

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

**PATRÍCIA MARINA DE AQUINO**

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE COM GLICOSE  
ISOMERASE e *Saccharomyces cerevisiae* COIMOBILIZADAS EM GEL  
DE ALGINATO**

**SÃO CARLOS/SP**

**2013**

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE COM GLICOSE ISOMERASE e**  
***Saccharomyces cerevisiae* COIMOBILIZADAS EM GEL DE ALGINATO**

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

**PATRÍCIA MARINA DE AQUINO**

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE COM GLICOSE ISOMERASE e**  
***Saccharomyces cerevisiae* COIMOBILIZADAS EM GEL DE ALGINATO**

**Dissertação de Mestrado 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 mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.**

**Orientadora: Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano**

**SÃO CARLOS/SP**

**2013**

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

A657pe

Aquino, Patrícia Marina de.

Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato / Patrícia Marina de Aquino. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
101 f.

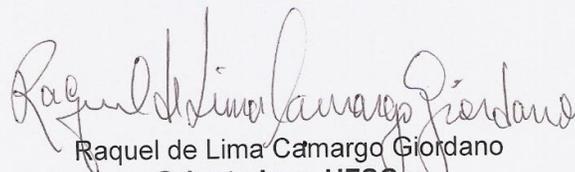
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

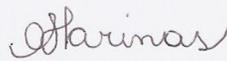
1. Fermentação. 2. Isomerização. 3. Xilose. 4. Xilose isomerase. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

CDD: 660.28449 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**PATRÍCIA MARINA DE AQUINO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 20 DE JUNHO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:

  
Raquel de Lima Camargo Giordano  
**Orientadora, UFSCar**

  
Cristiane Sanchez Farinas  
**EMBRAPA**

  
Teresa Cristina Zangiriami  
**UFSCar**

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Hermes e Sueli, por trilharem o caminho a seguir.

À Cynthia, à Taynara e ao Thor, pela fundamental companhia ao caminhar.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me concedeu e que foram essenciais para me guiar até aqui, sem a sua presença pouco teria tanto significado.

Agradeço à minha família, meus pais Hermes e Sueli, pelo exemplo, paciência, incentivos, suporte e amor. Às minhas irmãs por todo o treinamento emocional, aprendizados, ensinamentos e todo o suporte incondicional durante toda a minha vida. Sem vocês eu ainda seria mais incompleta do que sou.

À Professora Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano por me aceitar, por em mim depositar confiança e me possibilitar entrar em um trabalho tão elegante e inovador. Agradeço a paciência durante todo o mestrado e toda a orientação, guiando minhas escolhas, permitindo minha autonomia na realização e contribuição neste trabalho.

Aos Professores Dr. Roberto de Campos Giordano e Dra. Teresa Cristina Zangirolami pelas mais que participações em meu trabalho durante todo meu progresso. São coorientadores não oficiais desse trabalho que merecem grande mérito por toda contribuição e dedicação a esse projeto.

Com igual importância agradeço à família Pentose, gerada logo nos primeiros meses de experimentos. Dra. Claudia Ramos da Silva e Me Guilherme Silveira Moraes que trabalharam ao meu lado, dia e noite, literalmente, com todo seu sangue, alma e coração. Sem vocês esse trabalho teria pouco mais que a metade dessas páginas.

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos pela infraestrutura e recursos disponíveis, aos programas BIOEN FAPESP e PRÓ-ENGENHARIAS CAPES, pela bolsa concedida, pelos recursos, aos professores do PPGEQ e a todos os profissionais envolvidos, também aos técnicos Amadeus, Thais, Aline e Thiago.

Aos amigos que facilitaram vencer os desafios cotidianos sempre presentes, Adilson, Agnes, Ana Maria, Anny, Carlos, Cíntia, Cleiton, Diogo, Edy, Felipe, Inti, Jaílson, João, Lili, Lionete, Mayer, Michelle, Samyris, Sandrinha, Renata, Thaís. Ao meu técnico particular, Diego, por todo o suporte 24 horas.

