPX-87H (300×7.8 mm, Bio-Rad) with 0.005 mol.L⁻¹ H₂SO₄ as mobile phase, at a flow rate of 0.6 mL.min⁻¹ and oven temperature of 45°C.

THEORY

FCM is a technique for grouping data where each data point belongs to all clusters, but in a different intensity – which is specified by the degree of membership of this point to each cluster. Such a technique was originally introduced by Bezdek (24) as an improvement in prior methods (25). Here, the number of cluster is predefined. There are other techniques that can be used when the number of clusters is not previously known (26).

The FCM algorithm performs the steps listed in the following ((25), (27-28)):

1. Centers of the clusters are chosen randomly, and for each point in the data set the distance to each center is calculated by equation (3.3).

$$D_{ij}^2 = (u(i) - c_j)^T \sum (u(i) - c_j) \quad (3.3)$$

Where $u(i)$ is a data point, j is the number of clusters and c is the chosen center.

2. After that, the degree of membership of each data point (for each cluster) is calculated, using equation (3.4).

$$\mu_{ij} = \frac{1}{\sum_{l=1}^C (D_{ij}^2 / D_{il}^2)^{\frac{1}{v-1}}} \quad (3.4)$$

Where μ is the degree of membership, v is a weighting exponent, between 1 and ∞ (when there is no prior knowledge, 2 is a good estimate, (25, 27-28)) and C is the number of centers.

3. After this step, the centroid is computed for each cluster, which can be obtained from equation (3.5).

$$c_j = \frac{\sum_{i=1}^N \mu_{ij}^v u_i}{\sum_{i=1}^N \mu_{ij}^v} \quad (3.5)$$

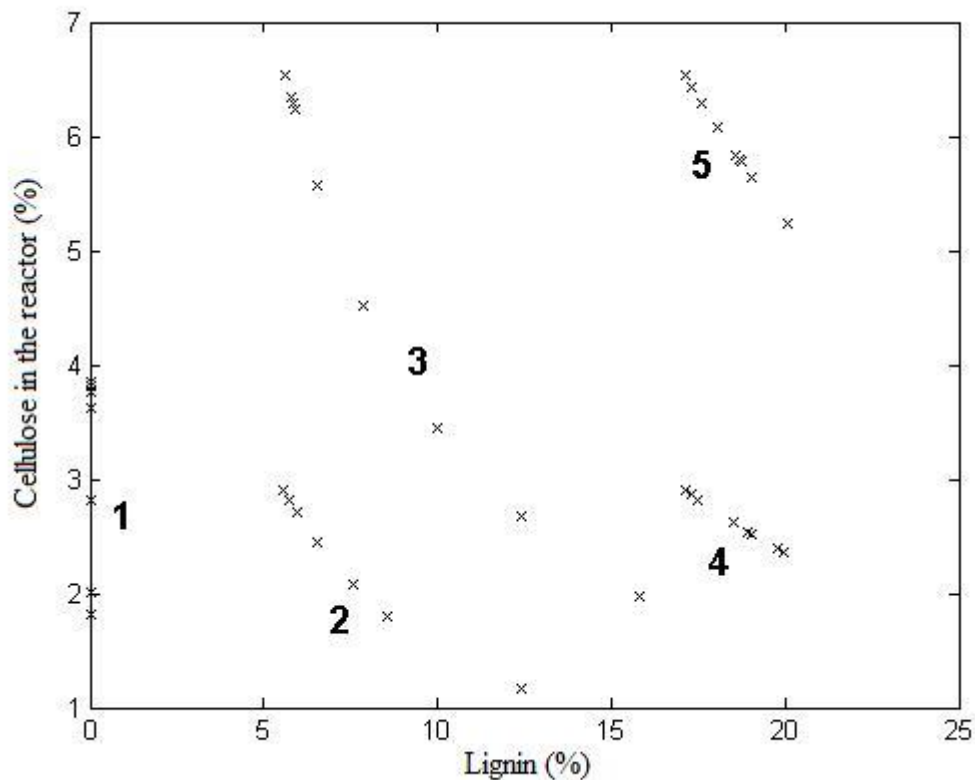
N represents the number of existing data. The centers are modified until an objective function, represented by I in equation (3.6) is minimized.

$$I = \sum_{j=1}^C \sum_{i=1}^N \mu_{ij}^v (u(i) - c_j)^T \sum (u(i) - c_j) \quad (3.6)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Clustering of numerical data forms the basis of many classification and system modeling algorithms. Initially natural groupings (clusters) from experimental data of Carvalho (19-20) were identified. Figure 3.1 shows the experimental data set, percentage of cellulose in the reactor *versus* percentage of lignin with regard to the substrate composition, during the hydrolysis processes, i.e. along time, to determine the centers of the clusters. It is worth noticing that although we refer to the variable time, the time itself is not an input variable for grouping the data set (only percentage of cellulose in the reactor and percentage of lignin). The data are for the five different lignocellulosic substrates previously mentioned (filter paper (1); exploded bagasse treated with 4% NaOH, low (2) and high load (3); bagasse treated with 1% H₂SO₄ and 4% NaOH, low (4) and high load (5)).

Figure 3.1 - Percentage of cellulose in the reactor versus percentage of lignin with regard to the substrate composition, during the hydrolysis processes, for the experimental data of Carvalho (19-20). The data are for five different lignocellulosic substrates (filter paper (1); exploded bagasse treated with 4% NaOH, low (2) and high load (3); bagasse treated with 1% H₂SO₄ and 4% NaOH, low (4) and high load (5)).



We use MATLAB to show the experimental data graphically, where the Y axis represents the percentage of cellulose load in the reactor (%) and the X axis the percentage of lignin with regard to the substrate composition (%). In Matlab, invoking the command-line function *fcm*, it was possible to find five clusters in this data set (until the objective function, *objFcn*, was no longer decreased). Function *fcm* returned a vector containing the coordinates of the five cluster centers, other vector containing the membership degrees for each one of the data points, and a history of the objective function along the iterations.

After running *fcm* function, two results were obtained, due to the initial random choice of the cluster centers. The two possible outputs are shown in Figures 3.2 and 3.3.

Figure 3.2 - First output for the clustering process. (Δ) Center of the cluster for filter paper; (*) Center of the cluster for exploded bagasse treated with 4% NaOH (low percentage of cellulose); (X) Center of the cluster for exploded bagasse treated with 4% NaOH (high percentage of cellulose); (O) Center of the cluster for bagasse treated with 1% H₂SO₄ and 4% NaOH (low percentage of cellulose); (+) Center of the cluster for bagasse treated with 1% H₂SO₄ and 4% NaOH (high percentage of cellulose).

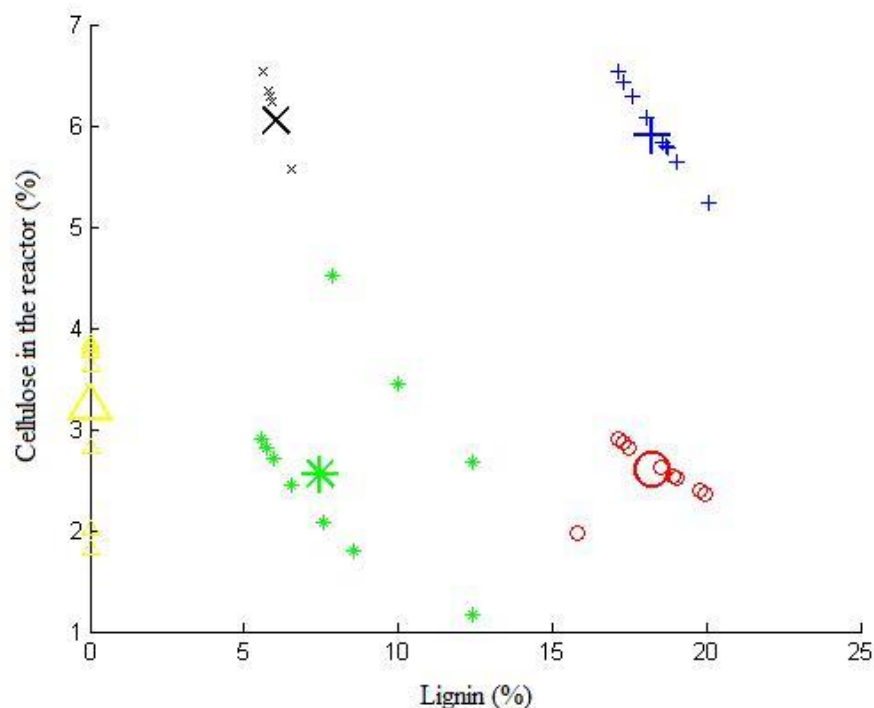
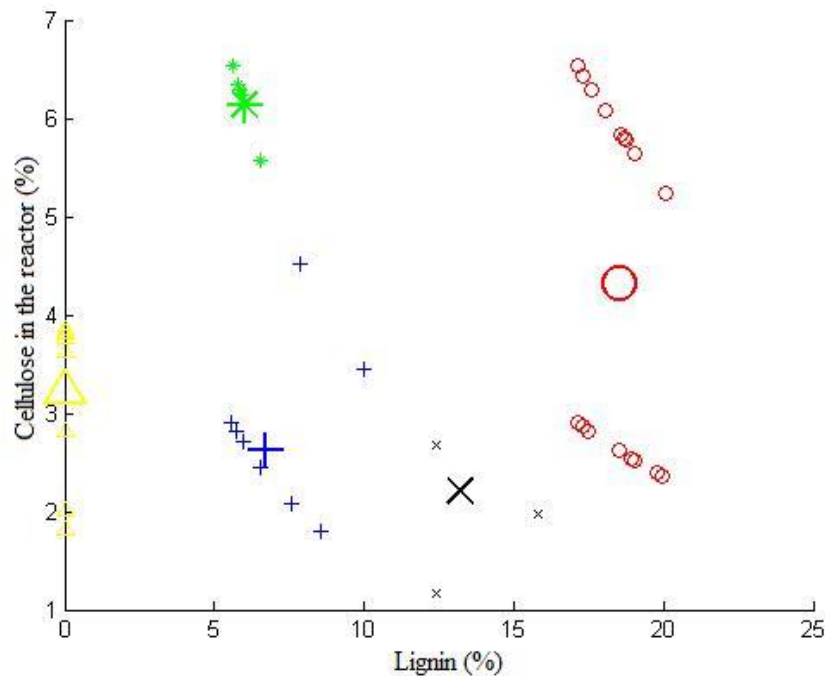


Figure 3.3 - Second output for the clustering process.



The first output was selected (Figure 3.2), since each different cluster center is associated with a different hydrolysis substrate (filter paper (Δ); exploded bagasse treated with 4% NaOH, low (*) and high (X) load; bagasse treated with 1% H₂SO₄ and 4% NaOH, low (O) and high (+) load), providing a more intuitive response.

In addition to the figures, the program also provides the coordinates of the cluster centers, which were then used in the creation of functions for determining the degree of membership for the two inputs, cellulose load in the reactor and lignin content, as shown in Figures 3.4 and 3.5.

Each cluster center corresponds to the maximum degree of membership (=1) of a particular linguistic value (for the linguistic variables cellulose load and lignin content).

Figure 3.4 - Membership functions for determining the degree of membership (for cellulose load). Each cluster center corresponds to the maximum degree of membership (=1) of a particular linguistic value (for the linguistic variable cellulose load). The straight lines connecting the data points (cluster centers) characterize intermediate degrees of membership within two adjacent linguistic values.

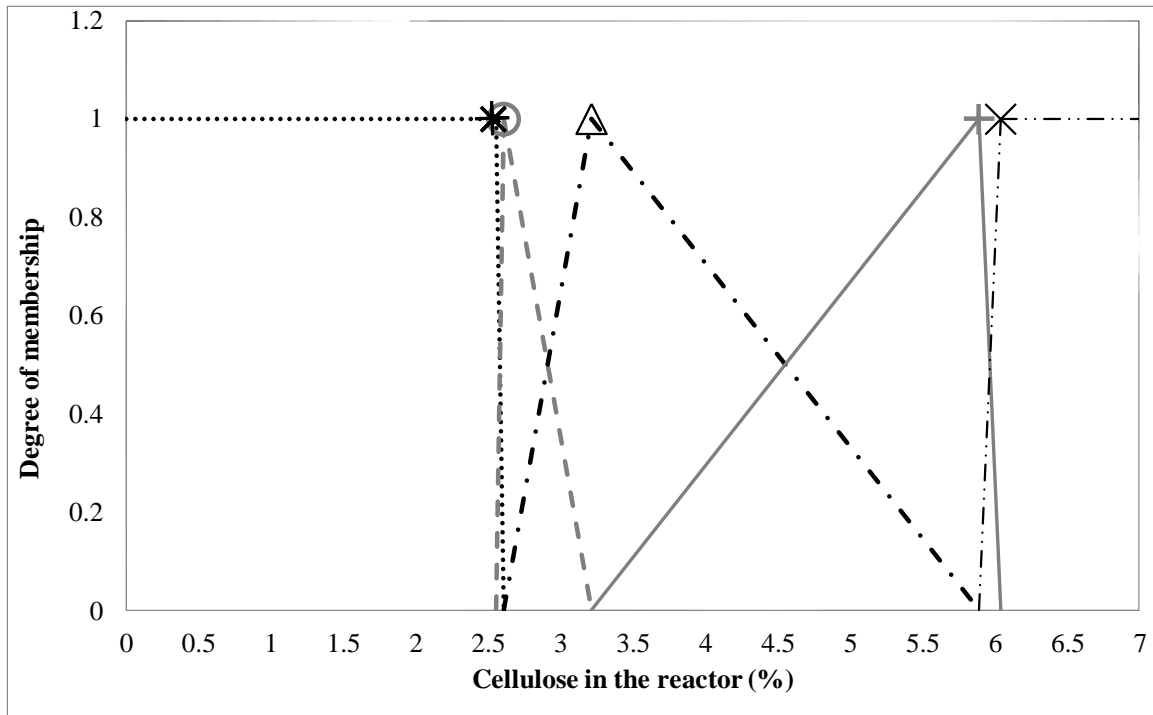


Figure 3.5 - Membership functions for determining the degree of membership (for lignin content). Each cluster center corresponds to the maximum degree of membership (=1) of a particular linguistic value (for the linguistic variable lignin content). The straight lines connecting the data points (cluster centers) characterize intermediate degrees of membership within two adjacent linguistic values.

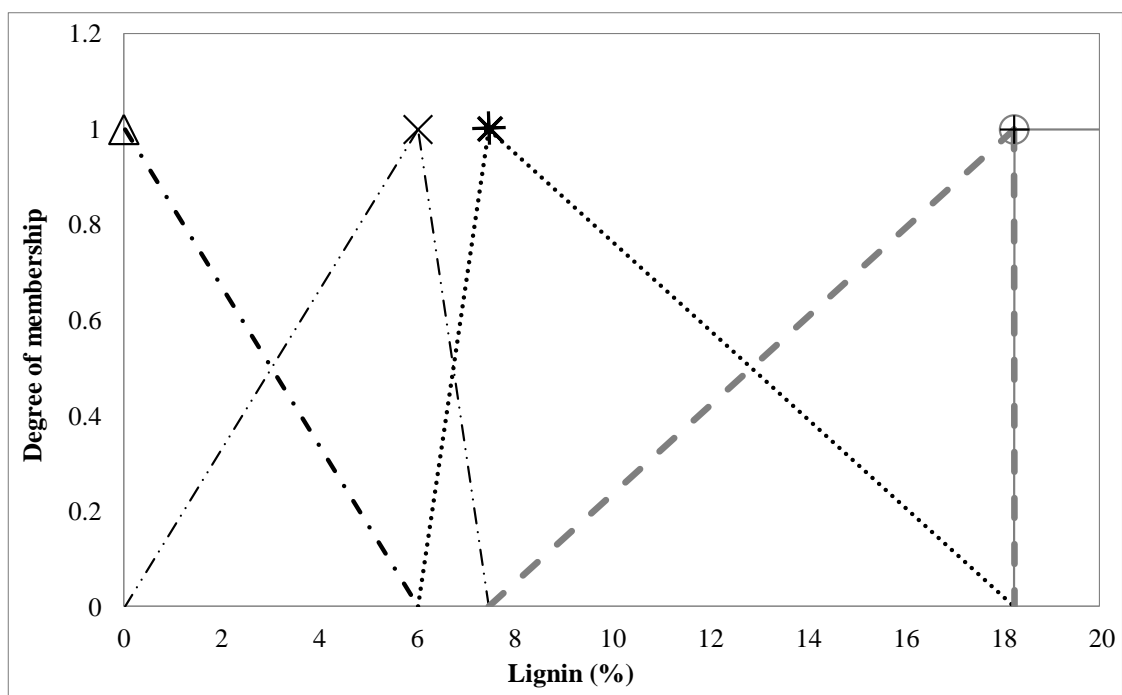
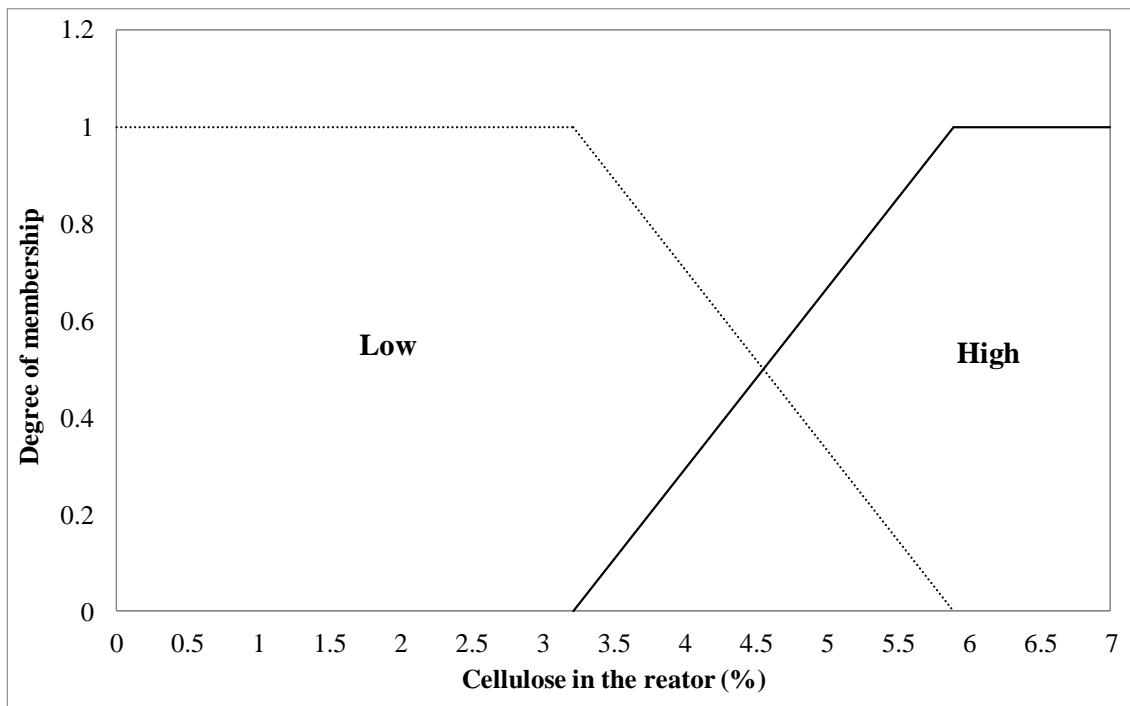
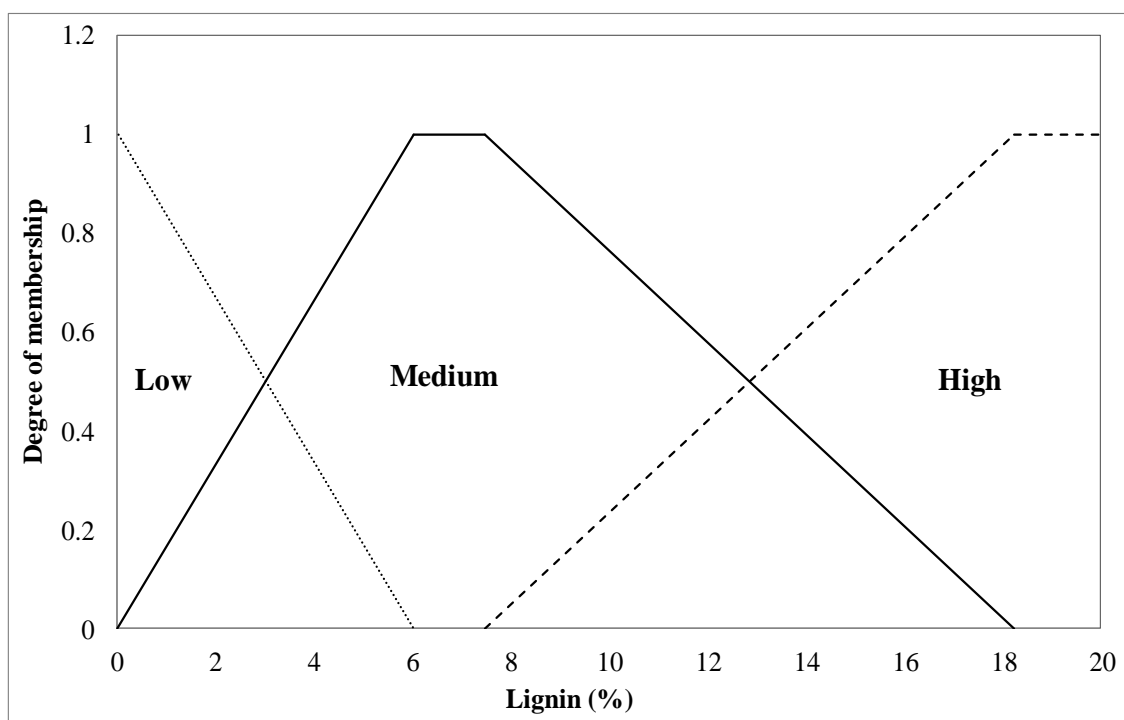


Figure 3.6 - Final membership functions to determine the degree of membership (for cellulose load).



As one can see in Figures 3.4 and 3.5, some maximum degree of memberships (=1) were very close to each other, making it suitable to fuse some linguistic values. The final membership functions are shown in Figures 3.6 and 3.7.

Figure 3.7 - Final membership functions to determine the degree of membership (for lignin content).



For input variable % of cellulose in the reactor, the left trapezoidal membership function in Figure 3.6 was assigned the linguistic value "Low load", and the function on the right was assigned the value "High load". For the input variable % of lignin (Figure 3.7), in turn, the triangular function on the left was assigned the value "Low lignin," the central trapezoidal region, "Medium lignin", and the right, "High lignin".

With the equations of the straight lines (linear equations) associated with the linguistic values of the linguistic variables, a fuzzy inference system was generated representing the system behavior (rate of hydrolysis depending on the conditions of hydrolysis) using a minimum number of rules. These rules are:

Rule (1): If the % of cellulose is low or high and % of lignin is low, the hydrolysis rate follows kinetic model 1.

Rule (2): If the % of cellulose is low and % of lignin is medium, the hydrolysis rate follows kinetic model 2.

Rule (3): If the % of cellulose is high and % of lignin is medium, the hydrolysis rate follows kinetic model 3.

Rule (4): If the % of cellulose is low and % of lignin is high, the hydrolysis rate follows kinetic model 4.

Rule (5): If the % of cellulose is high and % of lignin is high, the hydrolysis rate follows kinetic model 5.

In these rules, the kinetic models 1-5 are:

Kinetic model 1: Pseudo-homogeneous Michaelis-Menten (MM) model, with inhibition - studies originated with filter paper.

Kinetic model 2: Pseudo-homogeneous MM with competitive inhibition.

Kinetic model 3: Modified MM Model with inhibition.

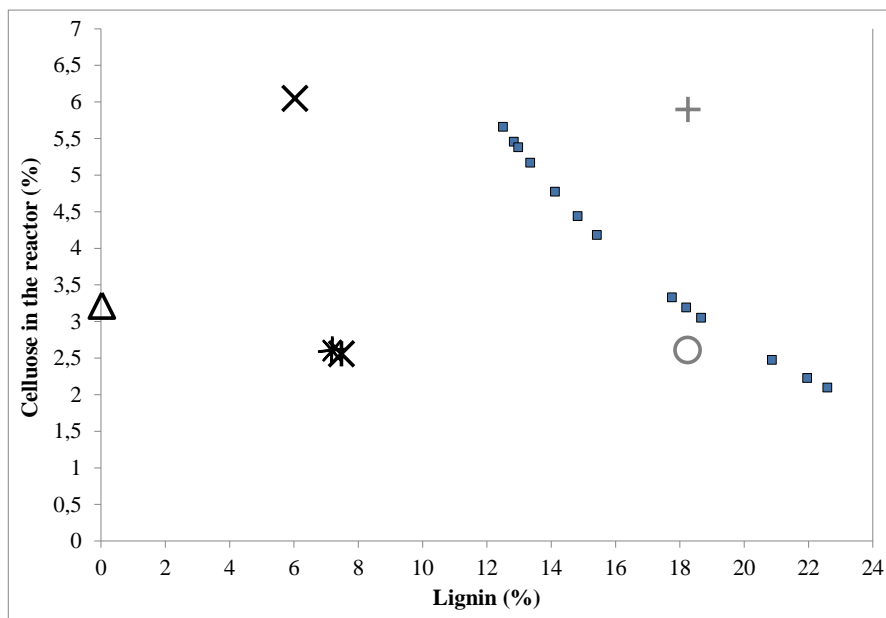
Kinetic model 4: Chrastil Model.

Kinetic model 5: Chrastil Model b.

VALIDATION TEST

Figure 3.8 shows the experimental data for percentage of cellulose in the reactor and percentage of lignin with regard to the substrate composition for the validation experiment (in relation to cluster centers).

Figure 3.8 - Experimental data (percentage of cellulose in the reactor and percentage of lignin with regard to the substrate composition) for the validation experiment, in relation to cluster centers.



Figures 3.9 and 3.10 show the comparison of the "global" model predictions compared to experimental data of enzymatic hydrolysis of the synthetic (validation) substrate, which was not used in the processes of clustering and model building. The simulated responses shown in these figures, provided by the integrator, were built initially considering the relevance of models 2, 3, 4 and 5. With the progress of the experiment the interpolator gently tended to consider mainly Chrastil model 4.

Figure 3.9 - Potential glucose concentration profiles. Comparison of experimental and simulated data for synthetic substrate. Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50°C, pH 4.8, enzyme concentration of 1200 FPU.L_{solution}⁻¹ and initial potential glucose concentration of 66.66 g_{potential_glucose}.L_{solution}⁻¹.

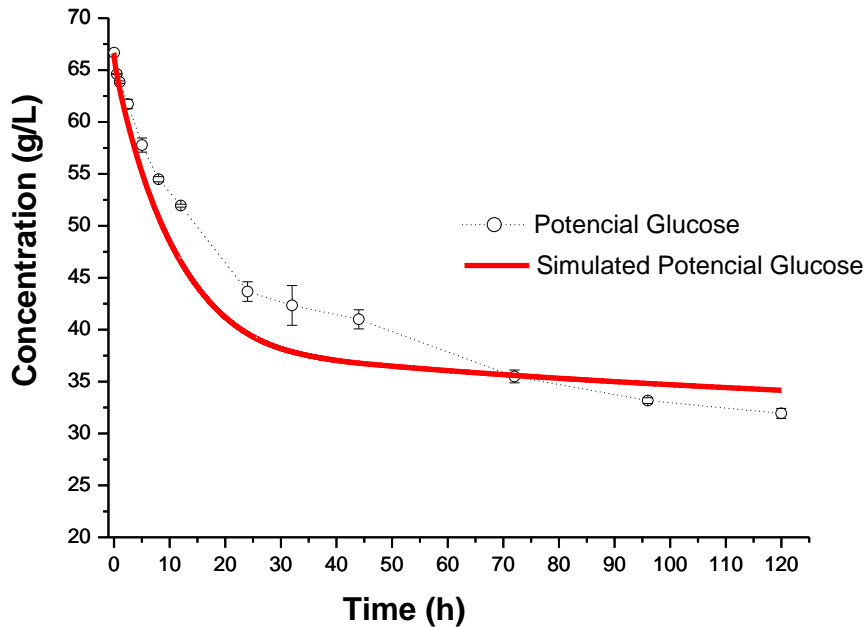


Figure 3.10 - Product concentration profiles. Comparison of experimental and simulated data for synthetic substrate. Error bars are standard errors of independent triplicate experiments. Operating conditions are 50°C, pH 4.8, enzyme concentration of 1200 FPU.L_{solution}⁻¹ and initial potential glucose concentration of 66.66 g_{potential_glucose}.L_{solution}⁻¹.

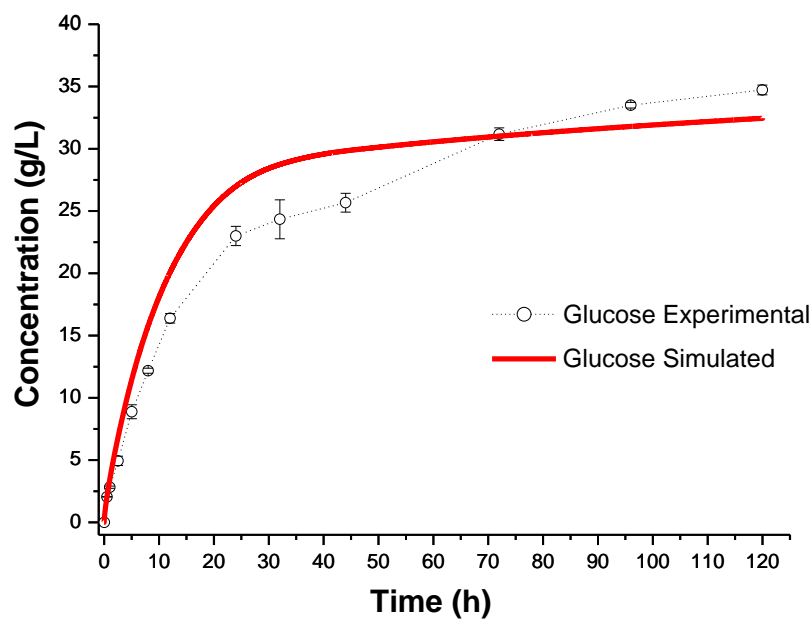


Figure 3.10 compares the glucose simulated by the fuzzy interpolator (“global” model) and glucose obtained experimentally for a total time of 120 hours of hydrolysis. It can be seen that between 0-15 hours, the interpolator represents the experimental data very well. However, within the interval between 15 and 45 hours the interpolator response does not adhere perfectly to the experimental data, due to the higher standard error associated with the experimental measurements of glucose concentration within this interval. Finally, after 45 hours, the experimental and simulated data increased gradually up to $\sim 33 \text{ g.L}^{-1}$, until hydrolysis is completed. A major advantage in using this interpolator is that re-tuning of the parameters of the simple “local” models is not necessary.

CONCLUSION

The presented results support the idea that a fuzzy interpolator for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials can be an important modeling tool, and a feasible methodology for representing the process in a robust and reliable way. Other important factor to be noticed is that this methodology can be applied for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials different from sugar cane bagasse, such as soy hulls and sugar cane straw. After “local” kinetic models are adjusted and characterized for the lignocellulosic materials, is possible to develop a fuzzy interpolator for kinetic modeling based on simple models for obtaining a “global” model covering a broad range of hydrolysis conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-BIOEN), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

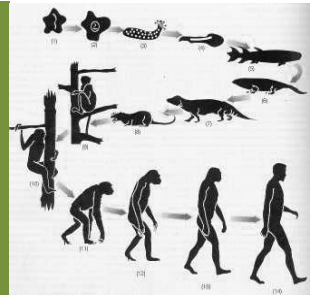
REFERENCES

- [1] Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11.
- [2] Eklund, R., Galbe, M., Zacchi, G. (1990) Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzyme saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**, 225-228.
- [3] Granda, C.B. (2007) Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model. *Bioresour. Technol.* **98**, 2969-2977.
- [4] Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., Zacchi, G. (2006) Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnol.* **24**, 549-556.
- [5] Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussoss, S. (2000) Biotechnology potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* **74**, 69-80.
- [6] Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G.V., Faaij, A.P.C. (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* **28**, 384-410.
- [7] Rabelo, S.C. (2007) Avaliação do desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de cana-de-açúcar. Dissertation, State University of Campinas.
- [8] Cunha, C.M., Silva, F.T. (2001) Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. In: 6th Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, VII, pp. 221-226.

- [9] Gámez, S., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2006) Study of hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *J of Food Eng.* **74**, 78-88.
- [10] Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J.Jr., Lynd, L.R. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* **81**, 33-44.
- [11] Vallander, L., Eriksson, K.E.L. (1985) Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw. *Biotechnol. and Bioeng.* **27**, 650-659.
- [12] Sousa, R.Jr., Carvalho, M.L., Giordano, R.L.C., Giordano, R.C. (2011) Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. *Braz. J. Chem. Eng.* **28**, 545-564.
- [13] Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol. and Bioeng.* **88**, 797-824.
- [14] Cavalcanti-Montañó, I.D., Suarez, C.A.G., Rodríguez-Zúñiga, U.F., Giordano, R.L.C, Giordano, R.C., Sousa, Jr. R. (2013) Optimal bioreactor operational policies for the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioenergy Res.* **6**, 776-785.
- [15] Bezerra, R.M.F., Dias, A.A. (2004) Discrimination among eight modified Michaelis-Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **112**, 173-184.
- [16] Carrillo, F., LIS, M.J., Colom, X., López-Mesas, M., Valldeperas, J. (2005) Effect of alkali pretreatment on cellulose hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. *Process. Biochem.* **40**, 3360-3364.
- [17] Chrastil, J. (1988a) Determination of the first order consecutive reaction rate constants from final products. *Comput. Chem.* **12**, 289-292.

- [18] Chrastil, J. (1988b) Enzymic product formation curves with the normal or diffusion limited reaction mechanism and in the presence of substrate receptors. *Int. J. Biochem.* **20**, 683-693.
- [19] Carvalho, M. L., Sousa, Jr. R., Rodríguez-Zúñiga, U. F., Suarez, C.A.G., Rodrigues, D.S., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C. (2013) Kinetic study of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Braz. J. of Chem. Eng.* **30**, 437-447.
- [20] Carvalho M (2011) Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertation, Federal University of Sao Carlos.
- [21] Adney, B., Baker, J. Chemical analysis and testing task: <https://engineering.purdue.edu/LORRE/research/LAP-006.pdf>. (revised 2013).
- [22] Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activity. *Pure & Appl. Chem.* **59**, 257-268.
- [23] Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- [24] Bezdek, J. (1981) Fuzzy models and algorithms for pattern recognition and image processing, New York.
- [25] Nelles, O. (2001) Nonlinear System Identification, Springer-Verlag, Berlin.
- [26] Chiu, S.L. (1994) Fuzzy model identification based on cluster estimation. *J. on Intell. Fuzzy Syst.* **2**, 267-278.
- [27] Bezdek, J.C. (1984) Ehrlich R et al. FCM: the fuzzy c-means clustering algorithm. *Comput. and GeoSci.* **10**, 191-203.
- [28] Pedrycz, W. (1990) Processing in relation structures: fuzzy relational equations. *Fuzzy Sets and Syst.* **40**, 87-100.

CAPÍTULO 4
ELEVADA SELETIVIDADE ETANOL/XILITOL
EM LINHAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae*
ADAPTADA À ASSIMILAÇÃO DE XILULOSE



Este capítulo apresenta a metodologia utilizada para a seleção de uma levedura potencialmente produtora de etanol a partir de uma cepa comercial de *S. cerevisiae*. A levedura selecionada foi adaptada ao crescimento em xilulose. Experimentos realizados com as duas linhagens (selvagem e selecionada) mostram que a cepa selecionada apresentou uma seletividade etanol/xilitol mais elevada. Crescimento das linhagens selvagem e selecionada utilizando o meio sólido WLN (do inglês *Wallerstein Laboratory Nutrient Agar*) mostrou que existe uma diferença morfológica entre as duas cepas.

Improved ethanol/xylitol selectivity by *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for D-xylulose uptake

Carlos Alberto Galeano Suarez^o, Inti Doraci Cavalcanti-Montaña[^], Krissia Godoy⁺, Roberto de Campos Giordano^o, Anderson Cunha⁺, Ruy de Sousa Júnior^o and Teresa Cristina Zangirolami^{o,*}

^oDepartment of Chemical Engineering – Federal University of São Carlos

⁺Department of Genetics and Evolution - Federal University of São Carlos

[^]Institute of Chemistry, Chemical Engineering Department, Federal University of Goiás

Rod. Washington Luís – Km 235 – CEP 13565-905 – CP 676 - São Carlos/SP – Brazil

Phone: +(55) (16) 3351 8713, Fax: +(55) (16) 3351-8266

*Corresponding author: teresacz@ufscar.br

ABSTRACT

Biofuels are a renewable, environment-friendly alternative to fossil fuels. For enhanced economic feasibility of second generation bioethanol (2G) production, it is important to use all the fermentable fractions present in sugarcane bagasse (cellulose -C6- and hemicellulose - C5-) and other feedstocks. Xylose, the main sugar found in the C5 fraction, is not assimilated by *S. cerevisiae*, the workhorse for ethanol production worldwide since ancient times. However, this yeast is able to slowly ferment D-xylulose, an isomer of xylose which can be easily obtained using glucose isomerase, generating ethanol and xylitol as main products. The aim of this study was to select a more suitable ethanol producer strain, exhibiting faster

xylulose uptake and lower xylitol production. For 3 months, colonies isolated from commercial Itaiquara baker's yeast (Brazil) were exposed to a sequence of simple evolutionary engineering procedures. Initially, cells adapted to minimal medium were screened by incubating them on solid media prepared with mixtures of complex and minimal components, containing 20 g.L⁻¹ of xilulose and 8.5 g.L⁻¹ of xylose, under aerobic conditions. Next, the selected colonies were incubated anaerobically in minimal solid medium, yielding 20 adapted colonies, which were further cultivated in cuvettes, containing YNB medium without amino acids, supplemented with 20 g.L⁻¹ of xylulose and 8.5 g.L⁻¹ of xylose. Three colonies exhibiting fastest xylulose consumption and lowest xylitol production were identified and fully characterized in terms of morphology, product formation and substrate uptake in shake flask experiments conducted under microaerobic conditions, at 30°C and initial pH 5.2. With a final ethanol concentration of 4.3 g.L⁻¹ for a xylitol production of 0.55g.L⁻¹, the adapted yeast showed selectivity values up to 26 mol ethanol.mol xylitol⁻¹, which is 4 times higher than the maximum selectivity achieved by the wild-type baker's yeast strain.

Keywords: sugar cane bagasse; enzymatic isomerization; hemicellulose; *Saccharomyces cerevisiae*; adaptation process.

INTRODUCTION

Cellulosic residues (among them sugarcane bagasse) have important positive features as raw materials for biofuels production: i) they do not impact significantly the “food-versus-fuels” competition (FURLAN et al., 2013): ii) they are already available at the industrial production site. Sugarcane bagasse is a byproduct from the sugar and alcohol industry in Brazil. This biomass is mainly composed by cellulose (33-51%), hemicellulose (19-34%) and lignin (20-30%) (VAN MARIS et al., 2006). The consolidation of the industrial production of second-generation (2G) bioethanol relies on the improvement of the economics of the process. For this, it is important to use all fermentable fractions present in sugarcane bagasse (cellulose -C6 and hemicellulose -C5) (FURLAN et al., 2012). While the enzymatic hydrolysis of the C6 fraction is quite a challenge (SOUSA et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2013), the alcoholic fermentation of glucose, the main product of C6 degradation, by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains is straightforward. On the other hand, extraction and hydrolysis of C5 fraction can be easily accomplished by weak acid treatment, generating

a hydrolysate rich in xylose (corresponding to ~ 80 % of fermentable sugars) (SILVA, 2013). However, wild *S. cerevisiae* is unable to metabolize xylose (CHU; LEE, 2007), which poses as the major difficulty to set up an industrial process for ethanol production from hemicellulose. In naturally occurring xylose-fermenting yeasts, D-xylose can be converted to D-xylulose by two oxidoreductases involving cofactors NAD(P)H and NAD⁺. D-xylose is initially reduced to xylitol by NAD(P)H-dependent xylose reductase (XR) (EC1.1.1.21), and then xylitol is oxidized to D-xylulose by NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase (XDH) (EC1.1.1.9). Finally, xylulokinase (XK) (EC2.7.1.17) phosphorylates D-xylulose into D-xylulose 5-phosphate, which is further metabolized through the pentose phosphate pathway (PPP). Although *S. cerevisiae* cannot utilize xylose, the genes encoding XR, XDH and XK are present in its genome. However, their expression levels are too low to allow for xylose utilization (MATSUSHIKA et al., 2009) and the NAD(P)H specificity of XR and NAD⁺ of XDH leads to a redox imbalance which has been intensively studied (BRUINENBERG et al., 1986; MEINANDER et al., 1996).

Saccharomyces cerevisiae gathers attributes that enshrines it as the most suitable organism for industrial ethanol production: high ethanol tolerance, tolerance to temperature changes and the ability to convert efficiently sugars into ethanol. Hence, the improvement of xylose assimilation by *S. cerevisiae* has been addressed by several studies. By far, the most common approach is the use of molecular biology tools to incorporate genes of glucose isomerase and key enzymes of the xylose catabolic pathways (VAN MARIS et al., 2006; CHU; LEE, 2007; OLOFSSON et al., 2008; WALFRIDSSON et al., 1996). Since *S. cerevisiae* can metabolize xylulose, the enzyme glucose (xylose) isomerase (GI) (EC5.3.1.5), which converts xylose to xylulose, plays an important role on speeding up xylose metabolism by providing an alternative route leading to xylulose production. The reversible isomerization of xylose to xylulose can be performed *in situ*, as it happens in genetically modified yeasts, or *ex-situ*, using commercially available GI, as it occurs in simultaneous isomerization and fermentation – SIF - process (SILVA et al., 2011; AQUINO, 2013; MORAES, 2013; CHANDRAKANT; BISARIA, 2000; NAKATA et al., 2009).

SIF experiments carried out with different industrial *S. cerevisiae* strains showed that the fermentation was the rate limiting step (AQUINO, 2013; MORAES, 2013; SILVA, 2013), probably due to low consumption rate of xylulose by *S. cerevisiae*. In fact, this sugar is catabolized through the pentose phosphate pathway (PPP) and *S. cerevisiae* has low activity of the xylulokinase enzyme and lower capacity of xylulose phosphorylation than

other yeasts. Furthermore, within the cell, PPP plays a totally different role from glycolysis and their fluxes are naturally smaller (JOHANSSON and HAHN-HAGERDAL, 2002).

Due to the extremely high cost of commercial xylulose and the difficulties inherent to its in-house production (OLSSON et al., 1994; CHIANG et al., 1981a), there are few studies addressing xylulose fermentation in the literature. Some have studied the activities of key enzymes (transketolase and transaldolase) during the metabolism of xylulose via the non-oxidative pentose phosphate, which have been identified as limiting for fermentation. This evidence was supported by a significant accumulation of the metabolite sedoheptulose-7-phosphate during the fermentation of xylulose performed by Senac and Hahn-Hägerdal (1990). Transketolase catalyzes the conversion of xylulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate to sedoheptulose-7-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate, whereas transaldolase catalyzes the conversion of sedoheptulose-7-phosphate and glyceraldehyde-3-phosphate to fructose-6-phosphate and erythrose-4-phosphate (WALFRIDSSON et al. 1995). Glyceraldehyde-3-phosphate and fructose-6-phosphate are converted to pyruvate. In anaerobic conditions, pyruvate is decarboxylated to acetaldehyde by pyruvate decarboxylase, which is reduced to ethanol by alcohol dehydrogenase. Under aerobic conditions pyruvate is oxidized by the citric acid cycle in the respiratory chain (CHU; LEE, 2007). In other work, Chiang et al. (1981b) studied the conversion of xylulose to ethanol by commercial *S. cerevisiae* using a pentose syrup (xylose-xylulose mixture) as substrate. The authors found increased ethanol production directly proportional to the cell density, obtaining the maximum rate of ethanol production using a cell concentration of 150 g L^{-1} . The use of cell concentrations below 100 g L^{-1} has substantially increased fermentation time. The optimum temperature was set to $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and pH between 4 and 6. According to the authors, the generation of by-products such as xylitol and glycerol was favored at high pH (6-7) and temperatures lower than $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Senac e Hahn-Hagerdal (1990) evaluated fermenting mixtures of glucose-xylulose (267-267 mM) and xylulose-xylose (333-267 mM) by *S. cerevisiae* ATCC 24860 (16 gcel.L^{-1}) at $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 300 rpm, under anaerobic conditions, in batch reactor. The rates of sugar consumption were significantly different: $3.94 \text{ mmol.gcel}^{-1}.\text{h}^{-1}$ for glucose and $0.39 \text{ mmol.gcel}^{-1}.\text{h}^{-1}$ to xylulose. All glucose was consumed within 4 hours, generating about 500 mM of ethanol. On the other hand, about 100 mM of xylulose remained at 60 hours. In both cases, the byproducts glycerol, xylitol and arabitol (besides traces of acetic acid and succinic acid) were identified. Finally, in a more recent study, Yuan et al. (2011) presented their results for the fermentation of xylulose by *S. cerevisiae*. Xylose has been previously isomerized with glucose isomerase co-immobilized in pellets with urease (as

described by RAO et al., 2008) and adding sodium tetraborate in a molar ratio of borate/xylose = 0.125. Two isomerization processes were carried out. Isomerized xylose was 55% in the first and 87% in the second. The authors also evaluated the fermentation of a glucose-xylose mixture (90-30 gL⁻¹). In the cellular concentrations of 50, 100 and 200 gL⁻¹, all glucose was consumed in less than 5 hours. On the other hand, in all tests, xylose still remained after 28 hours. Sodium azide (4.6 mM) was added as a respiratory inhibitor to restrict formation of xylitol. As a result, the formation of by-products was about half of that observed without azide. However, xylose uptake was even slower.

For this reason, a rapid and efficient conversion of this pentose is required to achieve high yields in ethanol which make the xylose fermentation process feasible. In this context, evolutionary engineering poses as a powerful approach, which has found widespread usage for improving industrially important and genetically complex properties of *S. cerevisiae* and other microorganisms. This alternative approach has not some of the limitations of metabolic engineering, such as extensive genetic and metabolic information requirement on the organism of interest, complexity of cellular physiological responses and difficulties of cloning in the industrial context. Evolutionary engineering is based on continuous evolution procedures to obtain a desired phenotype by imposing one or more selective pressures. A simple method for microbial strain development is the direct selection on a solid culture medium that provides the selective pressure for improved mutants, such as high salt and metal concentrations, high or low temperatures. The major drawback of this method, however, is the fact that repeated cycles of mutation/selection on solid plates may result in highly specialized but crippled mutant strains (ÇAKAR et al., 2005). Opposed to repeated cycles of mutation and selection of colonies on solid culture plates, repeated batch or prolonged chemostat cultivations can be performed in the presence of a selective pressure. Thus, in serial batch cultures or in chemostat, the ratio of the number of cells with a desired phenotype to the total number of cells in the culture will periodically increase, and the desired cells will dominate the culture (DYKHUIZEN AND HARTL, 1983; SAUER, 2001).

The major recent applications of evolutionary engineering with *Saccharomyces cerevisiae*, which are reproduced at Table 4.1, can be divided in two general categories: i) screening for mutants with improved substrate utilization or product formation features; ii) selection of mutants with better stress resistance to adverse conditions (ÇAKAR et al., 2011). From Table 4.1, we also observe that there are few studies where evolutionary engineering was applied to improve ethanol production from pentoses (arabinose and xylose). However, the use of evolutionary engineering to search for evolved mutants of *S. cerevisiae*, with

enhanced ethanol formation and reduced xylitol production, has not been reported so far, up to our knowledge.

Thus, this work aims to apply simple evolutionary engineering tools, isolate *S. cerevisiae* mutants more suitable for ethanol production from D-xylulose and compare their phenotypic and genetic characteristics with those from wild-type strain.

Table 4.1– Major applications of evolutionary engineering in *Saccharomyces cerevisiae*.

Evolutionary engineering application	Selected references
Ethanol fermentation using xylose	Sonderegger and Sauer (2003), Kuyper et al. (2005), Van Maris <i>et al.</i> (2007), Liu and Hu (2010)
Ethanol fermentation using arabinose	Wisselink <i>et al.</i> (2007)
Ethanol fermentation using mixed substrates	Wisselink <i>et al.</i> (2009), Sanchez <i>et al.</i> (2010)
Ethanol fermentation using lactose	Guimaraes <i>et al.</i> (2008a, b)
Increased flux through the pentose phosphate pathway using gluconate	Cadiere <i>et al.</i> (2011)
Four-carbon dicarboxylic acid production	Zelle et al. (2010)
Improved resistance to inhibitory compounds of lignocellulosic biomass	Tomas-Pejo <i>et al.</i> (2010), Wright <i>et al.</i> (2011)
Improved freeze tolerance	Teunissen <i>et al.</i> (2002)
Improved ethanol tolerance	Stanley <i>et al.</i> (2010a, b), Argueso et al. (2009)
Improved multistress resistance	Çakar <i>et al.</i> (2005), Argueso et al. (2009)
Improved cobalt resistance	Çakar <i>et al.</i> (2009)

*adapte from Çakar *et al.* 2011

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

A suspension prepared with fresh baker's yeast (Itaiquara, Brazil) was diluted, plated on solid medium (first with 20 g.L⁻¹ glucose, 10 g.L⁻¹ yeast extract and 20 g.L⁻¹ peptone, and then transferred plates were glucose was replaced by xylulose) and incubated for 48 h at 30 °C. To prepare the stock culture, a colony was isolated, transferred to 1 mL medium containing 20 % of glycerol and stored at – 80 °C.

Media Preparation

D-Xylulose enriched syrup

A syrup with high D-xylulose concentration was prepared according to the procedure described by Chiang et al, 1981a. A solution containing 700 g.L⁻¹ of D-xylose and MgSO₄·7H₂O 3 mM was isomerized into xylulose by immobilized glucose isomerase at 68°C and pH 7.0 in a bench-scale reactor. Samples were taken at different reaction times to determine xylose and xylulose concentrations. At the equilibrium, the isomerized sugar mixture contained about 27% of D-xylulose and 73% of D-xylose. To prepare a mixture with a high D-xylulose content, the resulting D-xylose/xylulose mixture was concentrated in a rotary evaporator at 45°C to one fourth of the original volume. Absolute alcohol (3 volumes of the concentrated sugar mixture) was then added to extract D-xylulose at 4°C. The resulting extract rich in xylulose was then evaporated and lyophilized to remove ethanol. The final sugar mixture contained 70% of D-xylulose and 30% of D-xylose.

Solid media for evolutionary engineering experiments

Complex (YP, containing yeast extract 10 g.L⁻¹, peptone 20 g.L⁻¹ and agar 20 g.L⁻¹) and defined minimal (MgSO₄·7H₂O, 2 g.L⁻¹, KH₂PO₄, 5 g.L⁻¹, urea, 1.5 g.L⁻¹) media, supplemented with 20 g.L⁻¹ of xilulose, 8.5 g.L⁻¹ of xylose, 20 g.L⁻¹ of agar and 4 ppm of antibiotic Kamoran, pH 5.2, were mixed in following ratios (complex:defined) to prepare the solid medium employed for the adaptation experiments: 90:10; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80; 10:90; 5:95; 0:100. For plates containing 100 % minimal medium 10 mg.L⁻¹ of ergosterol and 420 mg.L⁻¹ of Tween 80 were also added. Substrate and media were sterilized by filtration.

Liquid media for evolutionary engineering experiments

Yeast Nitrogen Base without Amino Acids (YNB w/o amino acids) was used in the preliminary screening experiments carried out in 1.5 mL cuvettes. The composition, per liter, was: (NH₄)₂SO₄ 5.0 g, Biotin 2.0 µg, Calcium Pantothenate 400.0 µg, Folic Acid 2.0 µg, Inositol 2,000.0 µg, Nicotinic Acid 400.0 µg, p-Aminobenzoic Acid 200.0 µg, Pyridoxine HCl 400.0 µg, Riboflavin 200.0 µg, Thiamine HCl 400.0 µg, Citric Acid 0.1 g. Trace Elements: Boric Acid 500.0 µg, CuSO₄ 40.0 µg, KI 100.0 µg, FeCl₃ 200.0 µg, MnSO₄ 400.0 µg, Na₂MoO₄ 200.0 µg, ZnSO₄ 400.0 µg. Salts: KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, NaCl 0.1 g, CaCl₂ 0.1 g, ergosterol 10 mg, Tween 80 420 mg and D-xylulose 20 g and xylose 8.5 g.

Liquid media for characterization of wild-type and selected mutant strains

YPD medium containing yeast extract (10 g.L⁻¹), peptone (20 g.L⁻¹) and glucose (20 g.L⁻¹), pH 5.2, was used for inoculum preparation. Defined minimal (MgSO₄·7H₂O, 2 g.L⁻¹, KH₂PO₄, 5 g.L⁻¹, urea, 1.5 g.L⁻¹) and YNB without Amino Acids media, supplemented with 20 g.L⁻¹ of xilulose, 6 g.L⁻¹ of xylose, and 4 ppm of antibiotic Kamoran, pH 5.2, were used in the experiments conducted in falcon tubes to characterize substrate consumption and product formation.