Por fim agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram, questionaram, e que de maneira direta ou indireta ajudaram para a realização deste trabalho e do meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

*“Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas as perguntas ...”*

Luis Fernando Veríssimo

AQUINO, P. M. **Produção de etanol a partir de xilose com Xilose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato.** 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

## RESUMO

Neste trabalho foi estudada a simultânea isomerização e fermentação de xilose a etanol (SIF) usando xilose isomerase (XI) e *S. cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato de cálcio. XI foi imobilizada em gel de quitosana ativado com glutaraldeído (IXI-Ch).. Foram estudadas as influências das concentrações de enzima/levedura no reator, do pH, da temperatura e da linhagem de levedura na produtividade e na seletividade em etanol. As concentrações de enzima e levedura no reator foram variadas mudando-se a massa de IXI-Ch e levedura por grama de solução de alginato, mantendo-se fixas as proporções 1:1 massa de biocatalisador:volume de meio no reator. As SIFs foram realizadas em batelada com xilose ( $\sim 65\text{g.L}^{-1}$ ), antibiótico e outros sais. O primeiro experimento realizado, biocatalisador com 16% levedura Itaiquara<sup>®</sup> e 5% enzima ( $\% \frac{m_{\text{enzima ou levedura}}}{m_{\text{biocatalisador}}}$ ), mostrou que ocorria queda de pH durante o ensaio, impedindo conversão total da xilose, devido à redução da atividade enzimática. Foi incluído carbonato de cálcio 0,5-1,0% no biocatalisador, o que manteve o pH entre 5,2-5,6, permitindo total conversão do açúcar, em todas as concentrações testadas (%Levedura-Enzima no biocatalisador): 5-20, 17-5 e 10 levedura (Itaiquara<sup>®</sup>) com 5, 10 e 20% enzima. A máxima produtividade em etanol,  $2,44 \pm 0,26\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , foi obtida para a mais alta concentração celular e a mais alta seletividade etanol/xilitol,  $2,57 \pm 0,4$  e  $2,42 \pm 0,01$ , para as mais altas concentrações de enzima (10 e 20% com 10% levedura). Esses resultados indicavam que quanto mais alta a concentração de xilulose, mais favorecida a seletividade em etanol. Foi então realizada uma fermentação usando o biocatalisador sem enzima, com um xarope previamente isomerizado e concentrado em xilulose contendo 58g/L de xilulose e 9g/L xilose e outro apenas com xilose. No primeiro, xilulose foi totalmente assimilada em 5 horas, xilose foi pouco consumida nos dois ensaios, e a seletividade em etanol foi menor que a obtida nos ensaios SIF. Xilitol mostrou, assim, ser produzido majoritariamente a partir de xilulose e contrariamente ao esperado a seletividade não aumenta diretamente com o aumento da concentração de xilulose, indicando que o metabolismo etanol/xilitol não depende apenas da concentração externa de xilulose, devendo ser finamente regulado dentro da levedura. Selecionaram-se as concentrações de enzima e levedura de 20 e 10% (equivalente a

100g<sub>derivado</sub>.L<sup>-1</sup><sub>reator</sub> e 50g<sub>ms</sub>.L<sup>-1</sup><sub>reator</sub>) como as melhores, as quais foram utilizadas para estudo da influência do pH e da temperatura e ainda de diferentes linhagens. O aumento do pH inicial do meio de 5,6 para 6,5 não favoreceu a produtividade, rendimento e nem a seletividade em etanol. As temperaturas testadas para Itaiquara<sup>®</sup> foram: 32, 35 e 37°C; e para as linhagens industriais CAT-1 e BG-1: 32, 37 e 40°C. A viabilidade manteve-se acima de 90% para todos os ensaios em 24 horas. As três linhagens mostraram aumento da seletividade em etanol com a redução da temperatura, obtendo-se a máxima seletividade para as linhagens industriais (3,06± 0,24- CAT-1 e 3,19± 0,11 BG-1), com rendimento e produtividade iguais ou maiores que os obtidos nas temperaturas maiores. A 32°C e pH 5,6, Itaiquara<sup>®</sup> apresentou menor tempo de conversão, mas a menor seletividade, já a BG-1, obteve maior seletividade, mas baixa conversão, rendimento e produtividade. A linhagem CAT-1 alia alta produtividade, 2,17 ± 0,17 (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), e seletividade, 3,06 ± 0,24, com 90% de conversão em 9 horas, 32°C, sendo aparentemente a de melhor desempenho dentre as testadas. Os resultados foram muito promissores, indicando viabilidade técnica de produção de etanol a partir de xilose com o biocatalisador desenvolvido.

**Palavras-chave:** Xilose, Simultânea isomerização e fermentação (SIF), Etanol, Xilose isomerase.

AQUINO, P. M. **Ethanol Production from Xylose with xylose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* co-immobilized alginate gel.** 2013. 101 f. Master Thesis (Chemical Engineering) - Chemical Engineering Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP.