Analytical methods

Cell Concentration

Dry cell mass was determined by centrifuging 2 ml of cell suspension in a refrigerated centrifuge, followed by drying at 60 °C for 24h. Cell concentration was also monitored by measuring the optical density (OD) at 600 nm. The correlation between dry cell weight (DCW) and optical density (DO_{600nm}) was $DCW (g.L^{-1}) = 0.504 \times DO_{600nm}$.

Carbon source and metabolite concentrations

Xylulose, xylitol, ethanol and organic acids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Shimadzu 10AD (Japan), using Waters SUGAR-PACK I column, at 70 °C, Milli-Q water as eluent, 1.0 mL.min⁻¹. Xylulose, xylitol, ethanol were quantified by refractometry, and organic acids were determined by UV (210 nm).

Experimental Procedure

Evolutionary engineering experiments

Loopfuls of stock suspension of wild-type Itaiquara baker's yeast cells were initially transferred to 4 plates containing of 90 % complex medium and 10 % defined medium and incubated at 30 °C for ~ 5 days, aerobically. The largest colonies were subsequently transferred to other plates where the ratio complex to defined medium was decreased to 80:20, and incubated at the same conditions. This procedure was repeated until mutants able to grow aerobically on 100% minimal medium and D-xylulose as carbon source were isolated. Next, the colonies were labeled, transferred to new plates containing defined

medium and D-xylulose and incubated under industrial nitrogen atmosphere (99.5 % N₂ and 0.2 % O₂) at 30 °C, to expose the mutant cells to fermentative conditions. After a period of ~ 4 weeks of incubation under aerobic or fermentative conditions, twenty colonies were isolated, labeled and a loopful of each was transferred to capped polystyrene cuvettes with a volume of 1.5 ml containing 1.4 ml of media YNB with 20 g.L⁻¹ of D-xylulose and 8.5 g.L⁻¹ of xylose. The cuvettes were maintained at 30°C and static conditions, for 12 days. Every day, biomass concentration was monitored by measuring optical density of cell suspensions. Three colonies (1, 9 and 11) which had the best performance on xylulose consumption and the lowest xylitol production were harvested, labeled as selected colonies (SC1, SC9 and SC11) and stored at – 80 °C as cell suspensions in defined medium containing glycerol 20 %.

Characterization of wild-type and selected mutant strains

a) Inoculum preparation

The three selected colonies of *S. cerevisiae* stored in cryovials were transferred to petri dishes containing 20 mL of solid minimal medium with D-xylulose (20 g.L⁻¹) and xylose (8.5 g.L⁻¹) and incubated at 30°C for 72 h, under aerobic conditions. For pre-inoculum preparation, one colony was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of YPD medium with glucose and growth was carried out at 30° C and 250 rpm, for 20 h up to OD ~ 8. Finally, 10 mL of pre-inoculum suspension was used to inoculate 500 mL flasks containing 150 mL of YPD medium with glucose. Inoculum was incubated at 30° C and 250 rpm for 20 h, up to OD ~ 8. The cell suspension was then washed with 0.9% NaCl solution to remove any residue of glucose and other nutrients. The same procedure was used to prepare the inoculum for the wild-type strain, except for the use of solid minimal medium containing glucose for activation of stock cell suspension.

b) D-Xylulose fermentations

A volume of 2 mL of previously described inoculum suspension, for each selected colony and for the wild-type, was transferred to 15 mL-Falcon tubes containing 12 mL of minimal or YNB media and incubated at 30 °C, initial pH of 5.0, and 100 rpm. Samples were collected and used for OD and dry cell weight measurements. The supernatant, obtained after centrifugation for 15 min at 10,600 g and 4°C, was used for monitoring the consumption of D-xylulose and the production of metabolites.

c) Morphological analysis of colonies on solid medium

The morphological characterization of both strains (wild-type and mutant) was conducted by plating cells harvested directly from the glycerol stock containing wild-type or selected mutant strains on WLN medium. The WLN medium composition (per liter) was as follows: casein hydrolysate 5.0 g, yeast extract 4.0 g, dextrose 50.0 g, dihydrogen phosphate 0.55 g, potassium chloride 0.425 g, calcium chloride 0.125 g, magnesium sulfate 0.125 g, ferric chloride 0.0025 g, manganese sulfate 0.0025 g, bromocresol green 0.022 g and bacteriological agar 20.0 g. These plates were incubated for approximately 48 hours at 30 °C. After the growth of the colonies, images were obtained using photo docuenter of BioRad Gel Doc XR.

Estimation of yields, specific growth rates and productivities

From the results obtained in cultures of the studied *S. cerevisiae* strains, the product yield coefficients ($Y_{\text{ETOH/xylulose}}$ and $Y_{\text{XOH/xylulose}}$) and specific growth rates (μ) were estimated by linear regression according to Equations 4.1, 4.2 and 4.3 (SHULER, 2002).

$$Y_{\text{ETOH}} = \frac{\Delta C_{\text{ETOH}}}{-\Delta C_{\text{Xylulose}}} \quad (4.1)$$

$$Y_{\text{XOH}} = \frac{\Delta C_{\text{XOH}}}{-\Delta C_{\text{Xylulose}}} \quad (4.2)$$

$$\mu = \frac{\ln(C_X/C_{x0})}{\Delta t} \quad (4.3)$$

$$\Delta C_{\text{ETOH}} = C_{\text{ETOH}}(t) - C_{\text{ETOH}0}; \Delta C_{\text{Xylulose}} = C_{\text{Xylulose}}(t) - C_{\text{Xylulose}0}; \Delta C_{\text{XOH}} = C_{\text{XOH}}(t) - C_{\text{XOH}0}$$

Where C_X is the biomass concentration, C_{Xylulose} is the xylulose concentration, C_{ETOH} is the ethanol concentration and C_{XOH} is the xylitol concentration. Index “0” refers to initial concentrations.

D-xylulose uptake rate ($\mu_{D\text{-xylulose}}$) was also estimated, as described by Equation 4.4.

$$\mu_{D\text{-xylulose}} = \frac{\Delta C_{\text{Xylulose}}}{\Delta t C_x} \quad (4.4)$$

In addition, ethanol specific productivity - Pr_{ETOH} was assessed by equation 4.5

$$Pr_{ETOH} = \frac{\Delta C_{ETOH_final}}{\Delta t_{final} C_{X_final}} \quad (4.5)$$

Where ΔC_{ETOH_final} is the final ethanol concentration, C_{X_final} is the final biomass concentration and Δt_{final} is the elapsed time at the end of cultivation.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of wild-type strain from Itaiquara baker's yeast

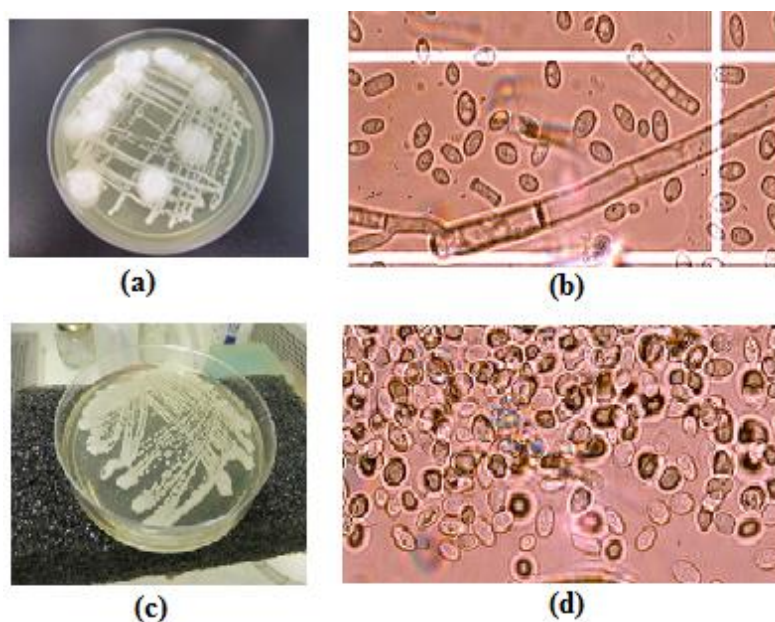
Commercial baker's yeast (Itaiquara, Brazil) was the source of the wild-type *Saccharomyces cerevisiae* strain employed in the evolutionary engineering experiments carried out to isolate mutants better adapted to xylulose. This strain was chosen because it showed the best ethanol production, productivity and selectivity values (Table 4.2) in previous SIF studies when compared with 5 other *S. cerevisiae* strains, namely baker's yeast Fleischmann (Brazil), industrial strains BG-1, CAT-1 e PE-2 and laboratory strain CEN.PK113-7D (MORAES, 2013).

Table 4.2 - Main results from SIF experiments carried out with different *S. cerevisiae* strains. T = 35 °C; initial xylose concentration = ~ 65 g.L⁻¹; initial biomass concentration = ~ 50 g_{DCW}.L⁻¹ (yeast cells immobilized in calcium alginate beads). Adapted from Moraes, 2013.

<i>S. cerevisiae</i> strain	Ethanol production (g.L ⁻¹)	Ethanol productivity (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Selectivity (mol ethanol.mol xylitol ⁻¹)
Itaiquara	22.9	2.1	4.7
Fleischmann	17.3	0.7	3.0
BG-1	20.3	0.8	4.3
CAT-1	19.0	0.8	3.1
PE-2	12.1	0.5	2.7
CEN.PK113-7D	15.4	1.3	2.5

Itaiquara baker's yeast available commercially contains contaminants. Figures 4.1 (a) and (b) show organisms found in culture medium after 1 h activation in YP liquid medium containing D-xylulose as carbon source. The isolation of the wild-type strain, free of contaminants (Figures 4.1 c and d), was carried out by sequential propagation on YP solid medium, also containing xylulose. The stock solution was prepared from the isolated wild-type strain and employed in the selective pressure experiments.

Figure 4.1 - (a) Colonies observed in Itaiquara baker's yeast YPD plates, (b) Yeast cells and other microorganisms observed in microscope (200x magnification) for Itaiquara baker's yeast suspension, (c) Colonies observed in YPD plates for the isolated wild-type strain, (d) Yeast cells observed in microscope (200x magnification) the isolated wild-type strain.

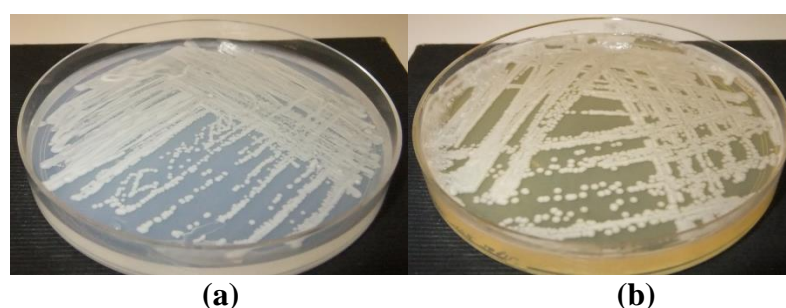


Evolutionary engineering experiments

The selection of a mutant better adapted to growth on D-xylulose was accomplished by exposing cells from wild-type strain to distinct selective pressures, including the carbon source itself, medium composition (complex and minimal media) as well as oxygen limitation. This procedure may favor the expression of determined genes, directing yeast evolution towards the acquisition of characteristics that will enable adaptation to the new environment. In this context, by natural selection, the genes of interest (in our case, those related to xylulose metabolism) will most likely be expressed and propagated to the next generation (ÇAKAR et al., 2012).

The first challenge was to search for mutants capable of growing in minimal medium containing D-xylulose. Since media composition strongly impacts production costs, for the production of a commodity such as ethanol, the use of expensive medium components like peptone and yeast extract is prohibitive. In addition, experiments in defined medium are more suitable for studies about D-xylulose metabolism. Thus, a series of consecutive propagations, starting from a sole colony, was carried out in solid media prepared with different ratios of complex and minimal defined media. Initially, wild-type baker's yeast cells harvested from cryovials were incubated in plates containing 90 % complex medium and 10 % defined minimal medium (Figure 4.2b), having D-xylulose as main carbon source. Colonies formed in these plates were transferred to new plates containing a new mixture of complex and minimal media (80%:20%) and the new plates were incubated until growth was observed. This procedure was repeated and formed colonies were transferred to plates prepared with decreasing percentages of complex medium (80, 60, 40, 20, 10, 5 and 0 %). At the end of this series of evolutionary engineering experiments, the adapted cells were able to grow in plates containing only minimal medium (Figure 4.2a) and D-xylulose as carbon source.

Figure 4.2 - (a) Growth of mutant strains on minimal defined medium with D-xylulose; (b) Growth of wild-type strain on YP medium with D-xylulose.



The next challenge consisted on exposing the cells adapted to minimal medium and fermentative conditions in order to search for mutants able to produce ethanol. Thus, adapted cells were propagated in new plates containing defined minimal medium and D-xylulose and incubated under industrial nitrogen atmosphere. Twenty colonies grown in minimal medium, either on aerobic or fermentative conditions, were then selected and exposed to the last set of evolutionary engineering experiments, where cells were cultivated in cuvettes containing a solution of D-xylulose and YNB media without amino acids, under

static conditions. Instead of minimal medium, YNB medium supplemented with ergosterol was used for this series of fermentative experiments. YNB medium contains several essential nutrients that fulfill all cell metabolic needs even when cultivated under unfavorable conditions.

These experiments were followed by daily measures of optical density. When each experiment was interrupted, the suspension was centrifuged and the final concentrations of xylulose and xylitol in the supernatant were assessed. Table 4.3 gathers the main results achieved in cuvette cultures conducted under fermentative conditions, including initial OD values, biomass formation expressed as OD variation ($\Delta OD_{600nm} = OD_{final} - OD_{initial}$), the overall concentration of D-xylulose consumed (ΔC_{xylul}) and the concentration of xylitol accumulated at the end of the experiment ($C_{xylitol}$).

Table 4.3 - Evolutionary engineering experiments with minimal medium adapted mutants: overall variation of optical density, D-xylulose consumption and xylitol formation for cultivations under fermentative conditions. Temperature of 30 °C and pH 5.2.

Colony ID	Time (h)	OD _{in_600nm}	ΔOD_{600nm}^a	$\Delta C_{xylul} \cdot g \cdot L^{-1} b$	$C_{xylitol} g \cdot L^{-1}$
1	196.5	0.13	0.58	2.57	0.42
2	240	0.18	0.54	1.99	0.98
3	168	0.09	0.53	1.20	0.68
4	240	0.12	0.38	2.11	0.71
5	264	0.09	0.71	3.27	2.45
6	240	0.13	0.66	3.61	0.99
7	196.5	0.11	0.65	2.31	0.55
8	218.5	0.12	0.65	3.62	1.07
9	196.5	0.09	0.73	2.70	0.59
10	196.5	0.11	0.71	2.93	0.78
11	168	0.12	0.58	3.62	0.51
12	240	0.11	0.71	2.74	0.87
13	288	0.16	0.71	3.49	1.90
14	288	0.20	0.76	3.05	1.85
15	240	0.26	0.48	0.90	0.83
16	196.5	0.12	0.55	1.62	0.37
17	196.5	0.20	0.37	0.72	0.33
18	288	0.14	0.64	1.54	2.07
19	288	0.19	0.53	2.62	1.38
20	288	0.18	0.62	1.50	1.93

OD_{in} = initial OD; **a.** $\Delta OD_{600nm} = OD_{final} - OD_{initial}$ **b.** $\Delta C_{xylul} = C_{xylulose_initial} - C_{xylulose_final}$

The initial xylulose concentration was 20 g.L^{-1} for all suspensions. The most promising mutants for ethanol production are those presenting higher ΔOD and ΔC_{xylul} values together with lower C_{xylitol} . The higher values for biomass formation were observed for colonies 5, 9, 10, 12, 13 and 14. Colony 9 also exhibited low xylitol formation, together with fairly good xylulose uptake ability, and it was therefore selected for further investigation. Colonies 5, 10, 12, 13 and 14 were discarded due to high xylitol formation. On the other hand, colonies 1, 16 and 17 showed very little xylitol formation, but only colony 1 had good xylulose consumption and it was also chosen. Finally, colony 11 was the third one selected, due to its high xylulose uptake in the shortest cultivation time (fast uptake rate) and low xylitol production. Colonies 6 and 8 also showed high substrate consumption, but again they were discarded due to the intense xylitol formation.

Besides xylitol and xylulose, concentrations of xylose and ethanol at the end of cuvette cultures were also assessed (data not shown). As expected, xylose concentration remained at its initial value ($\sim 8.5 \text{ g.L}^{-1}$) for all experiments. On the other hand, due to the high ethanol volatility, high temperature employed ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) and long experimental period (8 – 12 days), ethanol formation was masked by its evaporation. For this reason, final ethanol concentration was not considered as a performance index to select the best strains.

Characterization of selected colonies 1, 9 and 11

Growth, metabolite formation and D-xylulose consumption for the 3 selected colonies were closely followed during cultivations carried out under fermentative conditions, using defined minimal medium. The main results are represented at Figure 4.3. From these experimental data, yield coefficients ($Y_{\text{EtOH/D-xylulose}}$, $Y_{\text{XOH/D-xylulose}}$), specific rate of growth and substrate uptake (μ and $\mu_{\text{D-xylulose}}$) as well as ethanol productivity (Pr_{EtOH}) were estimated for colonies 1, 9 and 11 (Table 4.4). From Figure 4.3 we can observe that growth took place for all colonies during the first 12 - 18 h of cultivation, but at very low specific growth rates, ranging from 0.011 to 0.023 h^{-1} (Table 4.4). The biomass formation observed at the beginning of the fermentations was supported by the dissolved oxygen available. However, since oxygen transfer was very poor (falcon tubes were almost full), as soon as oxygen approached depletion, conditions close to anaerobiosis was established and a biomass concentrations remained fairly stable. For colonies 1 and 9, ethanol and xylitol production occurred

simultaneously with the growth phase, together with intense D-xylulose uptake (Figure 4.3 a, b). Colony 11 (Figure 4.3c), on the other hand, showed very different profiles: D-xylulose was slowly assimilated and ethanol production was observed throughout the cultivation. In addition, xylitol production for colony 11 was 6 to 7 times inferior to the values observed for colonies 1 and 9. For all fermentations, pH decreased from its initial value (5.2) to ~ 4.6 (Figure 4.3).

As Figure 4.3 suggests, colony 11 seems to direct more efficiently substrate flux towards ethanol formation. Whereas ethanol yield exhibited by colony 11 was ~ 13 % higher than the values achieved by colonies 1 and 9, xylitol yield was 3 times lower (Table 4.4). Furthermore, the xylulose uptake rates are higher for colonies 1 and 9, leading to D-xylulose exhaustion within 96 h of cultivation. Yet, for colony 11, after 96 h, only about 53 % of initial substrate concentration was consumed, what suggests that the slower xylulose uptake might have favored xylitol production. This fact can be explained by D-xylulose metabolism. *S. cerevisiae* catabolyzes this pentose through Pentose Phosphate Pathway (PPP), which has low xylulokinase activity, leading to a reduced capacity of D-xylulose phosphorylation (RICHARD et al., 2000). Substrate accumulation inside the cell can cause an increase on xylitol production, which is afterwards secreted by the cell using specific transporters. Figures 4.3 (a) and (b) indicate that for colonies 1 and 9 D-xylulose metabolism followed the pattern described above during the first 24 h of cultivation, which lead to high xylitol production. High substrate uptake flux combined with low PPP fluxes generate a probable accumulation of D-xylulose intracellularly, which will be processed through other metabolic pathways. In this case, the more feasible route would be the xylitol formation reaction, where D-xylulose is converted to xylitol by xylitol-dehydrogenase using NADH as cofactor. Conversely, due the lower substrate uptake rate featured by colony 11, intracellular D-xylulose accumulation is reduced, activation of alternative pathways is minimized and less xylitol is formed. Thus, this mutant is more efficient on directing D-xylulose towards the formation of the product of interest and its ethanol/xylitol selectivity reaches 25.0 (molar basis). This value is significantly superior than the selectivity achieved by colonies 1 and 9, being 9.4 and 8.4 (ethanol moles).(xylitol moles)⁻¹, respectively.

Figure 4.3 - Time evolution of cell concentration, consumption of D-xylulose and formation of metabolites during cultivation of *S. cerevisiae* under fermentative conditions, minimal defined medium. Temperature of 30 °C and pH 5.2 (a) selected colony 1, (b) selected colony 9, (c) selected colony 11 (experiments in duplicate).

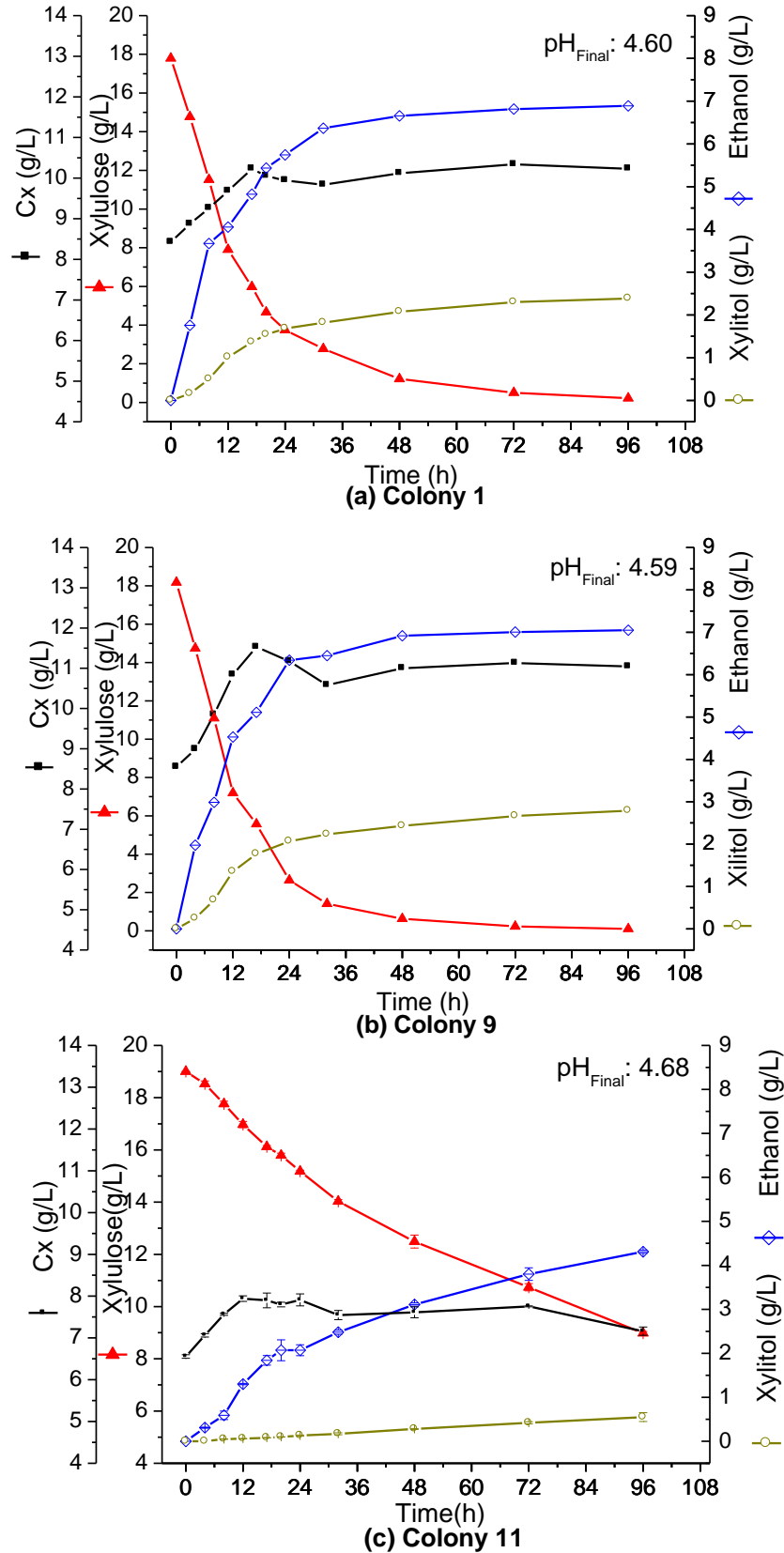


Table 4.4 - Cultures performance indexes: specific growth rates (μ), cell/D-xylulose yields ($Y_{x/s}$), D-xylulose assimilation rate ($\mu_{D\text{-xylulose}}$), specific productivity (Pr_{EtOH}), ethanol/D-xylulose yields ($Y_{EtOH/S}$) and xylitol/D-xylulose yields ($Y_{XOH/S}$) for 3 colonies selected in shake cultures. Temperature 30 °C, pH 5.2.