## ABSTRACT

In this work, it was studied the simultaneous isomerization and fermentation of xylose to ethanol (SIF) using xylose isomerase (XI) and *S. cerevisiae* co-immobilized in calcium alginate gel. XI was immobilized on chitosan gel activated with glutaraldehyde (IXI-Ch). The influence of the concentration of enzyme/yeast in the reactor, the pH, temperature and yeast strain on yield and selectivity in ethanol was studied. The concentrations of enzyme and yeast in the reactor were varied by changing the mass of IXI-Ch and yeast per gram of alginate solution, maintaining fixed the ratios of biocatalyst weight: volume of medium in the reactor (1:1). The SIFs were carried out in batch with xylose ( $65\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), antibiotics and other salts. The first experiment, with 16% Itaiquara<sup>®</sup> yeast and 5% enzyme biocatalyst ( $\% \text{W}_{\text{enzyme or yeast}}/\text{W}_{\text{biocatalyst}}$ ) showed that pH drop occurred during the test, preventing full conversion of xylose, due to reduced enzyme activity. calcium carbonate (0.5-1.0%) was then included in the biocatalyst, which maintained the pH between 5,2 to 5,6, allowing complete conversion of the sugar at all concentrations tested (%Yeast -Enzyme in biocatalyst): 5-20, 17-5, and 10 yeast (Itaiquara<sup>®</sup>) with 5, 10 and 20-. The maximum ethanol productivity,  $2,44 \pm 0,26\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  was obtained for the highest cell concentration and the highest selectivity ethanol/xylitol,  $2,57 \pm 0.4$  and  $2,42 \pm 0,01$  for the highest enzyme concentrations (10 and 20% with 10% yeast). These results indicated that the highest concentration of xylulose favored more selectivity to ethanol. Fermentation was then performed using no enzyme in biocatalyst with a prior isomerized syrup concentrated in xylulose containing  $58\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  xylulose and  $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  xylose and another with xylose only. At first, xylulose was completely assimilated in 5 hours, xylose was barely consumed in both assays, and ethanol selectivity was lower than that obtained in the SIF tests. Xylitol show thus to be produced mainly from xylulose and selectivity contrary to expectations did not directly increase with increasing xylulose concentration, indicating that the formation of ethanol/xylitol depends not only on external xylulose, and it is probably finely regulated in yeast. The concentrations of enzyme and yeast 20 and 10% (equivalent to  $100\text{g}_{\text{derived}}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reactor}}$  and  $50\text{g}_{\text{wd}}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reactor}}$ ) were selected as the best, which were used to study the influence of pH and temperature, and also different strains. The increase of initial pH from 5.6

to 6.5 did not improve the productivity, yield, neither selectivity in ethanol. Temperatures tested for Itaiquara ® were 32, 35 and 37 ° C, and for industrial strains CAT-1 and BG-1: 32, 37 and 40 ° C. Viability remained above 90% for all assays at 24 hours. All three strains showed increased selectivity in ethanol with temperature reduction, obtaining the maximum selectivity for industrial strains ( $3,06 \pm 0,24$  - CAT-1 and  $3,19 \pm 0,11$  BG-1) with yield and productivity equal or greater than those obtained in higher temperatures. At 32 ° C and pH 5.6, Itaiquara ® showed lower conversion time, but lower selectivity, while the BG-1, demonstrated the highest selectivity, but low conversion and productivity. The strain CAT-1 combines high productivity,  $2,17 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , and selectivity,  $3,06 \pm 0,24$ , with 90% conversion in 9 hours, 32 ° C, which is apparently the best performance among the tested yeasts. The results were very promising, indicating the technical feasibility of producing ethanol from xylose with the biocatalyst developed.