Colony	Specific growth rate (μ)	Specific productivity (Pr_{EtOH})	Ethanol yield ($Y_{EtOH/S}$)	Xylitol yield ($Y_{EtOH/S}$)	D-xylulose uptake rate ($\mu_{D\text{-xylulose}}$)
N°	(h ⁻¹)	gEthanol·g _{cell} ⁻¹ ·h ⁻¹	gEthanol·gD-xylulose ⁻¹	gXylitol·gD-xylulose ⁻¹	gD-xylulose·g _{cell} ⁻¹ ·h ⁻¹
1	0.011±0.001	0.007	0.372±0.019	0.139±0.007	0.019
9	0.023±0.003	0.007	0.375±0.010	0.153±0.008	0.018
11*	0.016±0.001	0.006	0.427±0.024	0.053±0.005	0.014

*Experiment in duplicate

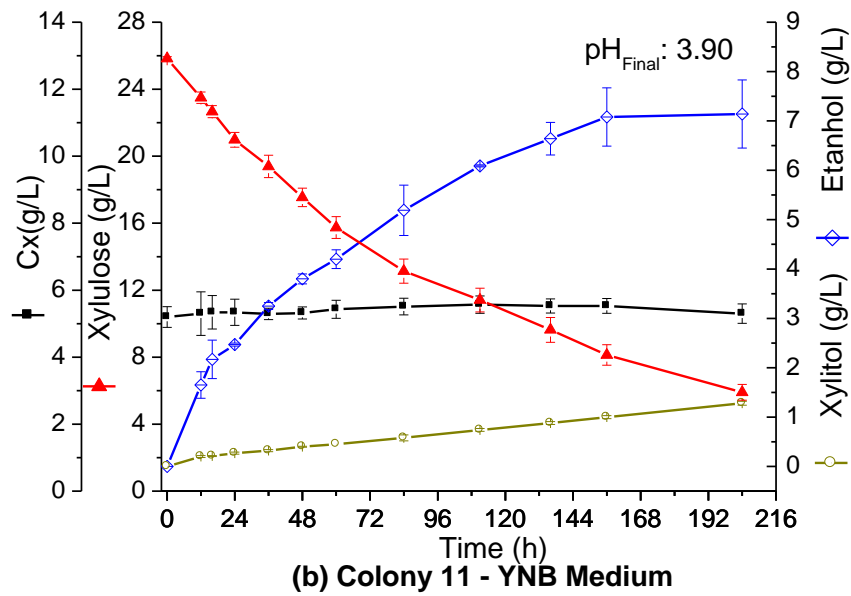
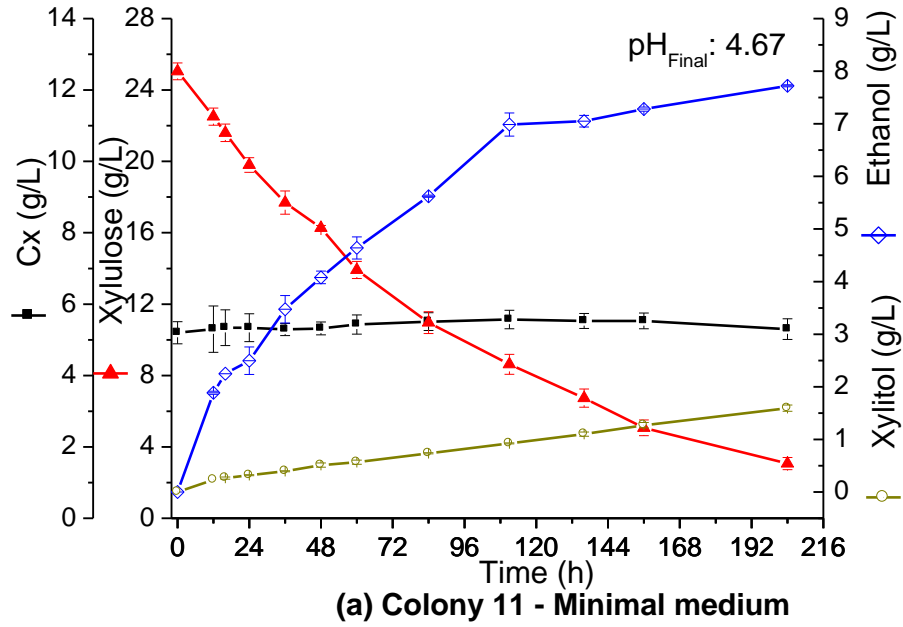
Further studies with the selected mutant (colony 11) and comparison with wild-type *S. cerevisiae*

Although colonies 1 and 9 show more efficient D-xylulose uptake and reach higher final ethanol concentrations in shorter batches, colony 11 was selected for further studies due to its high selectivity towards ethanol formation. In fact, faster xylulose uptake and ethanol production, with shorter fermentation times, could be attained with colony 11 by using a higher initial biomass concentration. On the other hand, only at reduced initial xylulose concentrations, colonies 1 and 9 would (probably) form less xylitol, which is not an interesting condition for running an ethanol production process. In the followings, cultivation of colony 11 in different media and its comparison with original *S. cerevisiae* strain isolated from Itaiquara baker's yeast will be addressed.

Influence of medium composition on D-xylulose fermentation (colony 11)

The absence of growth during the last 72 h observed in previous experiments (Figure 4.3), which were carried out with minimal defined medium, could be related to shortage of other nutrients or nitrogen source. Thus, the performance of colony 11 when cultivated in different medium formulations (minimal defined and YNB) was evaluated. Figure 4.4 shows the data describing biomass concentration, substrate consumption and product formation for experiments carried out with both media.

Figure 4.4 - Evolution of cell concentration, consumption of D-xylulose and formation of products during cultivation of *S. cerevisiae* under fermentative conditions. Temperature of 30 °C and pH 5.2 (a) selected colony 11 with minimal medium. (b) selected colony 11 with YNB medium.



YNB medium contains vitamins (biotin, riboflavin, thiamine, calcium pantothenate, folic acid), several salts, trace elements and other important nutrients. Nevertheless, growth was not observed in either minimal or YNB media, as Figure 4.4 shows. The patterns for substrate uptake ($\mu_{D\text{-xylulose}} = 0.017 \text{ g}_{D\text{-xylulose}} \cdot \text{g}_{\text{cell}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) as well as ethanol production ($\sim 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) were also similar for both media. A bigger pH decrease (to 3.9, Figure 4.4b) was observed for YNB medium because it contains ammonium sulphate as nitrogen source, whereas minimal medium contains urea. Consequently, the ethanol yield coefficients were also in the same range (Table 4.5).

These results show that absence of growth was not caused by nutrients limitation. Instead, it seems that substrate assimilation, besides D-xylulose conversion into ethanol and xylitol, is significantly driven to meet the maintenance requirements of the cell. Therefore, the use of YNB medium, which is richer in nutrients (and much more expensive), did not contribute to improve ethanol production from D-xylulose. For this reason, only minimal defined medium was employed for further studies.

It is also worthy to mention that a selectivity of 20 (ethanol moles).(xylitol moles)⁻¹ was achieved in the experiments comparing minimal and YNB media (Figure 4.4). This value is half of the corresponding selectivity previously estimated for colony 11 (Table 4.5), but still significantly higher than the selectivity obtained with colonies 1 and 9 (Figures 4.3 a, b). Comparing Figures 4.3c and 4.4, we observe that the decrease in selectivity was caused by an increase in xylitol production. Changes in xylitol production profiles are driven by oxygen availability. When *S. cerevisiae* is cultivated in strictly anaerobic conditions, D-xylulose is mainly converted to xylitol by xylitol-dehydrogenase, making possible co-factor NAD⁺ regeneration and ATP production. On the other hand, in fully aerobic cultivations, carbon will be directed towards biomass formation, leading to low ethanol production. Only within a defined range of oxygen limited conditions, ethanol production is favored and xylitol formation is reduced. Experiments presented at Figures 4.3 and 4.4 were carried out in falcon tubes, where a tight control of oxygen supply is rather difficult. Although incubation conditions were exactly the same (falcon volume, medium volume and rotation speed), Figure 4.4 suggests that less oxygen was available for these experiments since initial growth was not observed (see Figure 4.3), what also explains the intensified formation of xylitol.

Comparison between selected mutant (colony 11) and wild-type *S. cerevisiae*

D-xylulose fermentations with the wild-type strain of *S. cerevisiae*, directly isolated from Itaiquara baker's yeast and stored, were carried out so that it could be compared to the mutant isolated from evolutionary engineering experiments. Figure 4.5 presents the profiles for substrate uptake as well ethanol and xylitol production. Comparing to Figures 4.3 and 4.4, we clearly observe that ethanol production as well as D-xylulose uptake ($0.011 \text{ g}_{\text{D-xylulose}} \cdot \text{g}_{\text{DW}} \cdot \text{h}^{-1}$) for the wild-type are much slower than the patterns exhibited by the selected colonies 1, 9 and 11. For the wild-type, final ethanol and xylitol concentrations reached ~ 4.7 and $2.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, after more than 10 days of cultivation. A decrease in biomass concentration took place 5 days after the onset of the experiments, despite the high xylulose concentration available during this period (between 14 and $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Low ethanol production and high xylitol formation lead to a reduced selectivity value of $6.76 \text{ (ethanol moles)} \cdot \text{(xylitol moles)}^{-1}$, which is ~ 4 times smaller than the value achieved by colony 11 (Table 4.5).

Table 4.5 gathers the main performance indexes for the selected mutant (colony 11) and the wild-type yeast. The selected mutant differs significantly from the wild-type for all parameters evaluated. In addition, both strains were cultivated in 2 WLN agar plates and further compared in terms of morphology. WLN medium is suitable for comparing yeasts because it highlights the differences on color and morphology of their colonies (ANDREWS, 1992). Figure 4.6 show the colonies formed by the wild-type and selected mutant strains after 2 days of incubation on WLN medium. Colonies formed by mutant strain exhibited a darker green, whereas the wild-type colonies were lighter green (Figure 4.6 a, b). Regarding the morphology of the colonies, Figure 4.6b shows that the mutant strain has a more wrinkled surface if compared to the wild-type.

Therefore, the results presented at Table 4.5 as well as in Figures 4.3, 4.4, 4.5 and 4.6 strongly suggest that the isolated mutant strain is a different phenotype, successfully isolated through the applied screening methodology.

Figure 4.5 - Evolution of cell concentration, D-xylulose consumption and products formation during cultivation of wild-type *S. cerevisiae* under fermentative conditions. Temperature of 30 °C and pH 5.2 with minimal medium. Experiment in triplicate.

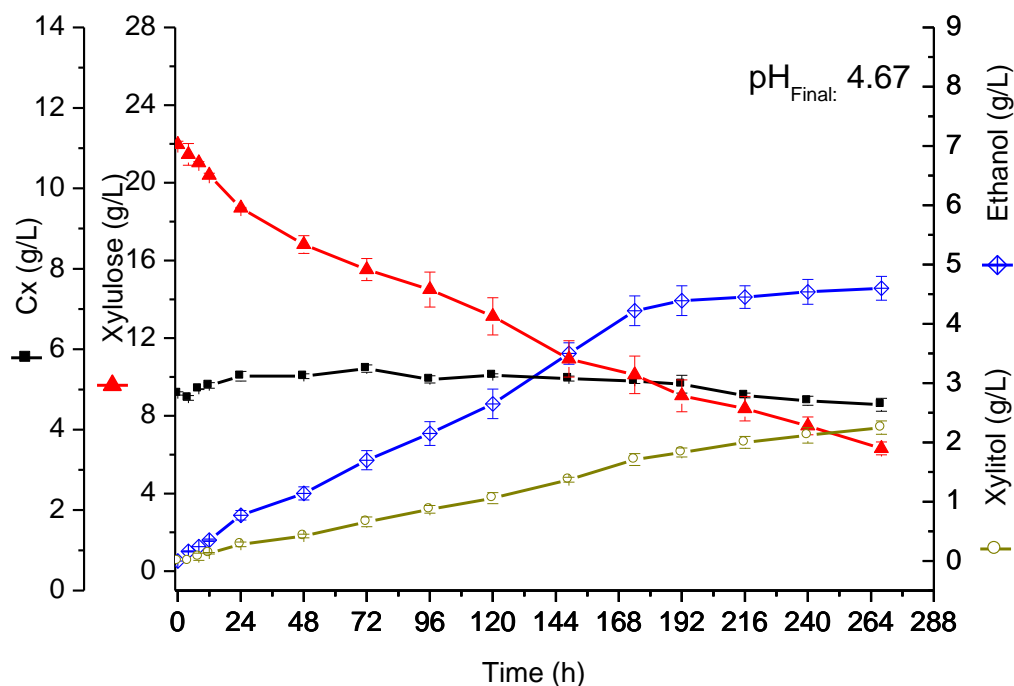
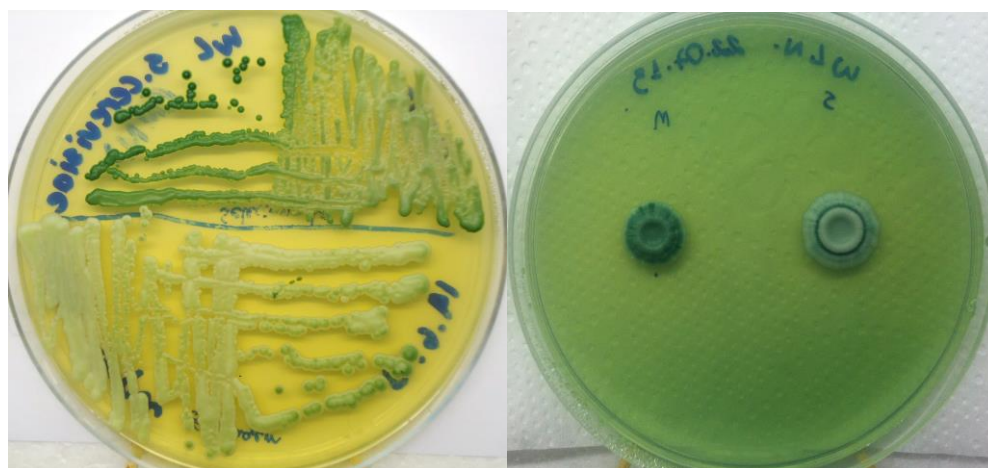


Table 4.5 - Cultures performance indexes: cell/D-xylulose yields ($Y_{x/s}$), D-xylulose assimilation rate ($\mu_{D\text{-xylulose}}$), specific productivity (Pr_{EtOH}), ethanol/D-xylulose yields ($Y_{EtOH/s}$) and xylitol/D-xylulose yields ($Y_{XOH/s}$) for wild-type and selected *S. cerevisiae* (colony 11) in shake cultures. Temperature 30 °C, pH 5.2.

Yeast	Seletivity Ethanol (Se)	Specific Productivity (Pr_{EtOH})	Ethanol Yield ($Y_{EtOH/s}$)	Xylitol Yield ($Y_{EtOH/s}$)	D-xylulose assimilation ($\mu_{D\text{-xylulose}}$)
Type	$(\frac{\text{mol}_{\text{Ethanol}}}{\text{mol}_{\text{Xylitol}}})^{-1}$	$\frac{\text{g}_{\text{Ethanol}}}{\text{g}_{\text{cell}} \cdot \text{h}^{-1}}$	$\frac{\text{g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{D-xylulose}}^{-1}}{\text{h}}$	$\frac{\text{g}_{\text{Xylitol}} \cdot \text{g}_{\text{D-xylulose}}^{-1}}{\text{h}}$	$\frac{\text{g}_{\text{D-xylulose}} \cdot \text{g}_{\text{cell}}^{-1}}{\text{h}^{-1}}$
Wild*	6.75	0.0034	0.329±0.012	0.151±0.006	0.011
Selected _{Exp.1} **	25.88	0.006	0.427±0.024	0.053±0.005	0.014
Selected _{Exp.2} **	20.00	0.007	0.41±0.050	0.059±0.004	0.017

*Experiment in triplicate; **Experiment in duplicate.

Figure 4.6 - Comparison of yeasts on bromocresol agar after two days of incubation. (a) Top: Mutant strain and Bottom: Wild strain. (b) Left: Mutant strain and Right: Wild strain.



(a)

(b)

CONCLUSION

Unlike hexose metabolism by *S. cerevisiae*, which leads almost exclusively to ethanol formation, expressive xylitol formation, besides ethanol, takes place when D-xylulose is assimilated by *S. cerevisiae* and other yeasts, genetically manipulated or not, under fermentative conditions. Although xylitol has a higher market price than ethanol, its demand is restrict to a couple of applications at pharmaceutical and food industries. Therefore, xylitol production from fermentation of hemicellulosic fraction must be minimized for the sake of process economics, regardless the organism used. Reduced xylitol formation is usually addressed by deletion of xylitol dehydrogenase encoding gene in recombinant *S. cerevisiae*, which typically results in high ethanol selectivity ($> 60 \text{ mol}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{mol}_{\text{Xylitol}}^{-1}$) but yields below $0.07 \text{ g ethanol} \cdot \text{g xylose}^{-1}$ (OLSSON e HÄGERDAL, 1996). Here we applied a simple screening procedure, where *S. cerevisiae* cells were exposed to solid cultures and microfermentors containing media with D-xylulose, which was produced “in lab” by isomerization of a xylose syrup. The proposed procedure coupled with the high cost of xylulose, which makes selection based on continuous cultures or repeated batches unfeasible. Applying the proposed procedure, three selected colonies were characterized and three phenotypes, with different patterns of xylulose uptake and xylitol formation, identified: the wild-type, colonies 1 & 9 and colony 11. The wild-type strain presented the worst performance indexes, with ethanol selectivity and yield values of $6.75 \text{ mol}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{mol}_{\text{Xylitol}}^{-1}$

and $0.33 \text{ g}_{\text{ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{xylulose}}^{-1}$, respectively. Evolutionated cells identified as colonies 1 and 9 exhibited fast D-xylulose uptake rate ($0.018 \text{ g}_{\text{xylulose}} \cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), improved ethanol yield ($0.37 \text{ g}_{\text{ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{xylulose}}^{-1}$) and a selectivity of $\sim 9 \text{ mol}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{mol}_{\text{Xylitol}}^{-1}$. Finally, the selected mutant named as colony 11 exhibited superior values of selectivity ($20 - 26 \text{ mol}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{mol}_{\text{Xylitol}}^{-1}$) and yield ($\sim 0.42 \text{ g}_{\text{ethanol}} \cdot \text{g}_{\text{xylulose}}^{-1}$). This mutant *S. cerevisiae* strain is a potential candidate yeast for industrial ethanol production by SIF process. Further bioreactor studies to assess the oxygen-limited operational range is under execution.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) (process 2008/56246-0) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for funding this work. We also acknowledge Amadeus Gomes de Azevedo for technical support as well as Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert for his important contributions to set up the screening experiments.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, P. M. **Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)—Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- ARGUESO, J. L. et al. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v. 19, p. 2258-2270, 2009.
- BRUINENBERG, P. M. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 52, p. 411–29, 1986.
- CADIERE, A.; ORTIZ-JULIEN, A.; CAMARASA, C. and DEQUIN, S. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. **Metab Eng.**, v. 13, p. 263–271, 2011.
- CAVALCANTI-MONTAÑO, I. D. et al. Optimal Bioreactor Operational Policies for the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Bioenerg Res**, v. 6, p. 776-785, 2013.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 301-309, 2000.
- CHIANG, L. C.; HSIAO, H. Y.; UENG, P. P.; TSAO, G. T. Enzymatic and Microbial Preparation of D-Xylulose from D-Xylose. **Appl Environ Microbiol**, v. 42, p. 66–69, 1981a.
- CHIANG, L. C.; GONG, C. S.; CHEN, L. F.; TSAO, G. T. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 42, p. 284–289, 1981b.
- CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425–441, 2007.
- COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico.** Dissertação (Magister Scientiae) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal De Ouro Preto, 2011.
- ÇAKAR, Z.P.; SEKER, U.O.S.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M. and SAUER U. Evolutionary engineering of multi-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 5, p. 569–578, 2005.
- ÇAKAR, Z.P.; ALKIM, C.; TURANLI, B.; TOKMAN, N.; AKMAN, S.; SARIKAYA, M.; TAMERLER, C.; BENBADIS, L. and FRANÇOIS, J.M. Isolation of cobalt hyper-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo evolutionary engineering approach. **J Biotechnol.**, v. 143, p. 130–138, 2009.
- ÇAKAR, Z.P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C. and YILMAZ, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Res**, v. 12, p. 171–182, 2012.

FURLAN, F. F. et al. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers & Chemical Engineering**, v. 43, p. 1-9, 2012.

FURLAN, F. F. et al. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth to be flexible?. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, p. 142, 2013.

GUIMARAES, P.M.R.; FRANCOIS, J.; PARROU, J.L.; TEIXEIRA, J.A. and DOMINGUES, L. Adaptive evolution of a lactose consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, p. 1748–1756, 2008a.

GUIMARAES, P.M.R.; LE BERRE, V.; SOKOL, S.; FRANCOIS, J.; TEIXEIRA, J.A. and DOMINGUES, L. Comparative transcriptome analysis between original and evolved recombinant lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnol J.**, v. 3, p. 1591–1597, 2008b.

KUYPER, M.; TOIRKENS, M.J.; DIDERICH, J.A.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P. and PRONK, J.T. Evolutionary engineering of mixed sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Res**, v. 5, p. 925–934, 2005.

LIU, E. K. and HU, Y. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. **Biochem Eng J**, v. 48, p. 204–210, 2010.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, p. 37–53, 2009.

MEINANDER, N.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B. heterologous reductase affects the redox balance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 142, p. 165-172, 1996.

MORAES, P. M. **Influencia da linhagem da levedura e as condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas de xilose**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)—Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013.

NAKATA, T.; MIYAFUJI, H.; SAKA, S. Ethanol production with b-xylosidase, xilose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* from the hydrolysate of Japanese beech after hot-compressed water treatment. **The Japan Wood Research Society**, v. 55, p. 289-294, 2009.

OLSSON, L.; LINDEN, T.; HAHN-HAGERDAL, B. A rapid chromatographic method for the production of preparative amounts of xylulose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 388–394, 1994.

OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LIDÉN, G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 112–120, 2008.

SHLER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering Basic Concepts. 2nd edition, Prentice Hall, 2002.

SILVA, C. R.; ZANGIROLAMI, T. C.; MATUGI, K.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 35-42, 2012.

SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Engenharia Química)—Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013.

SOUSA, R. Jr.; CARVALHO, M. L.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. **Brazilian journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 545-564, 2011.

RAO, K.; CHELIKANI, S.; RELUE, P. et al. A novel technique that enables efficient conduct of simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 101–117, 2008.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isolados de processos fermentativos para a produção de etanol**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2011.

RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 190, p. 39-43, 2000.

SANCHEZ, R.G. et al. Improved xylose and arabinose utilization by industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p.13, 2010.

SENAC, T.; HAHN-HAGERDAL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose and glucose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 120-126, 1990.

SONDEREGGER, M. and SAUER, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. **Appl Environ Microbiol.**, v. 69, p. 1990–1998, 2003.

STANLEY, D.; FRASER, S.; CHAMBERS PJ, ROGERS P & STANLEY GA. Generation and characterization of stable ethanol tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 37, p. 139–149, 2010a.

STANLEY, D.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A.; BORNEMAN, A. and FRASER, S. Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 88, p. 231–239, 2010b.

TEUNISSEN, A. et al. Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. **Appl Environ Microbiol.**, v. 68, p. 4780–4787, 2002.

TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M. and OLSSON, L. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fedbatch SSF processes. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 37, p. 1211–1220, 2010.

VAN MARIS, A. J. A. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391–418, 2006.

VAN MARIS, A.J.A.; WINKLER, A.A.; KUYPER, M.; DE LAAT W.T.A.M.; VAN DIJKEN, J.P. and PRONK J.T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Biofuels*, 108, 179–204, 2007.

WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILÄ, M. et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4184–4190, 1995.

WALFRIDSSON, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4648–4651, 1996.

WISSELINK, H. W. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. **Appl Environ Microbiol.**, 73, 4881–4891, 2007.

WISSELINK, H.W.; TOIRKENS, M.J.; WU, Q.; PRONK, J.T. and VAN MARIS, A.J.A. Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 907–914, 2009.

WRIGHT, J. et al. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 11, p. 299–306, 2011.

YUAN, D.; RAO, K.; RELUE, P.; VARANASI, S. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. **Bioresource technology**, v. 102, p. 3246–3253, 2011.

ZELLE, R. M. et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaplerotic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 76, p. 5383–5389, 2010.

CAPÍTULO 5
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DA FRAÇÃO
HEMICELULÓSICA POR *S. cerevisiae* ADAPTADA:
INFLUÊNCIA DOS FLUXOS DE OXIGÊNIO E
XILULOSE



Este capítulo apresenta os cultivos em reator de bancada de 2L, utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* de panificação adaptada à assimilação de xilulose, usando meio mínimo, contendo uma mistura de 30% de xilose e 70% de xilulose como fonte de carbono. Os resultados obtidos permitiram avaliar a formação de biomassa, gás carbônico, etanol, xilitol e outros metabólitos, em condições aeróbias, com limitação de oxigênio e anaeróbias, para diferentes fluxos de xilulose e oxigênio. Foi possível identificar as condições de cultivo que favorecem a seletividade em etanol.

PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA POR *S. CEREVISIAE* ADAPTADA: INFLUÊNCIA DOS FLUXOS DE OXIGÊNIO E XILULOSE

C. A. G. SUAREZ¹, I. D. CAVALCANTI-MONTANO², A. C. L. HORTA¹, R. SOUSA Jr¹, R. C. GIORDANO¹, I. ROCHA³ e T. C. ZANGIROLAMI¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

² Instituto de Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

³ Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Rod. Washington Luís – Km 235 – CEP 13565-905 – CP 676 - São Carlos/SP – Brasil

Fax: +(55) (16) 3351-8266

RESUMO

O bagaço de cana de açúcar pode ser usado como matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração (2G). Entretanto, a viabilidade econômica do processo de produção de etanol 2G depende do aproveitamento da fração hemicelulósica (C5) presente no bagaço, a qual é rica em xilose. Embora a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não seja capaz de fermentar xilose, ele assimila seu isômero, D-xilulose, que pode ser facilmente obtido utilizando-se a enzima xilose-isomerase. O metabolismo de xilulose por *S. cerevisiae* pode levar à formação de biomassa, etanol ou xilitol, dependendo das condições de cultivo empregadas. O objetivo deste trabalho é mapear a formação de produtos, buscando identificar as condições de cultivo que favorecem a produção de etanol. Os experimentos foram realizados em biorreator de 2L, em meio definido mínimo, utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* adaptada à assimilação de xilulose. Os experimentos foram iniciados com concentrações de substrato e de biomassa de $\sim 20 \text{ g.L}^{-1}$ e 5 g.L^{-1} , respectivamente, e conduzidos sob condições de cultivo aeróbias, anaeróbias e limitadas por oxigênio em

diferentes níveis. A partir dos dados experimentais obtidos, foram estimados os fluxos para biomassa, xilulose, etanol, xilitol, arabitol, glicerol, CO₂ e O₂. Como esperado, os resultados mostraram que em condições estritamente aeróbias, os fluxos são direcionados para a formação de biomassa, CO₂ e xilitol, enquanto em condições estritamente anaeróbias, apenas xilitol e CO₂ são formados. A formação de etanol só foi observada em condições de limitação por oxigênio, com máxima seletividade de $15 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$ para fluxos de xilulose e de O₂ de $0,54 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e $0,10 \text{ mmol}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. Foi identificada uma estreita faixa de operação, na qual a seletividade é mantida acima de $9 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$, definida por baixos fluxos de O₂ (entre $0,099$ e $0,11 \text{ mmol}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e fluxos de xilulose acima de $0,5 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Palavras-chave: xilulose; *Saccharomyces cerevisiae*; limitação por oxigênio; etanol; xilitol.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um processo para produção de etanol com alta produtividade a partir de D-xilulose é de grande interesse econômico. Esse processo pode agregar maior valor aos resíduos lignocelulósicos, além de promover um aproveitamento completo da biomassa, utilizando-se suas frações celulósica e hemicelulósica para a obtenção de etanol (SAKAMOTO, 2012). *Saccharomyces cerevisiae* é um candidato promissor para a indústria de produção de biocombustíveis devido à sua robustez, tolerância e produtividade elevada de etanol principalmente na indústria de fermentação de hexoses. Infelizmente esta levedura não fermenta xilose, mas pode fermentar xilulose (WANG and SCHNEIDER, 1980; CHIANG et al. 1981a; UENG et al. 1981; SENAC and HAHN-HAGERDAL, 1990), açúcar que pode ser obtido pela isomerização enzimática de xilose.

O metabolismo de xilulose em *S. cerevisiae* ocorre principalmente pela Via Pentose Fosfato, sendo caracterizado pela baixa velocidade de assimilação. Senac e Hahn-Hagerdal, (1990), determinaram que a velocidade de consumo de xilulose poder ser dez vezes menor que a velocidade de consumo de glicose. O metabolismo da xilulose por *S. cerevisiae* ou outras leveduras fermentadoras de xilose tem sido pouco estudado. Sabe-se que a fermentação da xilulose pode gerar etanol e/ou xilitol como principais produtos, dependendo das condições de cultivo e das características da linhagem empregada. Porém, a formação de ambos é de fato determinada pelos fluxos metabólicos na complexa rede de reações

intracelulares, em particular aquelas que integram as vias de assimilação de pentoses pela célula.

Ueng et al. (1981) comparou diferentes linhagens de leveduras fermentando glicose e xilulose como substrato, e obteve bons rendimentos com a *Schizosaccharomyces pombe* produzido etanol e baixas quantidades de polióis como subprodutos. Já a *S. cerevisiae*, que é um bom produtor de álcool a partir de glicose, não apresentou uma boa produção deste álcool a partir da D-xilulose. Neste estudo, outras leveduras cultivadas produziram principalmente xilitol e D-arabitol, com um rendimento inferior em etanol. Outra dificuldade no estudo do metabolismo da xilulose é o preço e a acessibilidade a este açúcar. A xilulose pura está comercialmente disponível apenas em pequenas quantidades e por um preço extremamente elevado, o que torna necessário produzi-la em laboratório, para viabilizar o estudo do metabolismo da levedura neste substrato .

Outro aspecto importante no metabolismo da xilulose por *S. cerevisiae* ainda pouco explorado, é a influência da concentração de oxigênio dissolvido sobre o consumo desta pentose. Sabe-se que o oxigênio é uma variável-chave na regulação do metabolismo de açúcares nas leveduras e sua ausência ou presença pode levar a grandes mudanças no mesmo. *S. cerevisiae* pode fermentar açúcares a etanol e CO₂ em condições de limitação por oxigênio. Na presença de maior disponibilidade de oxigênio, o crescimento é favorecido. Na verdade, a maioria das leveduras fermentativas facultativas não crescem bem na ausência completa de oxigênio, nem mesmo em meios complexos (VISSER et al., 1990). Alguns fenômenos fisiológicos relacionados com a presença de oxigênio em leveduras têm sido classificados em quatro "efeitos", cuja ocorrência depende tanto da espécie de levedura como do substrato. Estes efeitos são: i) Efeito Pasteur - definido como a inibição do metabolismo fermentativo do açúcar pelo oxigênio; ii) Efeito Custers (contrário ao efeito Pasteur) - descreve o fenômeno no qual, em algumas leveduras a fermentação é inibida pela falta de oxigênio; iii) Efeito Crabtree - no qual se tem um metabolismo fermentativo mesmo na presença de oxigênio quando as leveduras estão expostas ao excesso de açúcar (WEUSTHUIS et al., 1994); iv) Efeito Kluyver - definido como a capacidade que algumas leveduras têm de metabolizar determinados dissacarídeos aerobiamente mas não anaerobiamente.

Como foi descrito anteriormente, o oxigênio tem uma forte influência sobre o metabolismo e sobre a estabilidade fisiológica das leveduras. Em estudos mais recentes Verbelen *et al.* (2009) realizaram fermentações de alta densidade celular usando uma levedura industrial de cervejaria em diferentes condições de oxigenação para investigar a influência da aeração sobre a fisiologia e o metabolismo da levedura (concentrações de oxigênio de 0,8, 7,8

e 51,8 ppm). Os resultados demonstram que a expressão de genes específicos e parâmetros fisiológicos monitorados nas primeiras horas de fermentação determinaram o curso posterior da fermentação. No referido trabalho, alguns dos genes que foram influenciados pela condição de oxigenação foram: o gene *ATF1* que codifica a enzima álcool acetil transferase, importante na síntese de acetato de etila e acetato de isoamila; o gene *OLE1* que codifica a enzima *fatty acid desaturase* de ácido graxo dependente do oxigênio e os genes *SDO1* e *CCTT1* que estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Todos estes genes apresentaram alguma mudança no metabolismo da levedura, por exemplo, o uso de concentrações maiores de oxigênio diminuiu a formação de ésteres, o que pode ter sido causado pela diminuição na expressão do gene álcool acetil transferase *ATF1*. Já o gene *OLE1* apresentou seu maior nível de expressão na condição com menos oxigênio, que está de acordo com o fato deste gene ser hipóxico. Quanto aos genes *SDO1* e *CCTT1*, o primeiro codifica a enzima superóxido dismutase que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; o segundo codifica a catalase citosólica que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Estes são genes associados à resposta ao estresse oxidativo (HERRERO et al. 2008). Para ambos os genes a resposta foi a mesma: condição de maior oxigenação aumentou drasticamente sua expressão na primeira hora de cultivo; já para o caso de concentrações menores de oxigênio, iguais a 7,8 ppm, a expressão dos genes permaneceu baixa.

Todas as informações mencionadas acima, incluindo os efeitos Custers, Crabtree, Pasteur e Kluyver assim como a análise da influência do oxigênio nos genes diretamente relacionados à produção de etanol, constituem importantes contribuições para o entendimento da influência do oxigênio no metabolismo de *S. cerevisiae*. Porém, a análise apresentada se baseia no catabolismo da glicose pela via glicolítica. No caso da produção de etanol a partir da fração hemicelulósica, a D-xilulose será catabolisada pela Via Pentose Fosfato até ser convertida em gliceraldeído-3-fosfato, que constitui um dos nós de integração das duas vias. Assim, enquanto as condições de fermentação para a produção de etanol a partir de hexoses estão plenamente estabelecidas, há poucos estudos sobre as condições de cultivo e sua influência na produção de etanol a partir de D-xilulose.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a assimilação de D-xilulose, o crescimento e a produção de etanol e xilitol em cultivos com uma levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, adaptada ao crescimento em xilulose sob condições aeróbias, anaeróbias e limitadas por oxigênio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Microrganismo

Foi utilizada uma linhagem de *S. cerevisiae* comercial (Itaiquara, Brasil) adaptada à xilulose por Suarez et al. (2013). A linhagem foi armazenada em meio contendo xilulose 20 g.L⁻¹, xilose 8,5 g.L⁻¹ e glicerol a 20% a – 80 °C.

Xarope de xilulose (substrato)

Estoques de xarope xilose-xilulose foram preparados segundo Chiang et al. (1981b), usando a enzima xilose-isomerase (Enzima imobilizada na quitonasa SILVA, 2013). A isomerização foi realizada em pH 7,0 e temperatura de 68 °C, com uma concentração inicial de xilose de 700 g.L⁻¹ e 3mM de Mg²⁺. O xarope foi produzido por precipitação seletiva da xilose com etanol a 4 °C, seguida por concentração em rotaevaporador e liofilizador, obtendo-se um xarope contendo 70% de xilulose e 30% de xilose.

Métodos Analíticos

Viabilidade celular

A viabilidade das células durante o cultivo foi acompanhada por microscopia ótica (Microscópio Olympus BX50 conectado a um sistema de captura e armazenamento de imagens) mediante a contagem de células utilizando uma “Câmara de Neubauer”. Inicialmente uma alíquota de 100 µL do caldo de cultura foi diluída 10X em água, seguida por uma nova diluição de 2x com corante azul de metileno, para obter uma diluição final de 20x. Após 5 min de incubação para reação do corante, 4 µL da suspensão diluída foi colocada sobre a câmara de Neubauer e visualizada no microscópio para aquisição de 10 imagens por amostra. Essas imagens foram posteriormente utilizadas para a contagem de células viáveis (não coradas) e células não viáveis (coradas em azul) e determinação da viabilidade por:

$$\text{Viabilidade: } \frac{\text{Células viáveis}}{\text{Células totais}} \quad (5.1)$$

Concentrações de xilulose, xilose, etanol, xilitol e outros metabólitos

As concentrações de açúcares e produtos da fermentação foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de troca iônica (cromatógrafo Waters, detector modelo 486) utilizando a coluna (Sugar-pak I, Waters) e água ultrapura, eluindo à vazão de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, como fase móvel. A temperatura para separação dos componentes foi de 80°C . A detecção dos ácidos foi realizada em detector UV a um comprimento de onda de 210 nm, e a dos carboidratos e alcoóis por índice de refração.

Procedimento Experimental

Preparação de Inóculo

Meio YPD contendo $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose foi utilizado para preparo de pré-inóculo e inóculo. Para propagação de células a partir do estoque em glicerol, meio YPD agar modificado foi utilizado, substituindo-se a fonte de carbono original ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose) por $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilulose e $8,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose.

O pré-inóculo foi preparado a partir de uma colônia isolada obtida após o crescimento no meio YPD agar modificado. Uma única colônia foi adicionada a um erlenmeyer de 300 mL contendo 30 mL de meio YPD e após 20 horas de incubação, 5 mL do pré-inóculo foram transferidos para outro erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio YPD, mantido em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm durante 24h. Este procedimento de transferência de 5 mL de pré-inóculo para inocular 250 mL de meio YPD foi empregado para inocular 6 erlenmeyers, obtendo-se um volume final de 1250 mL de suspensão celular em meio YPD. Para obter uma alta quantidade de massa celular, foram realizados dois pré-inóculos, chegando a um volume final de 2500 mL de suspensão. Após leitura da densidade ótica do inóculo (suspensão final), este foi centrifugado durante 30 minutos a 6000 rpm em uma centrífuga EPPENDORF, modelo 5810R a 4°C . O sobrenadante foi descartado totalmente e o precipitado obtido foi ressuscitado em solução salina ($\text{NaCl } 0,9\%$) e submetido à nova centrifugação nas mesmas condições, visando à lavagem das células e remoção da glicose residual presente no pellet (massa celular). Ao final do procedimento uma amostra foi analisada em HPLC, para garantir a ausência de glicose no inóculo. Finalmente, a

biomassa obtida após a segunda centrifugação foi novamente ressuspendida em solução salina, gerando uma suspensão concentrada. Um volume adequado dessa suspensão concentrada foi então transferido para o biorreator de forma que a DO inicial do meio fosse de aproximadamente 10.

Cultivos em biorreator

Os cultivos em batelada foram realizados em biorreator tipo tanque agitado, encamisado e aerado, com uma capacidade de 2 litros (Applikon, Netherlands), contendo 1 litro de meio mínimo ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ureia), acoplado a um sistema de monitoramento e aquisição de dados (SUPERSYS_HCDC, HORTA, 2012) e a um analisador de gases (Sick/Maihak S.710) para medição da fração molar de CO_2 no efluente do bioreator. No cultivo aeróbio, a agitação e a aeração foram ajustadas ao longo do cultivo para garantir que a concentração de O_2 dissolvido fosse mantida em 30% da saturação. Foi utilizada uma concentração inicial de xilulose de 28 g.L^{-1} . No cultivo anaeróbio, o biorreator foi equipado com mangueiras de Norprene e borbilhado com N_2 ultrapuro (O_2 0,9 ppm) por 12 horas antes da inoculação. O meio continha 14 g.L^{-1} de xilulose e foi suplementado com 10 mg.L^{-1} de ergosterol e 420 mg.L^{-1} de Tween 80. Para cultivos em condições de limitação por oxigênio, a agitação foi mantida em 300 rpm e a fração molar do oxigênio no gás de entrada foi reduzida para valores entre 4,7 e 0,2 %, misturando-se nitrogênio industrial e ar ou nitrogênio industrial e nitrogênio ultrapuro, conforme mostrado na Tabela 5.1. As vazões de gases foram controladas por fluxômetros (GFC AALBORG) ou por um rotâmetro de baixa vazão. Em todos os experimentos, a temperatura foi mantida em $31 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH foi fixado em 5,0, o qual foi controlado pela adição de soluções de NaOH 5M ou de H_3PO_4 a 20%.

Tabela 5.1 - Sequência de experimentos em biorreator sob condições de limitação por oxigênio.

CULTIVO	BATELADA	CONDIÇÃO DE OPERAÇÃO			
		N ₂ puro L.min ⁻¹	N ₂ Industrial	Ar L.min ⁻¹	y _{O2}
Aeróbio	Batelada 1	0	0	1,75	0,21
Anaeróbio	Batelada 2	1	0	0	0,0
Microaeróbio 1 M1	Batelada 3	0	1,2	0,2	0,047
Microaeróbio 2 M2	Batelada 4	0	1,0	0	0,020
	Batelada 5	0	0,98	0,02	0,024
	Batelada 6	1,0	0	0,02	0,004
	Batelada 7	0,5	0,5	0	0,010
Microaeróbio 3 M3	Batelada 8	1,0	0,2	0	0,003
	Batelada 9	1,0	0,05	0	0,001
	Batelada 10	1,0	0,1	0	0,002

Estimativa de fluxos, coeficientes de rendimento e outros cálculos

Estimativa dos fluxos

A partir dos resultados obtidos nos cultivos em batelada conduzidos sob os diferentes níveis de oxigenação, foram estimados os fluxos de consumo de substrato e de produção de etanol, xilitol e biomassa. O cálculo dos fluxos foi baseado na estimativa das velocidades de consumo de substrato ou formação de produto, as quais foram obtidas a partir do balanço de material por componente para processo em batelada (STEPHANOPOULOS et al., 1998), conforme mostram as equações a seguir:

$$\text{Fluxo} = \frac{r_i}{C_x} \quad (5.2)$$

Onde, r_i é a velocidade de consumo e/ou produção do componente i (em mmol de $i \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$) e C_x é a concentração celular (em g_{MS}·L⁻¹).

$$\text{Balanço de Células:} \quad \frac{d(m_x)}{dt} = r_x V \quad (5.3)$$

$$\text{Balanço de Substrato:} \quad \frac{d(m_s)}{dt} = -r_s V \quad (5.4)$$

$$\text{Balanço de Produto: } \frac{d(m_p)}{dt} = r_p V \quad (5.5)$$

$$\text{Balanço de CO}_2: \quad n_{CO_2prod} = y_{CO_2s} \frac{Q_s P_s}{T_s R} - y_{CO_2e} \frac{Q_e P_e}{T_e R} \quad (5.6)$$

Onde m_x , m_s e m_p são a massa de células, massa de substrato e massa de produto respectivamente todos em unidades de gramas. As variáveis, P_e e T_e são a pressão e a temperatura do gás nas condições do fluxômetro (condições CNTP), P_s e T_s são a pressão e a temperatura do gás nas condições do laboratório, V é o volume do reator e y_{CO_2s} e y_{CO_2e} são as frações do CO₂ na saída e entrada respectivamente. Neste caso, o volume do reator não foi considerado constante, pois as amostragens podem causar uma variação de ~ 30% no volume, o que levaria a introduzir 30% de erro nos cálculos. Assim, o volume foi corrigido a partir do volume inicial descontando-se os volumes de amostras retiradas.

Isolando o termo de velocidade de reação r das equações (5.3 – 5.5) e substituindo na equação (5.2) obtemos as expressões finais para o cálculo dos fluxos metabólicos:

$$\text{Fluxo para biomassa: } Fluxo_x = \frac{dm_x}{dt} \frac{1}{VC_x} \quad (5.7)$$

$$\text{Fluxo de substrato: } Fluxo_s = \left(-\frac{dm_s}{dt} \frac{1}{VC_x} \right) \cdot \left(\frac{1000}{pm} \right) \quad (5.8)$$

$$\text{Fluxo de produto: } Fluxo_p = \left(\frac{dm_p}{dt} \frac{1}{VC_x} \right) \cdot \left(\frac{1000}{pm} \right) \quad (5.9)$$

Onde, pm é o peso molecular. A partir das equações (5.7-5.9) o procedimento utilizado para determinar os fluxos metabólicos para o cultivo em batelada foi o seguinte:

1. Fazer um gráfico de m_i vs. tempo.
2. Ajustar um polinômio para o gráfico anterior ($m_i(t)$).
3. Fazer a derivada do polinômio ajustado no passo anterior (dm_i/dt).
4. Calcular as equações (5.7 -5.9) para cada tempo com o fim de obter o fluxo ao longo do experimento ($Fluxo_i(t)$).

Para calcular o fluxo de CO₂, é necessário determinar a vazão Q_s , realizando um balanço de material de N₂ (inerte):

$$\text{Balanço de Nitrogênio: } y_{N_2s} \frac{Q_s P_s}{T_s R} = y_{N_2e} \frac{Q_e P_e}{T_e R} \quad (5.10)$$

Onde, $y_{N_2s} = 1 - y_{O_2s} - y_{CO_2s}$ and $y_{N_2e} = 1 - y_{O_2e} - y_{CO_2e}$

Isolando Q_s da equação (5.10) obtemos:

$$Q_s = \frac{y_{N2s} Q_g P_s T_s}{y_{N2s} P_s T_s}$$

A partir da equação (5.6) podemos calcular o número de mols de CO_2 produzidos ($n_{CO2prod}$), e finalmente obter o fluxo de CO_2 com a equação a seguir:

$$\text{Fluxo de } CO_2: \text{Fluxo}_{CO_2} = \frac{n_{CO_2prod}}{m_x} \quad (5.11)$$

Para estimar o fluxo de oxigênio consumido nos experimentos conduzidos em aerobiose ou sob limitação por oxigênio, utilizou-se a Eq. (5.12), na qual assume-se que todo o oxigênio transferido durante o cultivo (OTR) foi consumido pelas células (OUR) (SHULER, 2002), de forma que:

$$OUR = Cx \cdot q_{O_2} = k_{La}(C^* - C) \quad (5.12)$$

onde C^* é a concentração na fase líquida em equilíbrio com a pressão parcial de O_2 na fase gasosa (solubilidade do oxigênio na água em $mmol O_2.L^{-1}$); C é concentração de oxigênio na fase líquida; k_{La} é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em s^{-1} , e pode ser determinado a partir da correlação obtida por Bustamante et al., (2013) para um bioreator de tanque agitado.

$$k_{La} = 13,79 \times 10^{-2} \cdot N^{0,778} \varphi_g^{0,668} \mu^{-0,62} \quad (5.13)$$

As variáveis N , φ_g e μ são velocidade de agitação do impelidor em (rps), taxa específica de fluxo de gás na entrada em (vvm) e viscosidade dinâmica em (Pa.s), respetivamente.

A partir da equação (5.12) é possível calcular o valor da taxa de consumo de oxigênio OUR , tendo calculado o coeficiente de transferência k_{La} (equação 5.13) e a concentração de oxigênio na fase líquida (C). Para o cultivo aeróbio, C é a concentração de oxigênio dissolvido correspondente à porcentagem da saturação medida pelo sensor de

oxigênio dissolvido. Para os cultivos limitados por oxigênio, devido à imprecisão na detecção de baixas concentrações de oxigênio dissolvido, o sensor indicava valores de COD em torno de 0 % da saturação. Por isso, o valor de C foi assumido como zero para todos os experimentos sob limitação por oxigênio. A variável C* (solubilidade de O₂ na água nas condições de operação) foi estimada, considerando que a 30 °C a solubilidade do oxigênio em água seja de 0,236 mmol.L⁻¹ (considerando o ar: pO₂=0,21 bar). Como o C* depende da temperatura e da pressão uma nova aproximação foi realizada para os diferentes valores de (pO₂= Ptotal.yo₂) na entrada.

Finalmente o fluxo de oxigênio q_{o2}, pode ser obtido a partir dos valores de OUR e os valores da concentração celular C_x (g_{MS}.L⁻¹) para cada caso de forma que:

$$\text{Fluxo de Oxigênio} \quad q_{o_2} = \frac{OUR}{C_x} = k_{La}(C^* - C) \quad (5.14)$$

Estimativa dos coeficientes de rendimento e velocidade específica de assimilação de substrato

Com os resultados obtidos durante as fermentações de *S. cerevisiae* foram estimados os coeficiente de rendimento para os principais produtos (Y_{Produto/Xylulose}) de acordo com a Equação 5.15, por regressão linear.

$$Y_{\text{Produto}} = \frac{\Delta C_{\text{Produto}}}{-\Delta C_{\text{Xylulose}}} \quad (5.15)$$

$\Delta C_{\text{Produto}} = C_{\text{Produto}(t)} - C_{\text{Produto}0}$; $\Delta C_{\text{xilulose}} = C_{\text{xilulose}(t)} - C_{\text{xilulose}0}$, onde C_{xilulose} é a concentração xilulose, C_{Produto} é a concentração de produtos como etanol, xilitol e arabitól. Índice de "0" refere-se à concentração inicial.

A velocidade específica de assimilação de substrato foi determinar com a partir da equação 5.16.

$$\mu_{D-xylulose} = \frac{\Delta C_{\text{Xylulose}}}{\Delta t C_x} \quad (5.16)$$

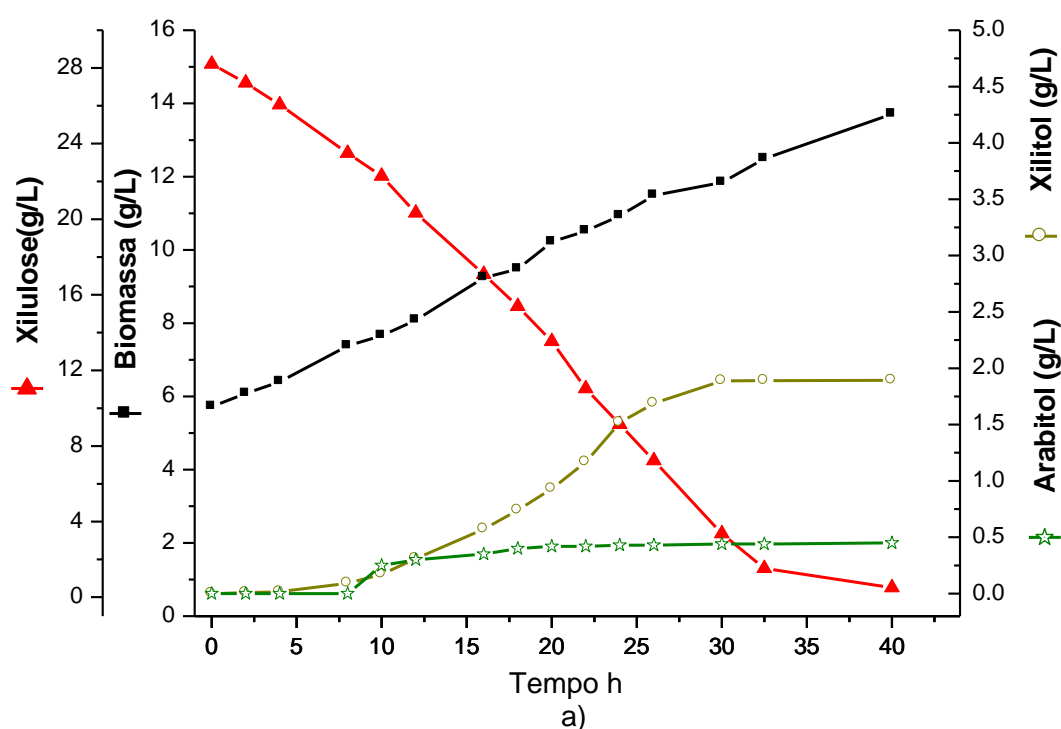
Onde C_x é a concentração de biomassa e $\Delta t = \text{tempo}_{\text{Final}} - \text{tempo}_{\text{Inicial}}$.

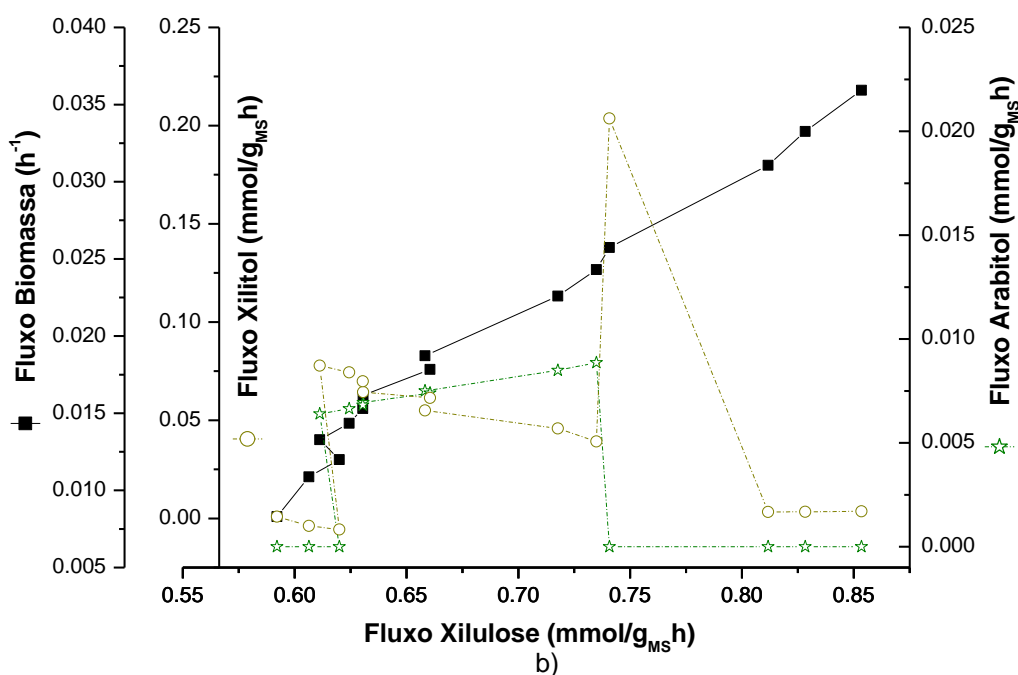
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultivos sob diferentes níveis de oxigenação: metabólitos formados e fluxos

A Figura 5.1 (a) ilustra o consumo de substrato, a formação de biomassa e de produtos no cultivo da levedura selecionada conduzido em biorreator sob condições aeróbias, tendo xilulose como substrato. O perfil de crescimento se mostra constante durante todo o experimento, com velocidade específica (μ) de $0,023 \text{ h}^{-1}$, valor este muito menor do que $\mu_{\text{max}} = 0,45 \text{ h}^{-1}$ de *S. cerevisiae* crescendo em glicose (FLIKWEERT et al., 1995).

Figura 5.1 – (a) Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições aeróbias, (b) Fluxos em xilitol, arabitol e biomassa em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de $31 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 5,0.