**KEYWORDS:** Xylose, Simultaneous isomerization and fermentation (SIF), Ethanol, Xylose isomerase.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura química parcial da hemicelulose. ....	22
Figura 2 Conversão da xilose a xilitol pela xilose redutase e de xilitol a xilulose pela xilitol desidrogenase. A fosforilação da xilulose é catalisada pela xiluloquinase.....	25
Figura 3 Diferentes opções metabólicas para a fermentação alcoólica de xilose com um balanço redox.....	26
Figura 4 Metabolismo da xilose em leveduras. ....	28
Figura 5 Densidade ótica durante crescimento de <i>S. cerevisiae</i> .....	32
Figura 6 Estrutura cristalina da glicose isomerase de <i>Streptomyces rubiginosus</i> . Dois monômeros da estrutura tetramérica estão representados em azul e os outros dois em verde. Esferas em laranja representam os cátions de $Mg^{2+}$ . ....	35
Figura 7 Métodos de imobilização de agentes biológicos.....	36
Figura 8 Sistema para a Coagulação do biocatalisador. ....	45
Figura 9 Reatores utilizados nos ensaios de isomerização e fermentação de xilose com glicose isomerase e <i>S.cerevisiae</i> coimobilizados em alginato de cálcio. ....	48
Figura 10 SIFs realizadas com catalisadores com e sem $CaCO_3$ coimobilizados. Concentrações semelhantes de levedura e enzima no reator ( $80$ e $85 \text{ g}_{ms} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ e $30 \cdot 10^3 \text{ UI} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ ). (A) Substrato e produtos da SIFs de $65 \text{ g} \cdot L^{-1}$ de xilose inicial a $35^\circ C$ , $150 \text{ rpm}$ . (B) pHs medidos durante as SIFs. ....	55
Figura 11 SIFs de $65 \text{ g} \cdot L^{-1}$ de xilose inicial a $35^\circ C$ , $150 \text{ rpm}$ realizadas com biocatalisadores com proporção enzima/levedura menor e maior que um, alta ( $85 \text{ g}_{ms} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ e $30 \cdot 10^3 \text{ UI} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ ) e baixa ( $25 \text{ g}_{ms} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ e $120 \times 10^3 \text{ UI} \cdot L_{\text{reator}}^{-1}$ ) concentração de levedura no reator, respectivamente. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados nas fermentações. ....	61
Figura 12 SIFs de $65 \text{ g} \cdot L^{-1}$ de xilose inicial a $35^\circ C$ , $150 \text{ rpm}$ realizadas com biocatalisadores dos ensaios 4, 5 e 6 (10% de levedura). (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados. ....	63
Figura 13 Fermentação de xilose e de xarope de xilulose nas mesmas condições empregadas nas SIFs, $35^\circ C$ , pH 5,6, $150 \text{ rpm}$ , levedura $50 \text{ g}_{ms} \cdot L^{-1}$ reator, biocatalisadores sem XI. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados nas fermentações. ....	66

Figura 14 Assimilação de açúcar por hora por conversão de substrato no processo SIF 65g.L <sup>-1</sup> de xilose inicial a 35°C, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com diferentes concentrações de enzima e levedura e na fermentação de xilulose 58g.L <sup>-1</sup> .....	68
Figura 15 Fermentação de xaropes de xilulose com diferentes diluições, nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 32°C, pH 5,6, 150rpm, levedura livre 50 gms.L <sup>-1</sup> reator (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados nas fermentações.....	69
Figura 16 Fermentação de xilose nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 35°C, pH 5,6, 150rpm, levedura livres 50 gms.L <sup>-1</sup> reator. ....	72
Figura 17 Fermentação de xilose e etanol nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 35°C, pH 5,6, 150rpm, levedura livres 50 gms.L <sup>-1</sup> reator. ....	73
Figura 18 pHs das SIFs realizadas com biocatalisadores contendo CaCO <sub>3</sub> a 35°C, 150rpm e 65g.L <sup>-1</sup> de xilose com Itaiquara® . ....	75
Figura 19 pH das SIFs realizadas a 35°C, 150rpm e 65g.L <sup>-1</sup> de xilose com biocatalisadores contendo CaCO <sub>3</sub> ,10% de levedura e 20% de IXI-Ch. Meios com pH iniciais 5,6 e 6,5.....	76
Figura 20 SIFs de 65 g.L <sup>-1</sup> de xilose inicial em pH inicial do meio 6,5 e 5,6, a 35°C, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados. ....	77
Figura 21 SIFs de 65 g.L <sup>-1</sup> de xilose inicial em diferentes temperaturas: 32, 35 e 37°C, pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados. ....	80
Figura 22 pHs das SIFs realizadas com biocatalisadores contendo CaCO <sub>3</sub> para levedura CAT-1 em diferentes temperaturas, 150rpm e 65g.L <sup>-1</sup> de xilose. ....	82
Figura 23 SIFs de 65 g.L <sup>-1</sup> de xilose inicial com CAT-1 em diferentes temperaturas: 32, 37 e 40°C, pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados. ....	83
Figura 24 pHs das SIFs realizadas com biocatalisadores contendo CaCO <sub>3</sub> para levedura BG-1 em diferentes temperaturas, 150rpm e 65g.L <sup>-1</sup> de xilose. ....	85
Figura 25 SIFs de 65 g.L <sup>-1</sup> de xilose inicial com BG-1 em diferentes temperaturas: 32, 37 e 40°C, pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados. ....	87