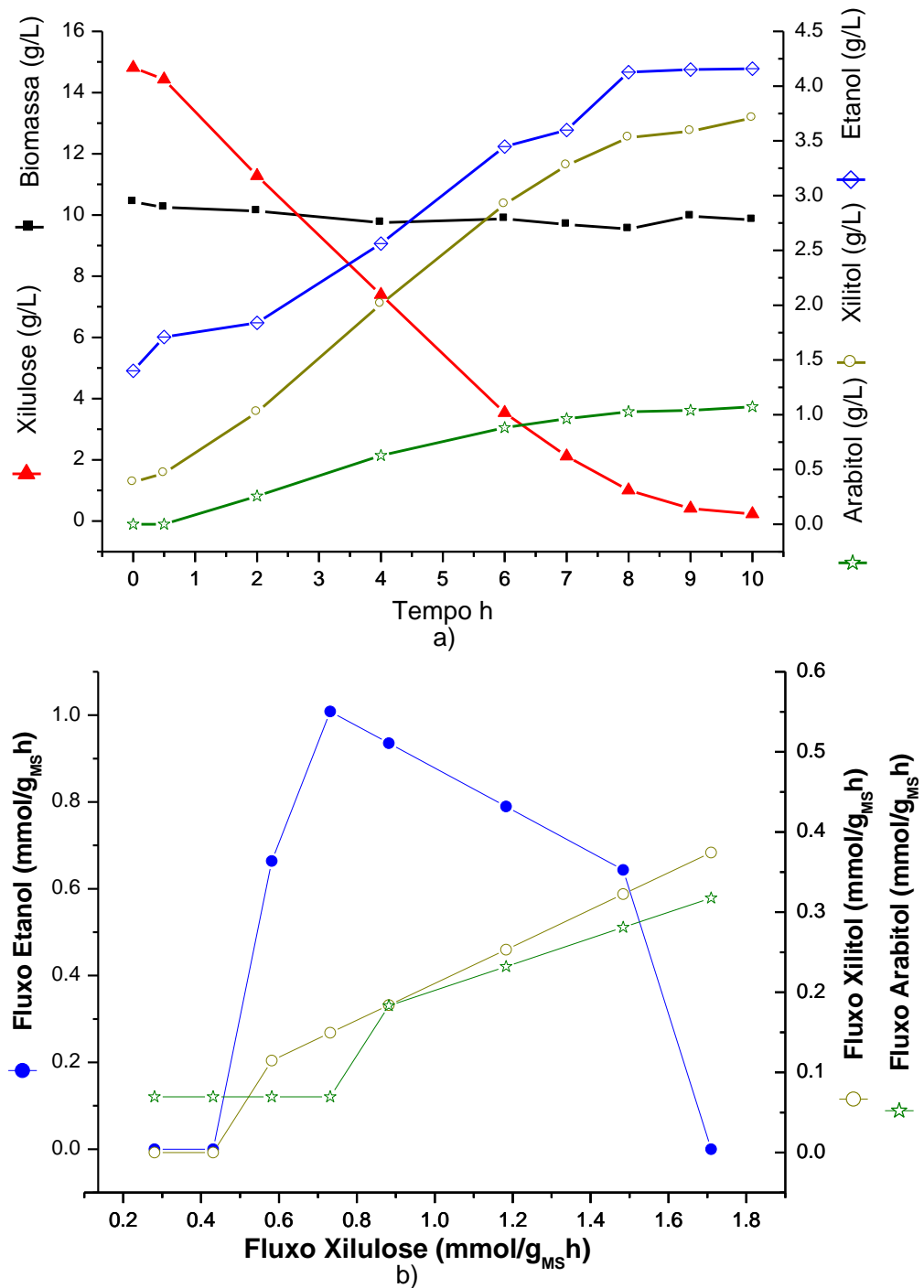
Esta baixa velocidade de crescimento pode estar relacionada a vários fatores, dentre eles o transporte e a assimilação de pentoses. *S. cerevisiae* transporta hexoses e outros açúcares por meio de transportadores codificados pela família de genes HXT (KRUCKEBERG, 1996), que também transportam xilose com baixa eficiência, apresentando valores de $K_{m_{xilose}}$ (constante de afinidade pelo substrato) cerca de 5-200 vezes maiores do que para glicose (MORAES, 2013). Não há estudos sobre o transporte de xilulose em *S. cerevisiae*, mas como a xilulose é isômero da xilose, supõe-se que o transporte seja igualmente deficiente. Outra possível razão para a baixa velocidade de crescimento da levedura em xilulose é o metabolismo desta pentose pela via Pentose Fosfato (VPF). De fato, *S. cerevisiae* apresenta baixa atividade de xiluloquinase e menor capacidade de fosforilação de xilulose do que outras leveduras. Além disso, a VPF desempenha um papel totalmente diferente da glicólise para célula e os fluxos pela VPF são naturalmente menores do que os da glicólise (MORAES, 2013).

A Figura 5.1a também indica o consumo de xilulose pela levedura, com esgotamento quase total do substrato. A partir dos dados apresentados na Figura 5.1a estima-se um fator de conversão de xilulose em células ($Y_{X/S}$) de $0,27 \text{ g}_{\text{célula}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$. Durante o cultivo aeróbico, além da formação de biomassa, arabitol e xilitol foram produzidos, sendo este último o principal subproduto formado, com um fator de conversão ($Y_{XOH/S}$) de $0,1 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$.

Em condições aeróbias, a Figura 5.1b mostra que, para fluxos de xilulose (F_s) superiores a $0,75 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, o fluxo de xilitol aparece como o principal metabolito. Já para valores inferiores a este fluxo e até um valor de $0,62 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, o fluxo de xilitol predomina sobre o arabitol com valores quase 10 vezes maiores. Por outro lado, a biomassa apresenta uma tendência linear de variação de μ seguindo o perfil esperado para o crescimento limitado pela fonte de carbono. Não foi observada a fase de crescimento exponencial na faixa de concentrações de xilulose estudada. Quanto aos fluxos em xilitol e arabitol, estão provavelmente relacionados às atividades das enzimas xilitol desidrogenase (XDH), L-arabinoseisomerase (AL) e/ou L-xilulose redutase (ALX) e ao acúmulo intracelular de xilulose e/ou de outros metabólitos intermediários.

A Figura 5.2a apresenta os principais resultados do cultivo em condição anaeróbia. Pode-se observar que a levedura não apresentou crescimento durante as 10 horas de cultivo, mas houve consumo quase que total da xilulose, chegando a um valor residual de $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, com produção de $4,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de etanol ($Y_{\text{ETOH/S}}=0,19 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$) e $3,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilitol ($Y_{\text{XOH/S}}=0,23 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$). Para a condição anaeróbia, a Figura 5.2b mostra enquanto F_s permanece entre $0,4$ e $0,7 \text{ mmol}$ de xilulose $\cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, etanol é o principal produto formado, com fluxo expressivo. Já para valores de F_s superiores a $0,8 \text{ mmol}$ de xilulose $\cdot \text{g}_{\text{DCW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, os fluxos de xilitol e arabitol são observados, embora o de etanol continue predominante. Na condição anaeróbia, *S. cerevisiae* necessita da regeneração de co-fatores NAD^+ , havendo, por outro lado, excesso de NADPH , fato que resulta em acúmulo de xilitol (Meinander *et al.*, 1996). É provável que, em fluxos de xilulose mais elevados, que a xilulose se acumule intracelularmente, favorecendo a reação catalisada pela enzima xilitol desidrogenase no sentido do consumo da xilulose e da formação de xilitol e NAD^+ (Figura 1.7).

Figura 5.2 – (a) Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições anaeróbias, (b) Fluxos em xilitol, arabitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.

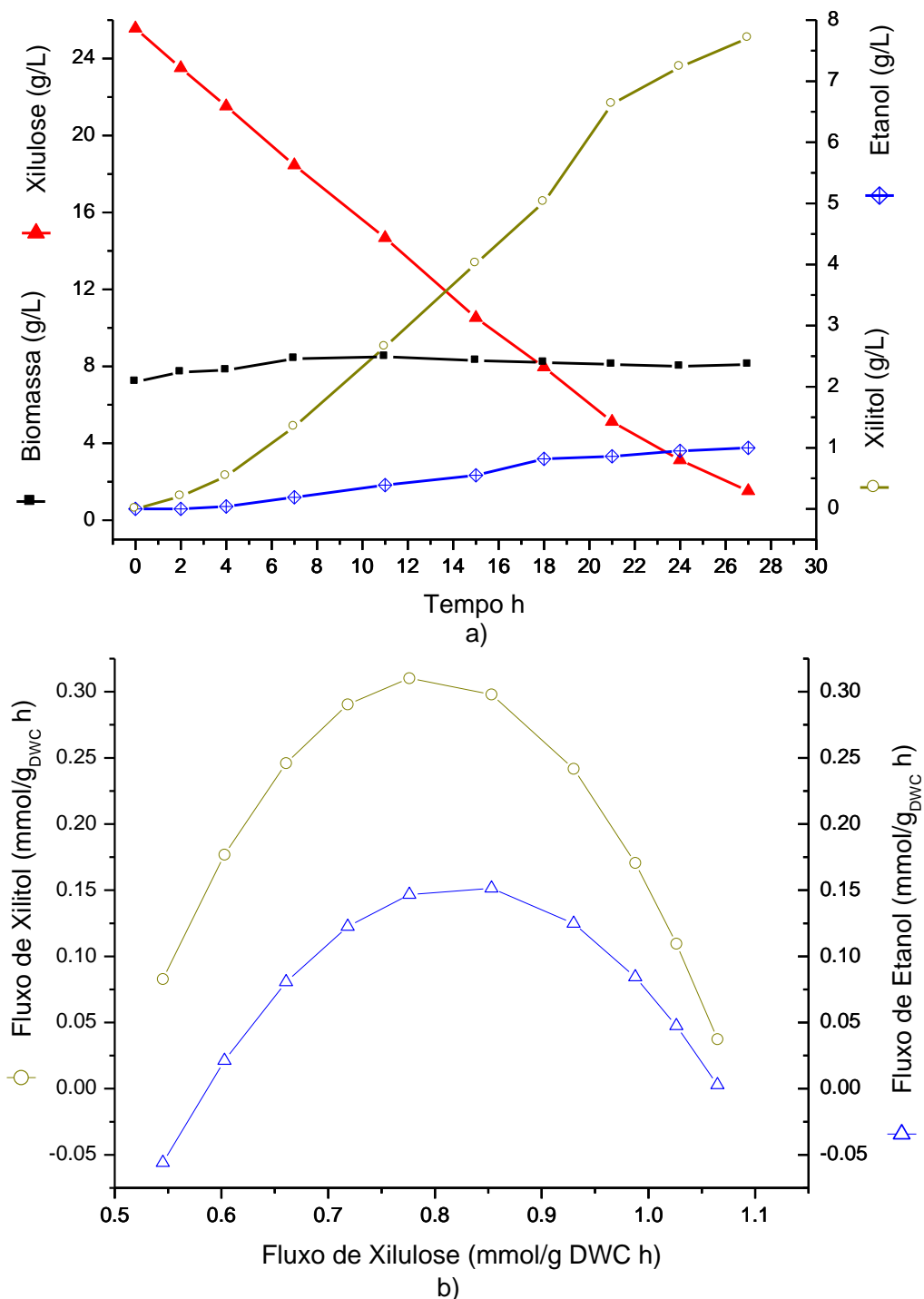


No experimento em condições anaeróbias a concentração de etanol atingiu apenas $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ enquanto a produção de xilitol chegou a $3,8 \text{ g.L}^{-1}$. Esses valores são distintos dos obtidos nos experimentos conduzidos em shaker utilizando a mesma colônia 11, com concentrações iniciais de xilulose e biomassa semelhantes, nos quais alcançou-se 8 g.L^{-1} de etanol e menos de 2 g.L^{-1} de xilitol (Figura 4.4, Capítulo 4). Como em shaker a condição de cultivo não era estritamente anaeróbia e sim caracterizada pela disponibilidade limitada de oxigênio, uma sequência de experimentos em condições controladas e definidas de limitação por oxigênio (Tabela 5.1) foi realizada em biorreator para avaliação dessa variável sobre o metabolismo e a produção de etanol.

Inicialmente realizou-se o cultivo microaeróbio (M1) consistindo em única batelada (B3), reduzindo-se a fração molar de oxigênio na corrente gasosa fornecida ao reator para ($y_{o_2} = 0,047$) por meio da mistura de N_2 industrial ($1,2 \text{ L.min}^{-1}$) e ar ($0,2 \text{ L.min}^{-1}$), a qual foi mantida durante todo o experimento. As Figuras 5.3a e 5.3b apresentam os resultados obtidos durante o cultivo na primeira condição de oxigênio limitado (M1).

Na figura 5.3a é possível observar um lento crescimento nas primeiras 11 h de cultivo, seguido por uma estagnação. O perfil de consumo de xilulose apresenta um comportamento linear durante as 24 horas de cultivo. Ao final deste período, a concentração de xilulose residual era $\sim 3 \text{ g.L}^{-1}$ e a velocidade de assimilação de xilulose pela levedura para este intervalo de cultivo correspondia a $0,117 \text{ g}_{\text{xilulose}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Ao final do experimento, a velocidade de consumo de xilulose diminuiu para $0,066 \text{ g}_{\text{xilulose}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, conforme observa-se pela mudança no perfil de consumo. Quando o experimento foi encerrado, a concentração de xilulose residual era de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$. O principal produto formado foi o xilitol, com perfil de produção mais acelerada nas primeiras 24 h, e redução posterior devido à diminuição na concentração de xilulose disponível. Além de xilitol, cuja concentração alcançou $7,7 \text{ g.L}^{-1}$, a levedura também produziu etanol ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$). Estes valores foram similares aos obtidos durante o cultivo em condição aeróbia, o que sugere que nesta condição de fornecimento de oxigênio ($y_{o_2} = 0,05$) o metabolismo aeróbio prevaleceu. Em termos dos coeficientes de rendimento, foram obtidos os valores de $Y_{\text{ETOH/S}} = 0,0475 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$ para o etanol e de $Y_{\text{XOH/S}} = 0,375 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$ para o xilitol.

Figura 5.3 – (a) Batelada B3, Cultivo M1. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições de limitação de oxigênio $y_{O_2}=0,047$ (b) Fluxos em xilitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.



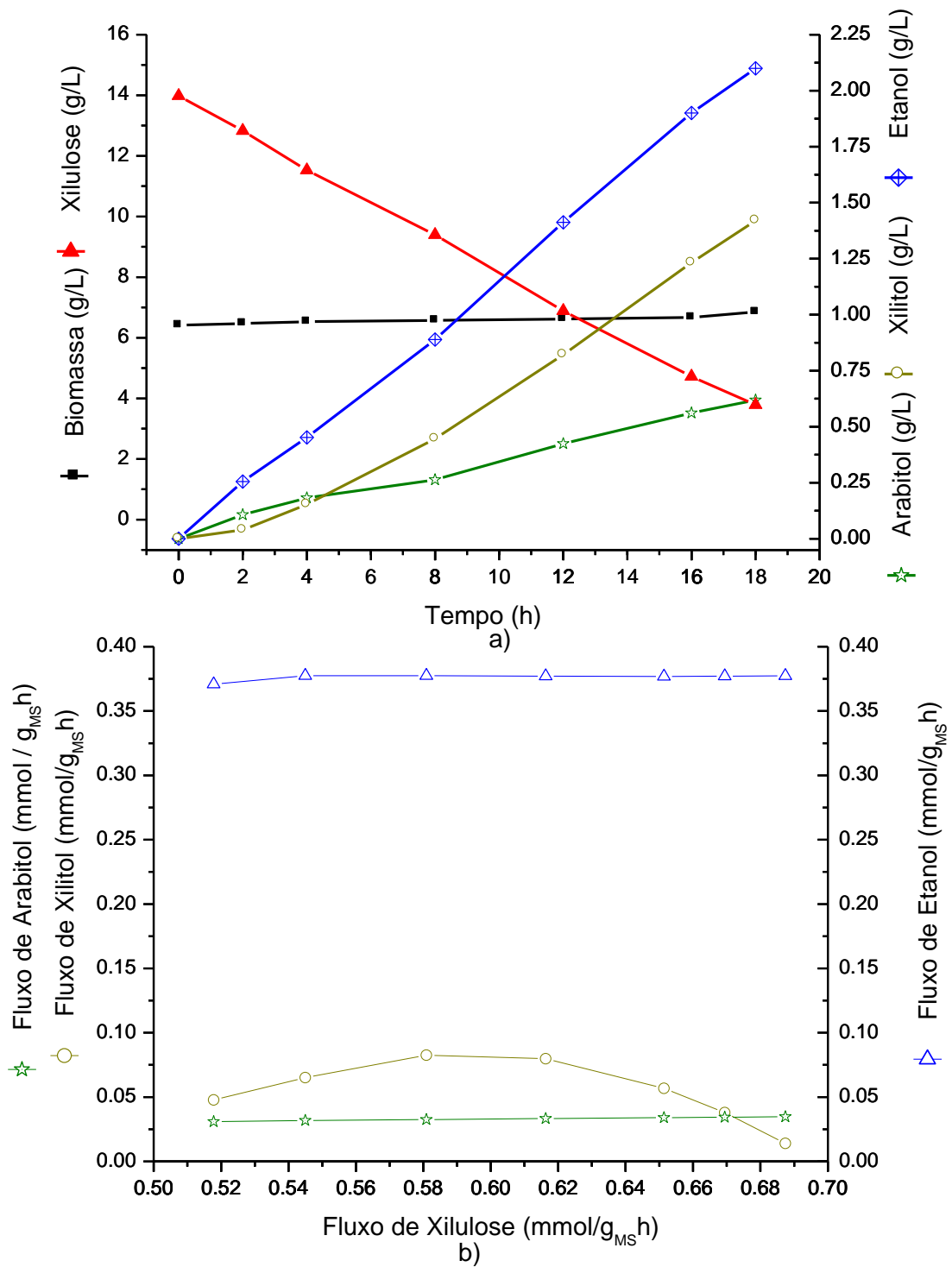
A Figura 5.3b mostra o perfil de fluxos para os produtos etanol e xilitol em função do fluxo de xilulose F_s . Para valores de F_s entre $1,05 - 0,78 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}\text{h}^{-1}$, são observados fluxos crescentes tanto de formação de xilitol quanto de etanol, sendo que o xilitol

se destaca ao apresentar valores de fluxos dez vezes maiores aos obtidos para o etanol. Nessa fase (até 11 h de cultivo) também se observa um crescimento baixo (μ entre 0.04 e 0.01 h⁻¹). A diminuição da concentração de xilulose leva à redução dos valores dos fluxos para o intervalo entre 0,77-0,55 mmol.g_{MS}⁻¹h⁻¹. Nessa outra fase do cultivo, o crescimento cessa e os fluxos de formação de etanol e xilitol se mostram dependentes do fluxo de substrato.

Esta condição não é evidentemente apropriada para a produção de etanol. Por isso, novos experimentos com menor fornecimento de oxigênio foram realizados. Com o experimento M1 como ponto de partida, foi realizado o segundo cultivo M2, no qual diferentes condições de limitação por oxigênio foram investigadas (Tabela 5.1). Para conseguir estudar diferentes níveis de fornecimento de oxigênio sob a mesma faixa de variação de fluxos de xilulose, o experimento M2 foi, na realidade, constituído pelas bateladas 4, 5, 6 e 7 (B4, B5, B6 e B7). Em cada batelada, uma mistura previamente estabelecida de N₂ puro, N₂ industrial e/ou Ar foi utilizada para manter uma determinada fração de oxigênio (y_{O_2}). O experimento foi iniciado com ~ 15 g.L⁻¹ de xilulose e quando o substrato se aproximava do esgotamento, um pulso de xilulose era aplicado para restaurar sua concentração inicial, as vazões de ar, N₂ industrial ou N₂ puro eram ajustadas à condição de mistura definida para a nova batelada e o estudo da condição de limitação seguinte era iniciado.

A Figura 5.4a mostra os principais resultados obtidos durante o cultivo em batelada (B4) da levedura sob condição de oxigênio limitado correspondente à fração molar de oxigênio no gás de entrada (y_{O_2}) de 2%. Para esta condição foi possível observar um comportamento similar ao obtido nas condições anaeróbias (Figura 5.2a), com produção de etanol, xilitol e arabitól e ausência de crescimento. Porém, o experimento B4 apresentou uma seletividade superior (1,48 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹), que representa 30% a mais que a obtida no cultivo na ausência de oxigênio ($y_{O_2} = 0$). Essa seletividade é também mais de 10 vezes maior que a obtida no cultivo M1 (0,13 g_{etanol}.g_{xilitol}⁻¹), o qual foi conduzido sob fornecimento de oxigênio mais elevado ($y_{O_2} = 4,7\%$). Estes resultados sugerem que esta linhagem de *S. cerevisiae* durante a fermentação de xilulose possui uma alta sensibilidade ao oxigênio, já que com pequenas variações do oxigênio fornecido na entrada é possível obter diferentes grandezas de seletividade em etanol. Esse comportamento também é observado em outras leveduras produtoras de etanol como, por exemplo, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* ou *Candida shehate*, as quais apresentam a necessidade de operação em condições microaerófilas, ou seja, demandam controle muito fino dos níveis de oxigênio dissolvido durante a fermentação de pentoses (OLOFSSON et al., 2008; NIGAM, 2000).

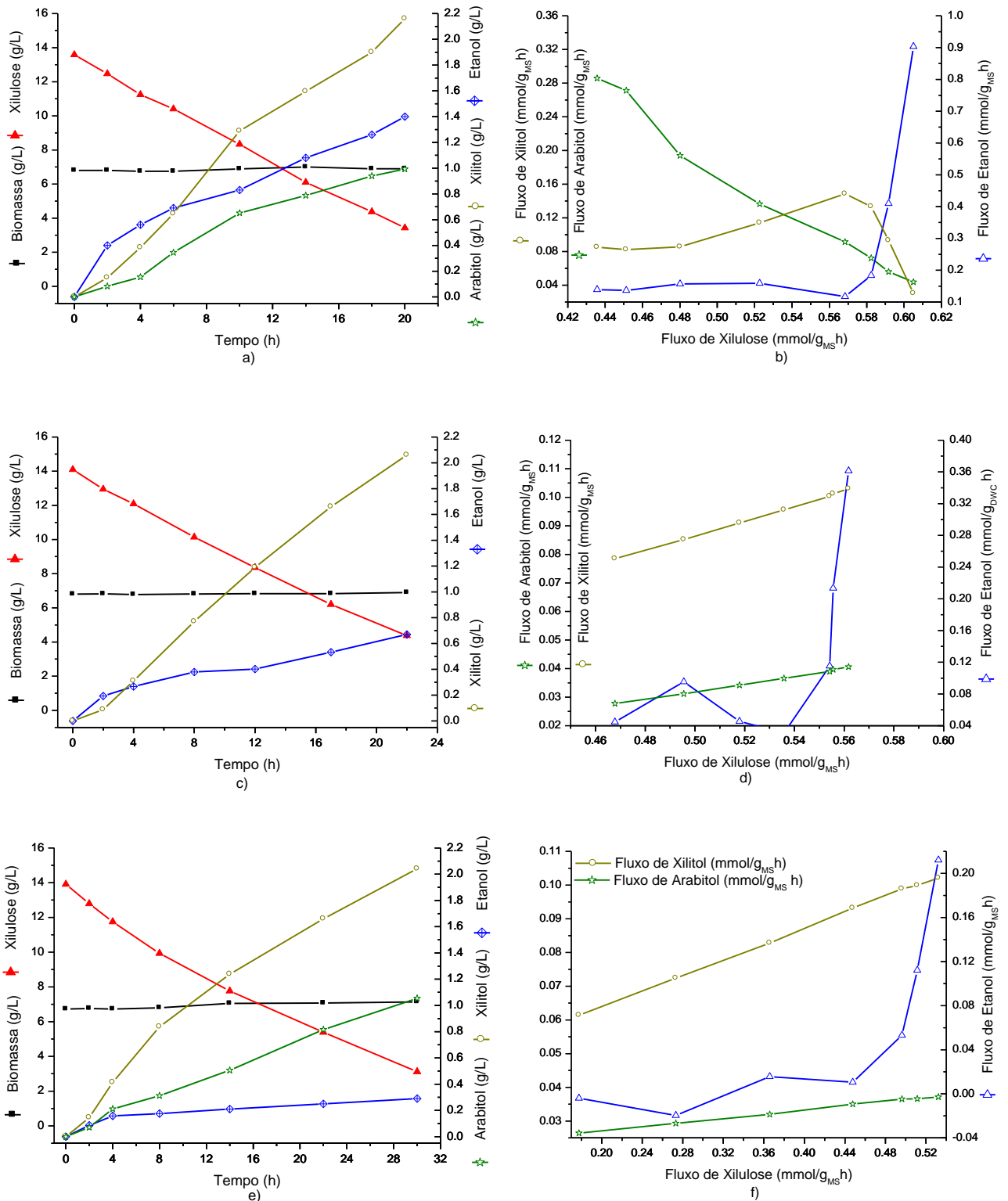
Figura 5.4 – (a) Batelada B4, Cultivo M2. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições de limitação de oxigênio com $y_{O_2} = 0,02$ (b) Fluxos em xilitol, arabitól e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.



Na Figura 5.4b é possível analisar o comportamento dos fluxos para os principais produtos, etanol, xilitol e arabitol em função do fluxo de xilulose. Os fluxos de xilulose variaram pouco (entre 0.51 e 0.70) e nessa faixa o fluxo de etanol manteve-se praticamente constante, com média de $0,377 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Quanto ao xilitol, apresenta um comportamento crescente com o aumento do fluxo de xilulose até $0,58 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, quando atinge seu máximo ($0,083 \text{ mmol}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Para fluxos de substrato superiores a $0,58$, o fluxo de xilitol diminui moderadamente até alcançar o valor de $0,048 \text{ mmol}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Finalmente no caso de arabitol, o fluxo apresenta uma produção baixa e constante durante toda a fermentação com um valor médio de $0,033 \text{ mmol}_{\text{arabitol}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Este comportamento pode sugerir que a via metabólica usada pela levedura para a produção de arabitol não tenha sido influenciada e/ou apresenta uma baixa sensibilidade em relação ao fluxo de xilulose nas condições de oxigenação utilizadas durante o cultivo.

A seguir, na Figura 5.5, são apresentadas as bateladas consecutivas B5, B6 e B7 que compõem o cultivo M2, e são a continuidade da batelada B4. A figura 5.5a mostra os perfis dos principais produtos obtidos durante a fermentação B5, na qual a fração molar de oxigênio no gás de entrada foi mantida em $y_{\text{O}_2}=0,024$, ligeiramente superior a do cultivo B4 ($y_{\text{O}_2}=0,024$). Para esta segunda batelada (B5), o principal produto obtido foi o xilitol apresentando uma concentração de $2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, seguido do etanol e arabitol com concentrações de $1,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectivamente. Também foi possível identificar concentrações de glicerol com valores entorno $0,45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Já na figura 5.5b é possível observar o perfil dos fluxos de etanol, xilitol e arabitol em função do fluxo de substrato, os quais apresentam um comportamento diferente ao observado na batelada anterior (B4). Ao analisar as duas figuras 5.5a e 5.5b, é possível observar que a produção de etanol inicialmente foi maior que a do xilitol (Figura 5.5a) para as primeiras 4 horas de cultivo, tempo no qual o fluxo de xilulose estava entre $0,61$ e $0,58 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figura 5.5b), em comportamento semelhante ao observado na Figura 5.4b. Após as 6 horas de cultivo, quando a concentração de xilitol se iguala à de etanol (momento no qual se obteve uma seletividade de $1,07 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$), o perfil do fluxo de etanol se estabiliza em um valor 10 vezes menor, o que diminui claramente sua velocidade produção. A partir deste tempo, o perfil de xilitol se reduziu lentamente e o de arabitol aumentou progressivamente, fatores que também influenciaram na perda de seletividade em etanol. Este resultado sugere que para esta condição de oxigenação e para fluxos de xilulose menores que $0,60$ a produção de etanol não é favorecida.

Figura 5.5 – Bateladas B5, B6 e B7, Cultivo M2. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições de limitação de oxigênio: (a) $y_{o_2} = 0,024$; (c) $y_{o_2} = 0,004$; (e) $y_{o_2} = 0,010$. Fluxos de metabólitos em função do fluxo de assimilação de xilulose para condições de limitação de oxigênio com: (b) $y_{o_2} = 0,024$; (d) $y_{o_2} = 0,004$; (f) $y_{o_2} = 0,010$. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.



As Figuras 5.5c e 5.5e, apresentam os perfis de consumo de substrato e produção de metabólitos para as bateladas 6 ($y_{O_2} = 0,004$) e 7 ($y_{O_2} = 0,010$), respectivamente. Nestas figuras é possível observar que o principal metabólito produzido nas duas fermentações foi o xilitol, seguido pelo arabitol e finalmente o etanol. O etanol, nosso produto de interesse, teve uma redução na produção no decorrer das bateladas, uma provável explicação para esta eventualidade, pode ser encontrada a faixa de fluxos de xilulose, já que para os dois casos, batelada 6 (Figura 5.5d) e batelada 7 (Figura 5.5f), a variação de F_s se desloca para 0,56 - 0,46 e 0,52 e 0,24 $\text{mmol} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. Ou seja, desde o início da batelada, os fluxos de xilulose são mais baixos do que os atingidos no experimento B4 (Figura 5.4b), justificando a baixa formação de etanol e o aumento na produção de xilitol e arabitol para estas condições de oxigênio limitado.

A Tabela 5.2 apresenta um resumo dos indicadores de desempenho do cultivo M2 para as 4 bateladas consecutivas. Constatou-se que a batelada B4 apresentou a melhor performance em termos de rendimento em etanol e menor conversão em subprodutos por ter sido conduzida sob fluxos mais altos de xilulose e limitação por oxigênio.

Tabela 5.2 – Indicadores de desempenho para o cultivo de *S. cerevisiae* M2 e M3 sob condições de limitação de oxigênio, tendo xilulose como substrato.

Parâmetro	Batelada 4	Batelada 5	Batelada 6	Batelada 7	Batelada 8 Cultivo M3
	$y_{O_2} = 0,020$	$y_{O_2} = 0,024$	$y_{O_2} = 0,004$	$y_{O_2} = 0,010$	$y_{O_2} = 0,003$
Velocidade específica de assimilação de substrato [$\text{g}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	0,086*	0,074*	0,065*	0,052*	0,063*
$Y_{\text{ETOH/S}}$ [$\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$]	0,205	0,105	0,051	0,019	0,155
$Y_{\text{XOH/S}}$ [$\text{g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$]	0,154	0,218	0,221	0,194	0,118
$Y_{\text{ARAOH/S}}$ [$\text{g}_{\text{arabitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$]	0,058	0,103	0,087	0,098	0,112

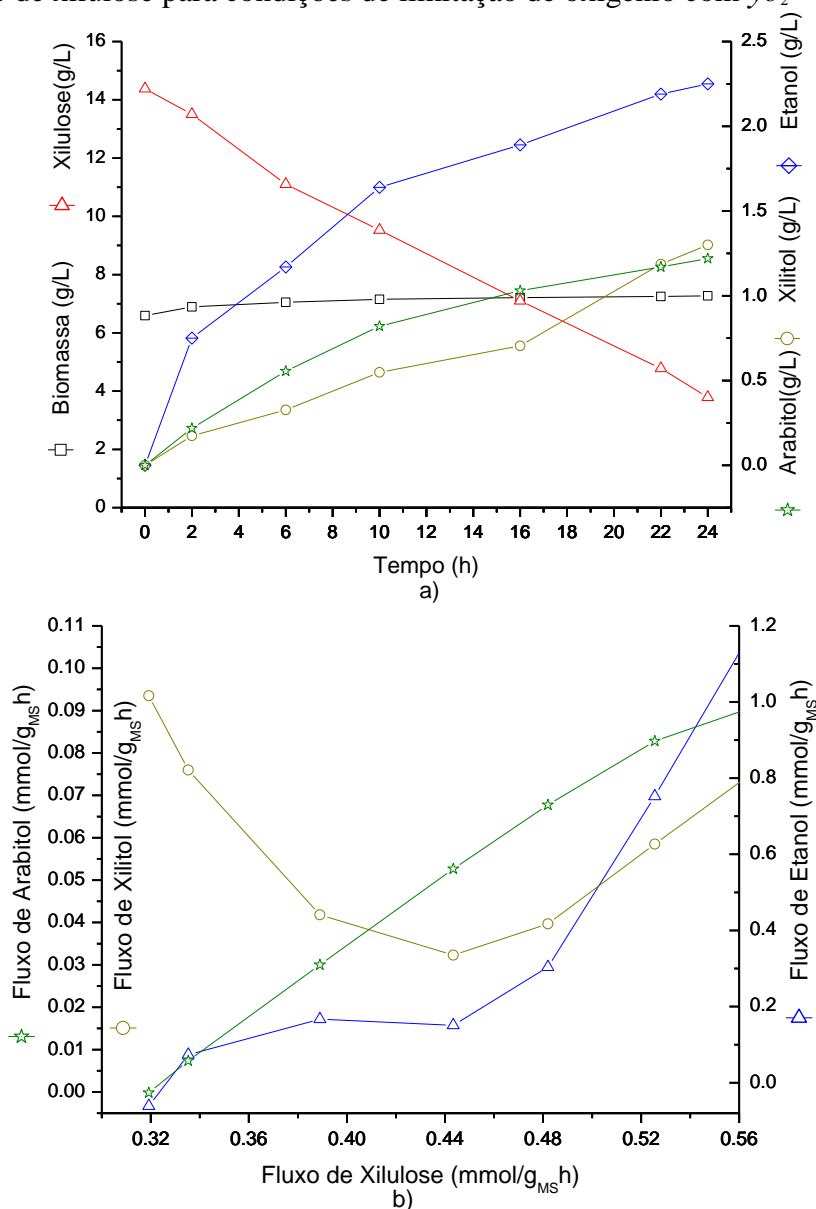
*Valores obtidos para uma concentração xilulose residual de 3,8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Os resultados obtidos durante o experimento M2 permitiram avaliar a influência do fluxo de xilulose sobre a produção de etanol para diferentes condições de

oxigenação do meio de cultura. Além disso, observa-se que o fluxo de carbono é direcionado para outras vias utilizadas pela levedura para a produção de xilitol e arabitól na regeneração de cofatores.

Finalmente, com o propósito de avaliar o metabolismo sob um nível de oxigenação mais baixa e analisar o perfil dos fluxos metabólicos, utilizou-se uma fração molar menor de O_2 na entrada do bioreator (cultivo M3), composto pelas bateladas 8, 9 e 10 (B8, B9 e B10), conforme detalhado na Tabela 5.1. O cultivo B8 foi conduzido com $y_{O_2} = 0,003$ e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 5.6a e 5.6b.

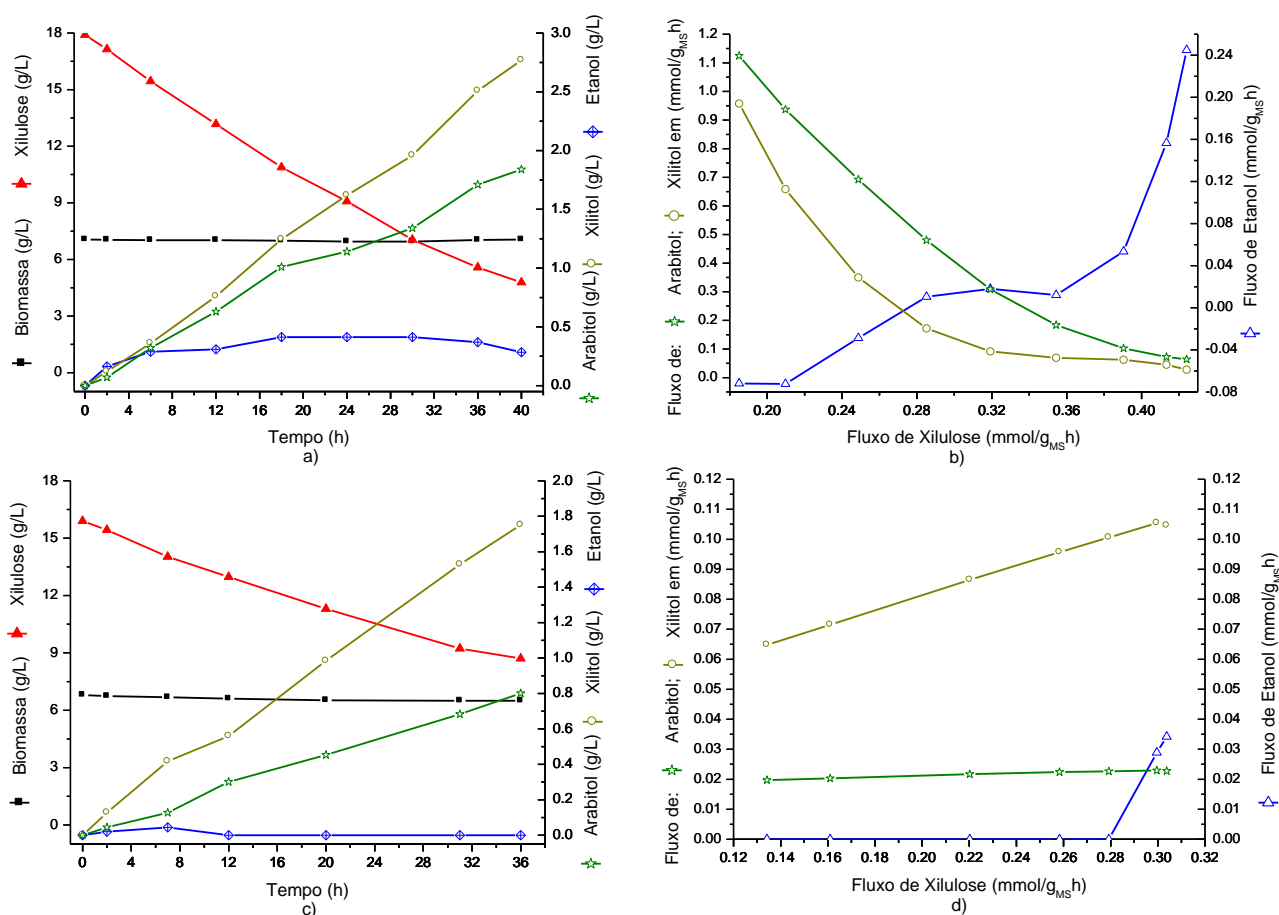
Figura 5.6 – (a) Batelada B8, Cultivo M3. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições de limitação de oxigênio com $y_{O_2} = 0,003$ (b) Fluxos de xilitol, arabitól e etanol em função do fluxo de xilulose para condições de limitação de oxigênio com $y_{O_2} = 0,003$.



A Figura 5.6a mostra os perfis de produção para os principais produtos, etanol, xilitol e arabitol durante a fermentação de xilulose pela levedura usando uma fração de oxigenação de $y_{O_2} = 0,003$. Neste caso, assim como no Experimento B4 ($y_{O_2} = 0,02$), o etanol foi o produto principal formado, atingindo uma concentração final de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$. Além disso, é possível observar que a assimilação de xilulose ocorreu à velocidade praticamente constante de $0,43 \text{ g}_{\text{xilulose}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nestas condições, foi possível alcançar valores de seletividade entre 4,3 a $3,0 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$ ($14,2$ a $9,9 \text{ mmol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mmol}_{\text{xilitol}}^{-1}$) durante as primeiras 10 horas de cultivo, tempo no qual os fluxos de xilulose estavam no intervalo de $0,56$ e $0,44 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Na Figura 5.6b são apresentados os perfis dos fluxos para etanol, xilitol e arabitol em função do F_s . Nesta figura, para valores de F_s inferiores a $0,44 \text{ mmol} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a seletividade em etanol foi reduzido devido ao favorecimento da produção de xilitol. Quanto ao arabitol, este apresentou um perfil de fluxo continuamente decrescente durante todo o cultivo, sendo de ordem de grandeza semelhante ao xilitol e 10 vezes menor que o fluxo de etanol. Verificou-se para esta condição de oxigenação a existência de um fluxo crítico de xilulose, que separa a condição de operação na qual a produção de etanol é favorecida daquela na qual xilitol é predominantemente formado. Os resultados obtidos na batelada B8 foram os melhores e enfatizam a importância da oxigenação no desenvolvimento de um processo de fermentação para produção de etanol a partir de esta pentose. Outros estudos com glicose observaram essa mesma importância do oxigênio na fermentação. Da mesma forma que o observado com a xilulose, o oxigênio influencia fortemente o metabolismo da levedura e conseqüentemente a produção de biomassa, etanol e subprodutos como glicerol, além de impactar nos parâmetros cinéticos (ALFENORE et al., 2004).

Assim como no cultivo M2, as bateladas consecutivas do cultivo M3 (B9, e B10), conduzidas com frações molares de oxigênio no gás de entrada reduzidas para $0,001$ e $0,002$, respectivamente, também apresentaram perfis de consumo de substrato constantes, e uma redução gradativa na produção de etanol. Além disso, o produto principal nas bateladas 9 e 10 (ver Figura 5.7a e 5.7c) também foi o xilitol, seguido pelo arabitol, porém sem produção do etanol (na batelada B9 a concentração de etanol foi entorno de $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ e na B10 foi praticamente igual a zero).

Figura 5.7 – Bateladas B9 e B10, Cultivo M3. Evolução da concentração celular, consumo de D-xilulose e formação de metabólitos durante o cultivo de *S. cerevisiae* em condições de limitação de oxigênio (a) $y_{O_2} = 0,001$. (c) $y_{O_2} = 0,002$. Fluxos em xilitol, arabitol e etanol em função do fluxo de assimilação de xilulose para condições de limitação de oxigênio (b) $y_{O_2} = 0,001$. (d) $y_{O_2} = 0,002$. Temperatura de 31 °C e pH 5,0.



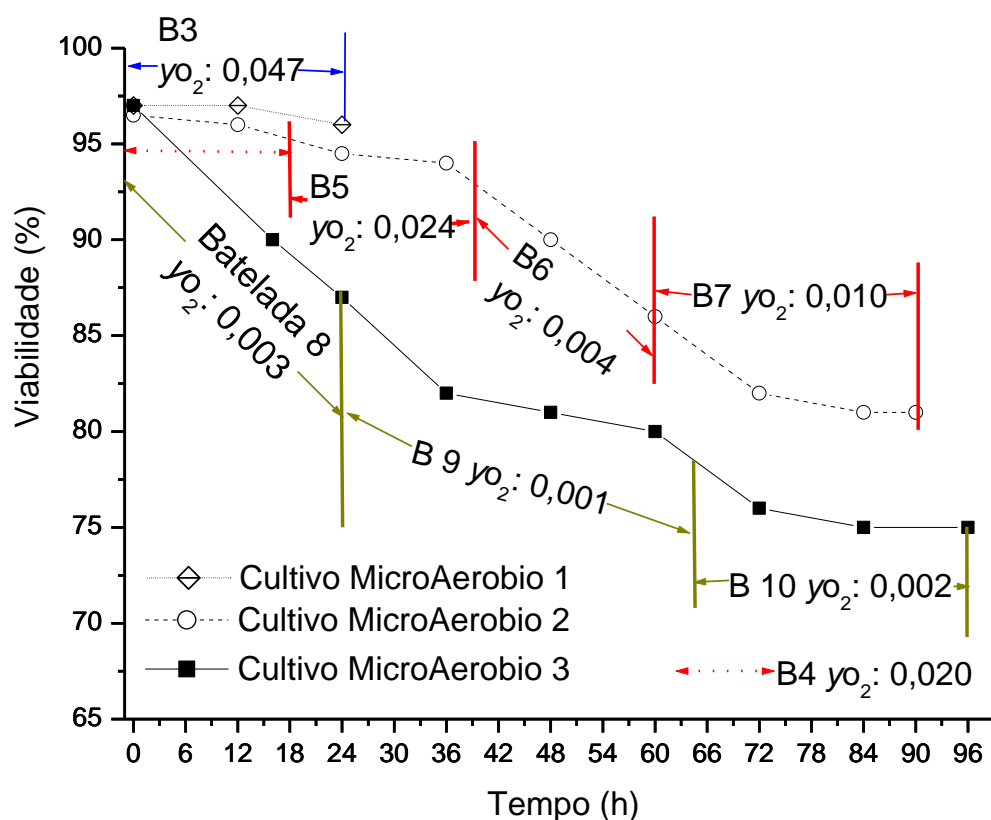
Ao analisar os fluxos nas Figuras 5.7b e 5.7c é possível observar que o valor de F_s já começa em 0,42 para B9 e 0,30 $\text{mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para a B10, valores bem inferiores aos fluxos de substrato encontrados em B8. Essas condições de fluxos mudaram o metabolismo na levedura, direcionando o carbono principalmente para a produção de arabitol e xilitol, zerando praticamente a produção de etanol. Neste caso, é provável que a levedura tenha produzido estes álcoois com o fim de regenerar os cofatores, já que na ausência de oxigênio, a levedura usa vias metabólicas alternativas para a produção de moléculas como o NAD^+ . Outra possível razão para a mudança no metabolismo do microrganismo seria a alta demanda energética voltada para sua manutenção; numa situação de estresse, como limitações de oxigênio e limitação de nutrientes (pelo uso de meio mínimo), as exigências de energia

necessárias para o microrganismo subsistir, podem ter zerado a produção do etanol. Tal comportamento pode ser comparado ao apresentado por outras linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* durante fermentações de xilose, como as apresentadas por Feng, et al. (2013). Os autores verificaram altos requerimentos energéticos para manutenção que levaram à ausência na produção de etanol. Por outro lado, outros autores também reportam que o estado fisiológico e o desempenho fermentativo das leveduras não permanecem constantes durante vários ciclos de fermentação, perdendo a sua capacidade fermentativa máxima depois de 6 a 8 ciclos (YAMAGISHI et al., 2001; HEGGART et al., 1999; KOBI et al., 2004).

Cultivos sob diferentes níveis de oxigenação: Viabilidade

Cultivos de longa duração em condições de oxigênio limitado podem gerar estresse para levedura, tendo um efeito negativo sobre a viabilidade (VERBELEN, 2009). Por esta razão a viabilidade foi monitorada (com intervalo de 12 horas) nos três cultivos realizados sobre condições microaeróbias. A figura 5.8 apresenta o comportamento da viabilidade ao longo das fermentações.

Figura 5.8 – Viabilidade celular ao longo dos cultivos em condições de oxigênio limitado M1, M2 e M3.



Ao comparar o perfil de viabilidade dos três cultivos (M1, M2 e M3), é possível observar que as bateladas conduzidas sob condições de aeração mais favoráveis, com fluxos de oxigênio superiores a $0,575 \text{ mml}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (B3 de M1, B4 e B5 de M2), apresentaram viabilidade estável, que permaneceu entre 97 e 94 %. Já para as bateladas B6 (do experimento M2) e B8 (do experimento M3), reduções expressivas na viabilidade são observadas na Figura 5.8, que cai de 95 % para ~ 80 %. Uma possível explicação para esta queda mais acentuada na viabilidade durante este intervalo de tempo se deve ao reduzido fornecimento de oxigênio implementado nessas bateladas, sendo de 0,116, 0,275 e 0,102 $\text{mml}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para B6, B7 e B8, respectivamente. O comportamento da viabilidade celular permitiu a observação do efeito negativo dos baixos níveis de oxigenação sobre a levedura, sendo o oxigênio um fator crítico que limita o crescimento em fermentações (VERBELEN, 2009). Essa limitação dificulta a formação de novas células, levando à redução da viabilidade. Porém, a figura 5.8 sugere que as células são capazes de se adaptar aos baixos níveis de oxigenação, já que a viabilidade se estabilizou em torno de 82 % e de 75 % ao final dos experimentos M2 e M3. Apesar dos fluxos de oxigênio extremamente baixos adotados nos experimentos B9 e B10 (0,027 e 0,056, respectivamente), a maior queda de viabilidade ocorreu no cultivo B8, pois as células cultivadas em aerobiose durante o preparo do inóculo foram subitamente expostas a um nível muito baixo de oxigenação.

Cultivos sob diferentes níveis de oxigenação: Balanço do carbono

Foram realizados balanços de carbono (C-mmol) para cada uma das fermentações de D-xilulose pela *S. cerevisiae* adaptada. Os resultados do balanço de carbono global para os cultivos nas diversas condições testadas estão resumidos na Tabela 5.3, utilizando dados das bateladas B1 (aeróbio), B2 (anaeróbio), B4 e B8 (microaeróbios), estes dois últimos foram escolhidos por apresentar os resultados mais interessantes. Para a estimativa do carbono assimilado convertido em biomassa celular, a fórmula elementar utilizada para *S. cerevisiae* foi $\text{CH}_{1.79}\text{O}_{0.57}\text{N}_{0.15}$ (SONNLEITNER e KÄPPELI, 1986).

Os experimentos que apresentaram melhor porcentagem de recuperação de carbono foram os realizados sobre condições de limitação de oxigênio com uma recuperação superior a 94%. Já os experimentos em condições anaeróbias e aeróbias apresentaram uma recuperação de 83% e 77% respectivamente. A perda de 23% do carbono observada para o caso do cultivo aeróbio pode ser explicada pelas altas vazões de ar utilizadas durante o experimento, ocasionando a diluição do CO_2 produzido durante a fermentação e gerando uma

fração molar próxima do limite de sensibilidade do analisador de gases. Finalmente, alguns ácidos como: ácido tartárico, ácido málico e ácido fumárico, foram identificados e determinados nos experimentos. Estes ácidos foram excluídos das figuras simplesmente porque os níveis eram muito baixos, mas foram levados em consideração nos balanços de carbono.

Tabela 5.3 – Balanço de carbono para a fermentação de xilulose nas condições aeróbia, anaeróbia e limitadas por oxigênio.

Condição de fermentação	Aeróbio		Anaeróbio		Oxigênio limitado y _{o2} = 0,020 B4 18 h		Oxigênio limitado y _{o2} = 0,003 B8 24h	
	44 h		13 h					
Composto	Carbono inicial	Carbono Final	Carbono inicial	Carbono Final	Carbono inicial	Carbono Final	Carbono inicial	Carbono Final
	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})	(C _{-mmol})
Xilulose	995,3	13,8	602,9	6,73	456,61	116,10	469,75	116,10
Etanol	67,3	0	0	180,32	0	84,0	0	90,0
Xilitol	0	54,9	0	108,59	0	42,97	0	39,34
CO ₂	0	423,8	0	85,85	0	109,90	0	95,98
Glicerol	0	4,7	0	12,64	0	18,28	0	32,16
Biomassa	186,5	449,6	355,0	350,31	251,17	251,98	258,22	260,0
Acetato	0	0	0	13,71	0	10,30	0	22,48
Succinato	0	4,5	0	23,76	0	13,5	0	3,42
Arabitol	0	10,7	0	31,42	0	30,26	0	36,92
*Outros	0	0	0	1,85	0	18,73	0	0
Total	1249,1	962,0	957,9	793,88	707,79	665,84	727,97	696,41
% Recuperação de Carbono	100,0	77,0	100,0	82,9	100,0	94,0	100,0	95,7

*Baixas concentrações de ácido tartárico, ácido fumárico e ácido málico.