Figura 26 Comparação das SIFs de 65 g.L<sup>-1</sup> de xilose inicial com Itaiquara<sup>®</sup>, CAT-1 e BG-1 a 32°C, pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados. 89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição de materiais lignocelulósicos. C6 hexoses, C5 pentoses. ....	21
Tabela 2 Composição da hemicelulose de materiais lignocelulósicos. ....	23
Tabela 3 Parâmetros fisiológicos fermentativos da levedura de panificação e da linhagem selecionada PE-2 durante um ciclo fermentativo na usina, usando caldo de cana e melaço a 33°C. ....	34
Tabela 4- Tipos de imobilização e exemplos de suportes empregados .....	37
Tabela 5 Composições em porcentagem mássica dos biocatalisadores utilizados nos ensaios realizados.....	46
Tabela 6 Composições dos meios para ensaios realizados em shaker termostático a 35°C, sob agitação de 150 rpm e pH inicial ajustado para 5,6.....	49
Tabela 7 Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial ( $S_i=65\text{g.L}^{-1}$ ) a 35 °C e 150 rpm, catalisada por xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído (IXI-Ch) e <i>S. cerevisiae</i> linhagem de panificação Itaiquara <sup>®</sup> (em $\text{g}_{\text{ms}}$ -grama em massa seca) coimobilizadas em alginato de cálcio, e nas fermentações de xarope de xilulose ( $58\text{g.L}^{-1}$ –xilulose, $9\text{g.L}^{-1}$ –xilose) e de xilose ( $65\text{g.L}^{-1}$ ), biocatalisador sem IXI-Ch. T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade. ....	57
Tabela 8 Parâmetros fisiológicos do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial ( $S_i=65\text{g.L}^{-1}$ ) a 35 °C e 150 rpm, catalisada por xilose isomerase (Enz) imobilizada em quitosana-glutaraldeído e <i>S. cerevisiae</i> linhagem de panificação Itaiquara <sup>®</sup> (em $\text{g}_{\text{ms}}$ - grama em massa seca) coimobilizadas em alginato de cálcio, e nas fermentações de xarope de xilulose ( $58\text{g.L}^{-1}$ –xilulose, $9\text{g.L}^{-1}$ –xilose) e de xilose ( $65\text{g.L}^{-1}$ ), biocatalisador sem IXI-Ch. T: tempo, $Y_{E_{\text{metabol}}}$ : rendimento metabólico, $Y_{E_{\text{esp}}}$ : rendimento específico, $Ass_{\text{esp}}$ : Velocidade específica de assimilação. ....	58
Tabela 9 Assimilação de açúcar por hora (Ass) e assimilação específica de açúcar ( $Ass_{\text{esp}}$ ) no processo SIF $65\text{g.L}^{-1}$ de xilose inicial a 35°C, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com diferentes concentrações de enzima e levedura e na fermentação de xilulose $58\text{g.L}^{-1}$ . ....	67
Tabela 10 Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na fermentação de xaropes de xilulose com diferentes diluições. Levedura livre 50 $\text{gms.L}^{-1}$ reator. ....	70

Tabela 11 Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com pHs diferentes: 5,6 e 6,5, a 35 °C e 150 rpm, catalisada por xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído e *S. cerevisiae* coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente..... 78

Tabela 12 Parâmetros cinéticos da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com diferentes temperaturas ( $\Theta$  °C): 32, 35 e 37°C a pH 5,6 e 150 rpm, catalisada por xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído (IXI-Ch) e *S. cerevisiae* Itaiquara<sup>®</sup> coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente. .... 79

Tabela 13 Parâmetros cinéticos da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com a levedura CAT-1, pH 5,6, 150 rpm e diferentes temperaturas ( $\Theta$  °C): 32, 37 e 40°C, catalisada por IXI-Ch e levedura coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente..... 84

Tabela 14 Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com a levedura BG-1, pH 5,6, 150 rpm e diferentes temperaturas ( $\Theta$  °C): 32, 37 e 40°C, catalisada por IXI-Ch e levedura coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente. T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade, V: viabilidade. .. 85

Tabela 15 Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com diferentes linhagens, a temperatura ( $\Theta$ ) 32°C, pH 5,6, 150 rpm, catalisada por IXI-Ch e levedura coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente. T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade, V: viabilidade..... 88

Tabela 16. Comparação de alguns processos que utilizam xilose para produção de etanol. .... 92

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
2.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	21
2.2 A HEMICELULOSE .....	22
2.3 METABOLISMO DA XILOSE EM LEVEDURAS .....	23
2.4 METABOLISMO DA XILULOSE EM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	27
2.5 FERMENTAÇÃO DA XILULOSE.....	29
2.6 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	31
2.6.1 LINHAGENS INDUSTRIAIS DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....	33
2.7 XILOSE ISOMERASE.....	34
2.8 IMOBILIZAÇÃO .....	35
2.9 SIMULTÂNEA ISOMERIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO DE XILOSE .....	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 PRODUÇÃO DO DERIVADO ENZIMÁTICO .....	41
3.2 PRODUÇÃO DOS BIOCATALISADORES .....	44
3.2.1 BIOCATALISADOR SEM $\text{CaCO}_3$ .....	44
3.2.2 BIOCATALISADOR COM $\text{CaCO}_3$ .....	46
3.2.3 BIOCATALISADORES SEM ENZIMA.....	47
3.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO E DE SIMULTÂNEA ISOMERIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO (SIF).....	47
3.4 FERMENTAÇÕES DE XILOSE E DE XAROPE DE XILULOSE .....	50
3.5 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS ESTUDADOS .....	52
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
4.1 SIF E CONTROLE DO PH .....	54
4.1.1 CONCLUSÕES .....	59

<b>4.2 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA E LEVEDURA NO REATOR NO DESEMPENHO DO PROCESSO SIF.....</b>	<b>59</b>
4.2.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE XILULOSE NA SELETIVIDADE ETANOL/XILITOL DURANTE FERMENTAÇÃO POR <i>S. CEREVISIAE</i> . ....	65
4.2.2 COMPARAÇÃO ENTRE FERMENTAÇÃO DE XILOSE POR LEVEDURA IMOBILIZADA EM GEL COM FERMENTAÇÃO POR LEVEDURA LIVRE E NA PRESENÇA DE ETANOL: INFLUÊNCIA DA DIFUSÃO DE XILOSE NO GEL DE ALGINATO NA CONCENTRAÇÃO MEDIDA DE XILOSE E AVALIAÇÃO DE CONSUMO AERÓBICO DE ETANOL DURANTE FERMENTAÇÃO POR <i>S. CEREVISIAE</i> . ....	71
4.2.3 CONCLUSÕES.....	73
<b>4.3 INFLUÊNCIA DO PH .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA .....</b>	<b>78</b>
<b>4.5 ESTUDO DO PROCESSO SIF COM DIFERENTES LINHAGENS DE LEVEDURA: BG-1 E CAT-1.....</b>	<b>81</b>
4.5.1 CAT-1.....	82
4.5.2 BG-1 .....	85
<b>4.6 SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO PROCESSO BATELADA SIF.....</b>	<b>88</b>
<b><u>5 CONCLUSÕES .....</u></b>	<b><u>93</u></b>
<b><u>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>95</u></b>

## 1 Introdução e justificativa

O crescimento econômico está estreitamente associado ao aumento da demanda energética. Preocupações com relação ao petróleo, o combustível mais utilizado no mundo, como o retorno aos aumentos de preço, as perspectivas de esgotamento de suas reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência da produção por países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com questões ambientais fizeram renascer a atenção nas fontes alternativas de energia.

A busca por alternativas energéticas é premente e, no Brasil, a grande área agriculturável torna o uso da biomassa uma das mais atraentes alternativas. A tradicional produção de açúcar e álcool no país gera atualmente cerca de 130 milhões de toneladas de bagaço de cana, dos quais 60 a 90% são queimados nas caldeiras para produção de energia (BETANCUR; PEREIRA, 2010). Vários processos biotecnológicos vêm sendo propostos para agregar valor ao bagaço excedente, mas certamente a produção de etanol de segunda geração será uma alternativa importante no Brasil.

O bagaço é um material lignocelulósico composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose é o segundo mais abundante material orgânico renovável de origem vegetal, é formada por diferentes polissacarídeos, compostos de açúcares com cinco e seis átomos de carbono como xilose, glicose, manose, arabinose, galactose, bem como ácidos orgânicos (urônico e acético). A hidrólise de xilana gera xilose, um açúcar fermentescível por algumas leveduras, tais como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, e *Pachysolen tannophilus*, mas não por *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura tradicionalmente usada no Brasil para produção de etanol da sacarose. Contudo, a velocidade de produção e as concentrações de etanol atingidas por esses microrganismos comparam-se pobremente com os valores obtidos para a fermentação de hexoses (glicose e frutose) por *S. cerevisiae*.

Uma alternativa para utilização de *S. cerevisiae* que vem sendo bastante estudada é a manipulação genética desse microrganismo para inserção nele dos genes necessários para a fermentação da xilose. Embora sempre elegante, a utilização de microrganismos geneticamente modificados em usinas de álcool irá enfrentar sérios problemas de contenção, devido à necessidade de atender aos requisitos de biosegurança na grande escala de operação do processo, o que nos motivou a testar uma outra alternativa.