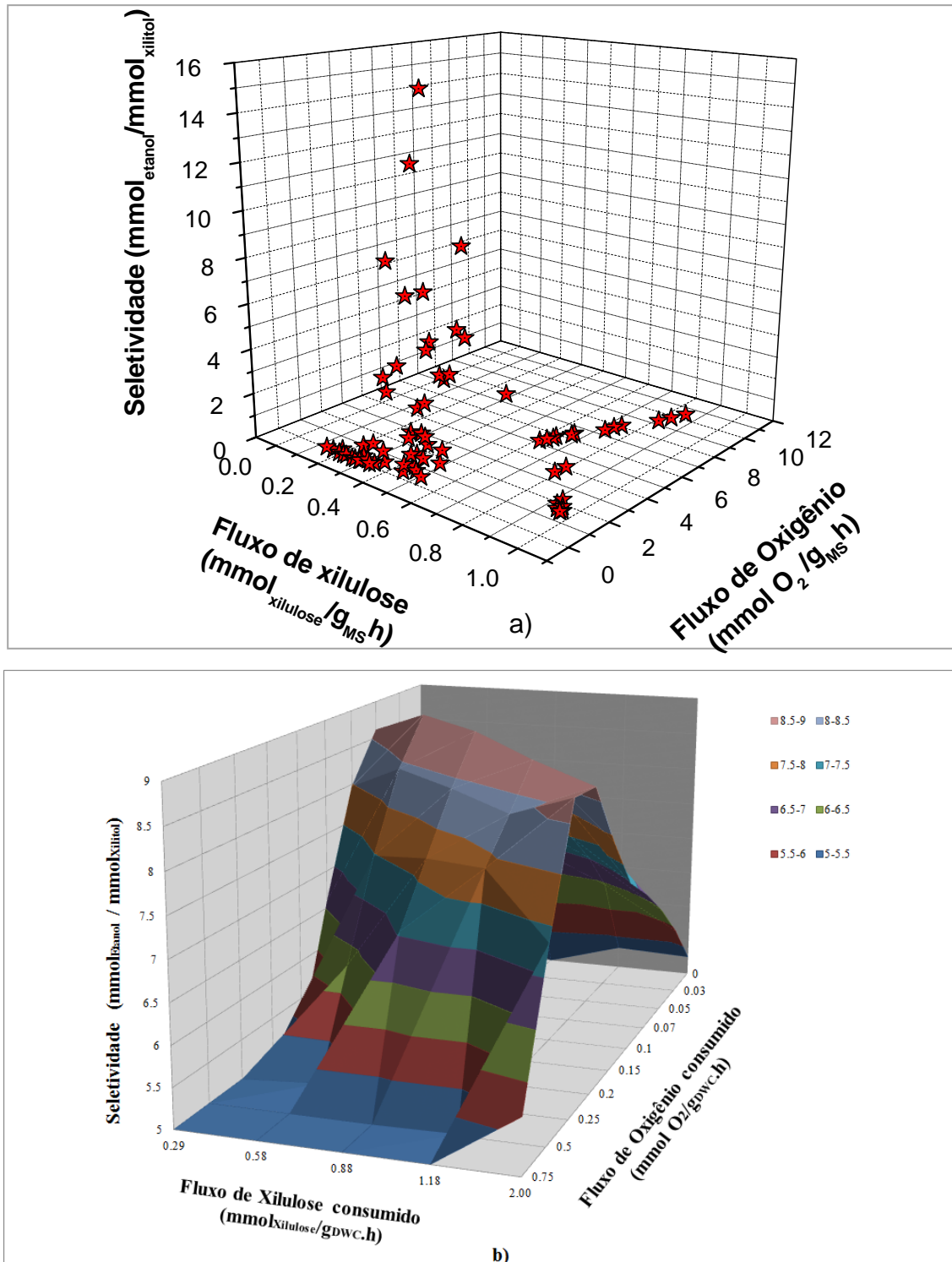
Cultivos sob diferentes níveis de oxigenação: influência dos fluxos de oxigênio e xilulose sobre a produção de etanol

No intuito de realizar um análise mais integrada de todos os resultados obtidos experimentalmente neste trabalho, os valores estimados para os fluxos de oxigênio, xilulose, etanol e xilitol a partir dos dados experimentais e das equações 5.2 a 5.5 foram utilizados para construir a Figura 5.9a, na qual a seletividade ($\text{mmol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mmol}_{\text{xilitol}}^{-1}$) calculada a partir dos fluxos de etanol e xilitol, é representada em função dos fluxos de xilulose e oxigênio.

Na Figura 5.9b, é reproduzida a superfície de resposta obtida a partir dos resultados de simulações realizadas no software Optflux utilizando o modelo iND750 que descreve o metabolismo de *S. cerevisiae*, o qual foi modificado por Cavalcanti (2013) para representar o metabolismo de xilulose.

Na Figura 5.9a é possível analisar de uma forma global todas as seletividades calculadas experimentalmente durante cultivos em batelada em diferentes condições de oxigenação. Destaca-se que as melhores seletividades obtidas com valores superiores a $12 \text{ mmol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mmol}_{\text{xilitol}}^{-1}$, estão localizadas na região onde os fluxos de xilulose apresentam valores médios entre 0,7 e 0,5 $\text{mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e os fluxos de oxigênio valores muito baixos, menores que $0,1 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mas superiores a zero, já que para cultivos anaeróbios as seletividades obtidas não superaram os $4 \text{ mmol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mmol}_{\text{xilitol}}^{-1}$. Por outro lado, a região que favorece a produção de xilitol, ou seja, que apresenta baixas seletividades em etanol, está bem definida em duas regiões: região “a”, caracterizada por fluxos de oxigênio superiores a $1,0 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e fluxos de xilulose superiores a $0,4 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, e região “b”, caracterizada por baixos fluxos de xilulose e oxigênio. A região “a” contém os dados dos experimentos em condições de limitações de oxigênio com $y=0,05$ (Ar/N₂ industrial) e do experimento aeróbio, onde não houve nenhuma produção de etanol. A região “b”, definida por fluxos de xilulose e oxigênio inferiores a 0,4 e 0,1, respectivamente, apresenta direcionamento do fluxo de carbono que favorece a produção de xilitol e arabitól, já que nas condições de baixa oxigenação as vias metabólicas utilizadas pela *S. cerevisiae* na produção destes álcoois envolvem menos reações, se comparadas com a via para a produção de etanol, oferecendo uma alternativa mais eficiente para a regeneração de cofatores como o NAD⁺. Vale ressaltar que nesta condição a respiração da levedura está altamente limitada pelos baixos fluxos de oxigênio e, portanto, a regeneração do NAD⁺ pela via respiratória é desprezível.

Figura 5.9 – Valores de seletividade ($\text{mmol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mmol}_{\text{xilitol}}^{-1}$) em função dos fluxos de xilulose e oxigênio, obtidos a partir de: (a) Dados experimentais durante fermentações em batelada, anaeróbia e micro aeróbia (b) Dados *in silico* simulados com o software Optflux.



Fonte: (a) elaboração própria (b) CAVALCANTI (2013).

Por outro lado, como os fluxos da via pentose fosfato que chegam ao gliceraldeído-3-fosfato e posteriormente ao piruvato são baixos, a regeneração do NAD⁺ pela via do piruvato (descarboxilação pela piruvato descarboxilase, formando aldeído acético, reduzido a etanol com oxidação de NADH para NAD⁺) não é favorecida (NELSON, 2011). Os resultados apresentados na Figura 5.9a sugerem que a produção de etanol só ocorre quando a via de formação de xilitol pela XDH está saturada, em condições de fluxos mais altos de xilulose, favorecendo o catabolismo do excedente pela via pentose fosfato em direção ao piruvato.

Comparando os resultados experimentais (Figura 5.9a) com os simulados (Figura 5.9b), é possível observar algumas similaridades. Por exemplo, na região de altos fluxos de oxigênio e de fluxos médios a altos de xilulose foram obtidas baixas seletividades em etanol. Por outro lado, na zona de fluxos mais baixos de oxigênio ($\sim 0,1 \text{ mmolO}_2 \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e valores médios de fluxos de xilulose (entre 0,3 e 0,6 $\text{mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{\text{MS}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), são obtidas as melhores seletividades em etanol. Finalmente, assim como para os dados experimentais, nas simulações em condições anaeróbicas, os resultados de seletividade em etanol não foram os mais altos, e para condições aeróbicas não houve produção de etanol.

Os resultados obtidos nas simulações não foram idênticos aos obtidos experimentalmente, provavelmente porque o software Optflux fornece resultados de forma semi-qualitativa e não quantitativa. Existem semelhanças, tanto na tendência quanto na ordem de grandeza dos resultados da seletividade em função dos fluxos de xilulose e oxigênio, o que torna o software Optflux uma ferramenta útil, que pode ajudar na otimização das condições de operação do bioreator visando melhores produtividades de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana.

CONCLUSÕES

Dotada de um conjunto de vias metabólicas altamente eficientes no catabolismo de glicose e frutose, a levedura *S. cerevisiae* é capaz de produzir etanol em condições anaeróbias ou de limitação por oxigênio, com rendimentos próximos ao teórico, alta produtividade e elevada especificidade, sendo a mais utilizada industrialmente. No entanto, para a produção de etanol 2G a partir da xilose presente nos resíduos hemicelulósicos utilizando esse organismo, a concepção do futuro processo precisa levar em consideração as peculiaridades do metabolismo da D-xilulose, isômero da xilose, em *S. cerevisiae*.

No presente trabalho, a influência dos fluxos de oxigênio e de xilulose no metabolismo de uma cepa de *S. cerevisiae* especialmente adaptada à assimilação de xilulose foi amplamente caracterizada. Os resultados obtidos mostraram que os fluxos de xilulose e de oxigênio definem os produtos formados pela célula. Em condições plenamente aeróbias, apenas para fluxos de xilulose acima de $0,8 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}\text{h}^{-1}$, a formação de biomassa é favorecida. Para fluxos de xilulose abaixo desse valor, xilitol é o principal produto formado, com fluxos cerca de 10 vezes superiores aos de formação de biomassa. Não ocorre formação de etanol nessa condição de cultivo.

Já em condições estritamente anaeróbias, o fluxo de carbono se distribui nos produtos etanol, xilitol e arabitól para uma faixa de fluxos de xilulose variando entre 0,4 e $1,5 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Em condições de baixo fluxo de oxigênio, o metabolismo é regulado pelo nutriente limitante, que pode ser o oxigênio ou a xilulose, dependendo do nível de limitação por oxigênio imposto. Os melhores valores de seletividade em etanol (acima de $10 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$) foram observados para fluxos de oxigênio entre 0,03 e $0,1 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}\text{h}^{-1}$ e fluxos de xilulose entre 0,4 e $0,6 \text{ mmol.g}_{\text{MS}}^{-1}\text{h}^{-1}$ (metabolismo regulado pelo fornecimento de oxigênio). Em fluxos de oxigênio acima de 0,1, três situações foram observadas: i) fluxos direcionados à formação de arabitól, etanol e xilitol; ii) fluxos direcionados apenas à formação de arabitól e xilitol; iii) fluxos direcionados apenas à formação de etanol e xilitol. Nos três casos, a seletividade em etanol fica abaixo de $8 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$.

Diante dos resultados obtidos, a análise preliminar das vias metabólicas envolvidas na assimilação da xilulose sugere que as reações responsáveis pela regeneração do cofator NAD⁺ a partir do NADH desempenham um papel fundamental na definição dos fluxos dos

diferentes produtos. Em condições plenamente aeróbias, aparentemente são ativadas duas vias de regeneração do NAD⁺: a reação catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) na Via Pentose Fosfato (sentido xilulose para xilitol) e a reação catalisada pelos citocromos na cadeia respiratória. Já na condição estritamente anaeróbia, além da reação catalisada pela XDH, é também ativada a reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase. Em condições de limitação por oxigênio, as 3 vias alternativas de regeneração do NAD⁺ podem ser utilizadas pela célula, o que explica a multiplicidade de comportamentos observados nessa condição. Nesse sentido, o software Optflux constitui uma valiosa ferramenta de apoio para elucidar a questão da ativação seletiva das vias de regeneração do NAD⁺ assim como para identificar as principais variações nos fluxos intracelulares para as diferentes condições de cultivo estudadas.

Do ponto de vista de desenvolvimento de um processo SIF industrial para produção de etanol a partir da fração hemicelulósica, os resultados obtidos no presente estudo indicam que valores superiores de seletividade em etanol podem ser alcançados apenas na operação com fluxos de oxigênio entre 0,03 e 0,1 mmol_{O₂}·g_{MS}⁻¹·h⁻¹ e fluxos de xilulose entre 0,4 e 0,6 mmol_{xilulose}·g_{MS}⁻¹·h⁻¹. A manutenção do fluxo de xilulose nos valores desejados é de execução simples, adotando-se o modo de operação batelada alimentada ou contínuo. Já a manutenção dos baixos níveis de oxigenação, dependeria de um controle rigoroso da concentração de oxigênio dissolvido e do uso de sensores com alta sensibilidade, capazes de detectar baixas concentrações de oxigênio. Embora economicamente viável, a operação de reatores industriais nas condições de limitação por oxigênio seria um grande desafio.

REFERÊNCIAS

- ALFENORE, S. et al. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 63, p. 537-542, 2004.
- BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chem. Eng. Science.** v. 90, p. 92–100, 2013.
- CHIANG L-C. et al. D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol.** v. 42, p. 284-289, 1981a.
- CHIANG, L. C. et al. Enzymatic and Microbial Preparation of D-Xylulose from D-Xylose. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 42, p. 66-69, 1981b.
- FENG, X.; ZHAO, H. Investigating xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* via ¹³C metabolic flux analysis. **Microbial cell factories.** v.114, p. 1-12, 2013.
- FLIKWEERT, M. et al. Pyruvate Decarboxylase: An Indispensable Enzyme for growth of *S. cerevisiae* on Glucose. **Yeast.** v.12, p. 247-257, 1995.
- HEGGART, H. et al. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. **Technical Quarterly.** v. 36, p. 383-406, 1999.
- KOBI, D. et al. Two-dimensional protein map of an “ale”-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. **FEMS Yeast Research.** v. 5, p. 213-230, 2004.
- KRUCKEBERG, A. L. The hexose transporter family of *S. cerevisiae*. **Archives of Microbiology.** v. 166, p. 283–92, 1996.
- MEINANDER, N. et al. A heterologous reductase affects the redox balance of recombinant *S. cerevisiae*. **Microbiology.** v. 142, p. 165-172, 1996.
- MORAES, G.S. Influência da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da xilose. **Dissertação de Mestrado**, PPGEQ-UFSCar, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5ª Ed, Sarver, 2011.
- SAKAMOTO T. et al. Combined biological and chemical pretreatment method for lignocellulosic ethanol production from energy cane. **Journal of Biotechnology.** v. 158, p. 203–210, 2012.
- SENAC T.; HAHN-HAGERDAL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, p. 120-126, 1990.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts.** 2nd edition, Prentice Hall, 2002.

SIMS, A. P.; BARNETT, J. A. The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anaerobically fermenting yeasts (Kluyver effect). **J Gen Microbiol.** v.106, p. 277-288, 1978.

SONNLEITNER, B.; KÄPPELI, O. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 28, p. 927-937, 1986.

WANG P. Y.; SCHNEIDER H. Growth of yeasts on D-xylulose. **Can J Microbiol.** v. 26, p. 1165-1168, 1980.

UENG P.P. et al. D-Xylulose fermentation in yeasts. **Biotechnol Lett.** v. 3, p. 315-320, 1981.

VERBELEN, P. J. et al. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 82, p. 1143–1156, 2009.

WEUSTHUIS, R. A. et al. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. **Microbiology.** v. 140, p. 703-715, 1994.

YAMAGISHI, H. Appearance of poor-fermenting variants in Brewing yeast culture. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** v. 65, p. 2361-2363, 2001.

CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam potencial de aplicação para o desenvolvimento de um processo de produção de etanol de 2G a partir do bagaço de cana, integrando as frações C6 (celulose) e C5 (hemicelulose) o que viabilizaria economicamente a produção industrial de bioetanol.

Na primeira parte deste trabalho, a avaliação para o aproveitamento da fração de celulose do bagaço foi realizada com sucesso. Os resultados obtidos no estudo da hidrólise de bagaço de cana permitiram comparar estratégias distintas de operação para um reator de hidrólise, sendo que a estratégia que apresentou melhores resultados foi a de operação em regime de batelada alimentada na qual eram adicionados tanto enzima quanto substrato. A principal razão pela qual esta estratégia se mostrou melhor, foi por apresentar menor sensibilidade às variações no preço da enzima. No entanto, houve um limite em que bateladas sucessivas se tornaram vantajosas, para valores de enzima inferiores a 0,35 US\$/kg_{enzima}. É claro que estes resultados são baseados apenas em um estudo de caso, e têm o propósito de demonstrar a utilidade da ferramenta. O processo de intensificação num reator semi-contínuo (adicionando enzima e substrato, enquanto água evapora naturalmente) conduziu a concentrações de glicose de aproximadamente 200 g.L⁻¹, concentrações geralmente utilizadas nos processos de fermentação alcoólica.

Os resultados da modelagem cinética obtidos com o uso do interpolador *fuzzy*, mostraram que o uso desta ferramenta de modelagem para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos permite representar o processo de uma forma robusta e confiável. Outra vantagem no uso desta metodologia é a possibilidade de ser aplicada na hidrólise enzimática de outros materiais lignocelulósicos, distintos do bagaço de cana de açúcar.

Na segunda parte do trabalho, para a avaliação do aproveitamento da fração de hemicelulose presente no bagaço de cana, o uso da pressão seletiva (engenharia evolutiva) em linhagem de *S. cerevisiae* comercial, para a obtenção de uma cepa adaptada ao crescimento em xilulose, apresentou em ótimos resultados. A linhagem obtida a partir da sequência de experimentos mostrou um melhor direcionamento do carbono para a produção de etanol, com seletividade de $\sim 23 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$ e rendimento de $0,42 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$.

Nos cultivos realizados em biorreator com a levedura selecionada, foi realizado um mapeamento completo da resposta da célula frente a diferentes frações de oxigênio (y_{O_2}) no gás de (entre 0 e 0,21), correspondendo a fluxos de oxigênio entre 0 e $10 \text{ mmol}_{O_2} \cdot \text{g}_{MS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, para fluxos de xilulose entre 0,1 e $1,1 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{MS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Identificou-se uma região para operação do biorreator que favorece a manutenção de seletividades acima de $10 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$, definida por fluxos de xilulose com valores entre 0,4 e $0,6 \text{ mmol}_{\text{xilulose}} \cdot \text{g}_{MS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e fluxos de oxigênio entre 0,03 e $0,1 \text{ mmol}_{O_2} \cdot \text{g}_{MS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

O pH também apresentou uma influência significativa sobre o desempenho do processo, já que a atividade da enzima xilitol desidrogenase é favorecida em pH maior que 5. Por essa razão, os melhores valores de seletividade e rendimento alcançados nos cultivos em biorreator ($15,7 \text{ mol}_{\text{etanol}} \cdot \text{mol}_{\text{xilitol}}^{-1}$ e $0,205 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$, respectivamente) foram inferiores aos obtidos nos experimentos em câmara incubadora, onde os valores de pH chegaram a 4,7 ao final das fermentações.

A análise dos fluxos de produção de metabólitos indicou que a levedura selecionada apresenta uma alta sensibilidade aos níveis de oxigênio disponível no meio de fermentação, fato que compromete a viabilidade de um processo industrial para produção de etanol a partir desta pentose, tendo em vista a dificuldade em controlar a concentração de oxigênio dissolvido em valores da ordem de ppm em biorreatores de grande volume.

Da mesma forma, a necessidade de conduzir os cultivos em pHs ácidos para manter a alta seletividade em etanol dificulta a implementação do processo com alto rendimento em etanol a partir de xilose operado como “simultânea isomerização e fermentação”, já que a xilose só é eficientemente convertida em xilulose pela enzima xilose isomerase em pHs alcalinos.

Desta forma, conclui-se que a produção de etanol a partir de xilose via processo SIF é plenamente factível e escalonável, a curto prazo, desde que seja considerado o cenário de conversão da xilulose em um mix de produtos contendo aproximadamente 1/3 de xilitol e 2/3 de etanol. A continuidade das pesquisas dedicadas à otimização das vias

metabólicas de *S. cerevisiae* envolvidas na assimilação de xilulose, à estabilização da glicose isomerase em pHs ácidos por Engenharia Enzimática e à análise econômica de processos alternativos via Síntese de Processos é fundamental para que um processo com maior seletividade em etanol seja desenvolvido a longo prazo.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a continuação do trabalho aqui iniciado, propõe-se implementar um sistema automático que permita realizar uma alimentação de bagaço de acordo com o perfil simulado pelo programa.

Realizar experimentos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), introduzindo a levedura *S. cerevisiae* no meio da hidrólise, visando à otimização deste processo para a obtenção de altas produtividades de etanol 2G.

Implementar o interpolador *fuzzy* como ferramenta de modelagem para hidrólise de outros materiais lignocelulósicos, como a palha de bagaço ou a casca de soja. A hidrólise enzimática destes materiais está sendo atualmente objeto de pesquisa no Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Depois que os modelos cinéticos "locais" sejam ajustados e caracterizados (para estes novos materiais lignocelulósicos), será possível desenvolver um interpolador *fuzzy* para a modelagem cinética que, tendo por base modelos simples, permita obter um modelo "global" de hidrólise.

Em relação à segunda parte do trabalho, sugere-se inicialmente a realização de experimentos complementares em biorreator, conduzidos em menores valores de pH e maiores concentrações iniciais de xilulose. Esses experimentos são importantes para comprovar a influência do pH na formação de xilitol e também para enriquecer os dados de fluxo metabólicos em condições de fluxos de xilulose mais altos, complementando a análise do metabolismo por meio do uso das simulações via Optflux como suporte.

A otimização das vias metabólicas de assimilação de xilulose poderia ser realizada inicialmente *in silico*, via Optflux, utilizando funções objetivo que maximiza o fluxo em etanol e/ou minimiza a produção de xilitol, permitindo o projeto *in silico* de um mutante potencialmente produtor de etanol, que apresente menor formação de xilitol e menor

sensibilidade aos níveis de oxigênio, o que contribuiria para a maior viabilidade do processo em escala industrial.

Em relação à metodologia de Engenharia Evolutiva, cultivos em bateladas consecutivas, na presença de inibidores tanto da respiração quanto da enzima xilitol desidrogenase, poderiam ser realizados visando o isolamento de uma linhagem com as características desejadas de menor formação de xilitol e menor sensibilidade aos níveis de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- AL-ZUHAIR, S. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis, **Bioresource Technol**, v. 99, p. 4078, 2008.
- BALAT, M.; BALAT, H.; O'ZB, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p.551-573, 2008.
- BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **Int Sugar J.**, v. 104, p. 64–67, 2002.
- BERTONCINI, E. I. Projeto diretrizes de políticas públicas para a agroindústria canavieira do Estado de São Paulo - Programa de Pesquisa em Políticas Públicas (PPPP). In: **Workshop: Aspectos ambientais da cadeia do etanol de cana-de-açúcar**, 2008, Piracicaba.
- BiodieselBR. **Biocombustíveis: da primeira a quarta geração**. 2008. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/destaques/2007/biocombustiveis-primeira-quarta-geracao-10-03-08.htm>. Acesso em Janeiro de 2013.
- BRASILAGRO. **Biocombustível de 2ª geração está na rampa de decolagem**. São Paulo. 2013. <http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/11/49979>. Acesso em Janeiro de 2013.
- BULL, J. J., WICHMAN, H. A. Applied evolution. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 32, p. 183-217, 2001.
- CADIÈRE, A. et al. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. **Metabolic Engineering**. v.13, p. 263–271, 2011.
- CAVALCANTI, I. D. C. **Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)—Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- CHIANG, L. C. et al. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 2, p. 284–289, 1981.
- CHIU, S. Fuzzy model identification based on cluster estimation. **Journal of intelligent & Fuzzy systems**. v. 2, p. 267-278, 1994.
- CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425–441, 2007.
- DIAS, M. O. S. et al. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72-78, 2013.
- DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. **Microbial Cell Factories**. v. 12, p. 1-17, 2013.

EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 12, p. 225-228, 1990.

FONSECA, R. R. et al. A fuzzy-split range control system applied to a fermentation process. **Bioresource Technology**. v. 142, p. 475-482, 2013.

FURLAN, F. F. et al. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers and Chemical Engineering**, v.43, p. 1-9, 2012.

FURLAN, F. F. et al. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible? **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p.142, 2013.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.78-88, 2006.

GONG, C. et al. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 430-436, 1981.

GONG, C. et al. **Production of ethanol by yeast using xylulose**. US4490468, AUSPTO 4, 1984.

HAHN-HÄGERDAL, B.; PAMMENT, N. Microbial pentose metabolism. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 113-116, p. 1207-1209, 2004.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HOLTZAPPLE, M. Hemicellulose. In: MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADLER, M.J. (Ed.). **Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition**. London: Academic Press, p. 2324-2334, 1993.

HON, D. N. S. **Chemical modification of lignocellulosic materials**. Inc. 370p. 1996.

HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Industrial application of fuzzy control in bioprocesses. **Adv Biochem Eng Biotechnol**. v. 87, p.151-171, 2004.

HORIUCH, J. I.; HIRAGA, K. Industrial application of fuzzy control to large-scale recombinant vitamin B2 production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.87, p. 365-371, 1999.

JEPPSON, M. et al. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1604-1609, 2002.

JEPPSSON, H.; YU, S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulose and glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in chemostat culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1705–1709, 1996.

KUTSCHERA, U.; NIKLAS, K. J. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. **Naturwissenschaften**. v. 91, p. 255–276, 2004.

KUYPER, M. et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**. v. 5, p. 925–934, 2005.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 506–577, 2002.

MACRELLI, S. et al. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 22, 2012.

NELLES, O. **Nonlinear System Identification**. Springer, Kronberg (Germany), 2001.

NUCCI, E. R. **Aplicação da lógica fuzzy na produção de penicilina G Acilase em cultivos de *Bacillus megaterium***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2003.

OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LIDÉN, G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 112–20, 2008.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2007.

PITKÄNEN, S. P. et al. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metab. Eng.**, v. 5, p. 16-31, 2003.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 150p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de processos químicos) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Campinas, 2007.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**. v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

RAO, K.; CHELIKANI, S.; RELUE, P. et al. A novel technique that enables efficient conduct of simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 101–117, 2008.

ROTHSCHILD, W. G. **Fractals in chemistry**. Wiley, New York, 1998.

SAHA, B. C. Hemicelulose Bioconversion, **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANCHEZ, R. G. et al. Research Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, p. 3-13, 2010.

SCHILITTLER, L. A. F. S. **Engenharia de um bioprocesso para produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciências)—Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

SENAC, T.; HAHN-HAGERDAL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose and glucose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 120-126, 1990.

SHEN, X. L.; XIA, L. M. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v.39, p.1363-1367, 2004.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química. Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p.35-42, 2012.

SIMAS, J. P. **Biocombustíveis e produção de alimentos: Uma análise das controvérsias científicas e sociais**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Energia) — Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do ABC, Santo André, 2010.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101 , p.1570–1580, 2010.

SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. **Applied and environmental microbiology**. v.69, p. 1990–1998, 2003.

SOUSA, R. Jr.; ALMEIDA, P.I.F. Design of fuzzy system for the control of a biochemical reator in fed-bacth culture. **Process biochemistry**. p. 461-469, 2001.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1 – 11, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

THONGEKKAEW, J. et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**. v. 60, p. 144-146, 2008.

VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391–418, 2006.

VARANASI, S. et al. Methods for fermentation of xylose and hexose sugars. **USPTO** v. 8,507,232, 2013.

WALFRIDSSON, M.; BAO, X.; ANDERLUND, M. et al. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *thermus thermophilus xyla* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, 4648–4651, 1996.

WILLIAMS, J. C. Macroscopic flow models. In: Gartner NH, Messer CJ, Rathi A (eds). Disponível em http://www.tft.pdx.edu/docs/revised_monograph_2001.pdf, 2001.

WISSELINK, H. W. et al. Novel Evolutionary Engineering Approach for Accelerated Utilization of Glucose, Xylose, and Arabinose Mixtures by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains. **Applied and environmental microbiology**. v. 75, p. 907–914, 2009.

WYMAN, C. E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals and power. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 254–262, 2003.

YU, S.; JEPPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 44, p. 314–320, 1995.

ZADEH, L. A. Fuzzy sets. **Information and Control**. v.8, p. 338–353, 1965.

ZHANG, Y. H. P. et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering** v.97, p.214–223, 2007.