Uma outra forma de produzir etanol a partir da xilose por *Saccharomyces cerevisiae* é primeiramente, converter xilose em xilulose, que é metabolizada por *S. cerevisiae*, em reação catalisada por xilose isomerase, simultânea de fermentação para etanol. Esse processo foi

patenteado em U.S. Patent No 4,490,468 por Cheng Shung Gong e Li Fu Chen em dezembro de 1984 (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Xilose isomerase é uma enzima capaz de converter xilose em xilulose e é mais conhecida como glicose isomerase, pois é empregada industrialmente para a produção de xaropes de frutose (OLIVIER; DU TOIT, 1986). Contudo, houve no final do século XX um grande desenvolvimento das ferramentas da engenharia genética, o que motivou a grande maioria dos pesquisadores a investir nesta área. Assim, embora tenha se mostrado tecnicamente factível, a isomerização “in vitro” com fermentação “in vivo” teve seu estudo descontinuado.

Por outro lado, de fato, há necessidade de busca de condições operacionais adequadas para operação dessa rota. Embora xilose isomerase seja capaz de converter xilose a xilulose, em condições de atividade significativa, a relação de equilíbrio xilose/xilulose é elevada (5:1). Uma forma de aumentar a conversão de xilose é conduzir a isomerização com remoção simultânea do produto (xilulose). Executando a isomerização e fermentação em simultâneo (SIF), tem-se a vantagem de deslocar o equilíbrio da reação de isomerização no sentido de formação de xilulose. No entanto, a escolha do pH e da temperatura do processo precisa ser um compromisso entre os valores ótimos para a enzima, pH 7-8 e temperatura 70°C, e para o microorganismo, pH 4-5 e temperaturas entre 30 e 35 °C (DU PREEZ, 1994).

A isomerização e fermentação, assim, precisam ocorrer a pHs intermediários de modo que, apesar das diferenças entre as velocidades de isomerização e fermentação os rendimentos finais em etanol possam ser altos (LASTICK et al., 1989). O uso de xilose isomerase imobilizada permite a utilização de alta concentração do biocatalisador no reator, compensando as baixas velocidades de isomerização devido à operação em pH e temperatura abaixo do valor ótimo para a enzima (70°C). O uso da enzima e levedura coimobilizadas possibilita consumo imediato, pela levedura, da xilulose gerada pela isomerização da xilose.

Giordano (1992) estudou problema similar na sacarificação e fermentação simultâneas do amido (SSF), utilizando amiloglicosidase imobilizada em sílica e depois coimobilizada com levedura em gel de pectina, para produzir etanol em um sistema contínuo de três reatores de leito fixo em série (GIORDANO; TROVATI, SCHMIDELL, 2008; TROVATI; GIORDANO; GIORDANO, 2009). Havia no grupo também experiência estabelecida com a enzima glicose (xilose) isomerase (GIORDANO; GIORDANO, COONEY, 2000a; 2000b). Profa. Teresa Zangirolami já havia também estudado a produção de etanol a partir de xilose utilizando glicose isomerase e levedura imobilizada, durante especialização no Japão, entre 1987-1989, sob orientação do Prof. Toshiomi Yoshida. Toda essa experiência prévia, aliada à convicção de que seria de difícil implementação o uso de

microrganismos geneticamente modificados em usinas de etanol, motivou o grupo a revisitar a rota da simultânea isomerização e fermentação, visando reproduzir os bons resultados obtidos por Giordano e col. (2008) e Trovati e col. (2009) para a simultânea hidrólise e fermentação (SHF) de amido de mandioca.

Um biocatalisador similar ao utilizado para o processo SHF (GIORDANO et al, 2000) contendo xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído e levedura de panificação coimobilizadas em gel de alginato de cálcio, foi adaptado para a realização de SIF de xilose (SILVA et al., 2012). Nesse trabalho uma SIF foi realizada com esse biocatalisador proposto, com xilose  $65 \text{ g.L}^{-1}$  inicial, pH do meio reacional 6, temperatura de  $35^\circ\text{C}$  alcançando conversão de 75,4% em 48 horas. Foi produzido etanol, xilitol e em menores quantidades glicerol e ácido acético. A queda no pH foi apontada como a causa da lenta conversão, já que nas primeiras 12 horas de ensaio, quando o pH ainda não era tão baixo, cerca de 40% do açúcar foi assimilado.

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento da rota de produção contínua de etanol a partir de hemicelulose de bagaço de cana, objetivo final do grupo.

Assim condições operacionais foram estudadas para se obter a máxima produtividade, rendimento e seletividade em etanol no processo SIF, com conversões acima de 90%. Para solucionar o problema da queda do pH foi proposto a incorporação de  $\text{CaCO}_3$  no biocatalisador e utilizando-se levedura de panificação comercial Itaiquara, foram inicialmente estudadas a influência das concentrações de levedura e de enzima no reator e o pH, tanto controle como influência do pH inicial utilizado. A seguir, foi avaliado o efeito da temperatura com a linhagem comercial e também com duas linhagens industriais, BG-1 e CAT-1, que toleram temperaturas superiores de fermentação. O estudo foi feito em batelada, utilizando-se biocatalisador desenvolvido por Silva e col. (2012), usando sempre xilose comercial como substrato.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Material lignocelulósico

Os materiais lignocelulósicos são materiais renováveis, abundantes e baratos, sua obtenção não compete com a produção de comida ou ração animal, sendo provenientes principalmente de resíduos industriais, urbanos e agrícolas (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Esses materiais são compostos majoritariamente por celulose (30-50%), hemicelulose (15-33%) e lignina (10-20%) (GÍRIO et al, 2010, LIMAYEM; RICKE, 2012). Celulose e hemicelulose são constituídas por açúcares fermentescíveis, como glicose e xilose, podendo ser empregadas para a produção de combustíveis e produtos químicos (PEREIRA Jr, 2007) e variam quanto sua proporção na composição dos diversos tipos de materiais lignocelulósicos (Tabela 1).

**Tabela 1 Composição de materiais lignocelulósicos. C6 hexoses, C5 pentoses.**

Composição (%)	Palha e sabugo de milho	Palha de Arroz	Fibra do Bagaço de cana	Casca da soja
<b>Glicose (C6)</b>	39	41	38.1	39.7
<b>Manose (C6)</b>	0.3	1.8	-	
<b>Galactose (C6)</b>	0.8	0.4	1.1	
<b>Xilose (C5)</b>	14.8	14.8	23.3	19.6
<b>Arabinose (C5)</b>	3.2	4.5	2.5	5.9
<b>Lignina</b>	15.1	9.9	19.4	
<b>Cinzas</b>	4.3	12.4	20.1	
<b>Proteínas</b>	4	-	-	

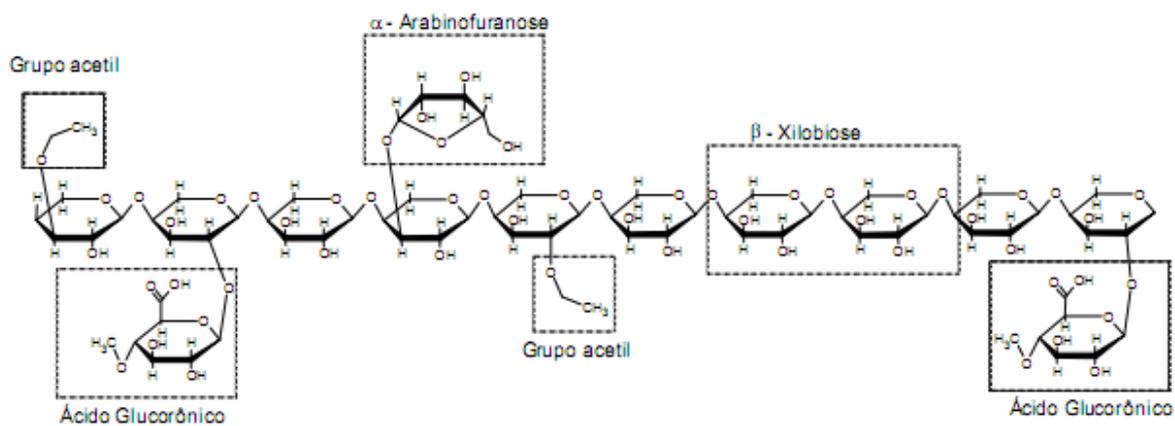
Fonte: Lee, 1997.

No Brasil, o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FAO, 2011), o bagaço gerado na indústria sucroalcooleira é o principal resíduo agroindustrial, são gerados 250 Kg de bagaço por tonelada de cana moída (BETANCUR; PEREIRA, 2010). Gouveia et al, em 2009, determinou a constituição do bagaço em 42,8% de celulose, 25,8% de hemicelulose sendo a hemicelulose composta principalmente por xilose (GÍRIO et al, 2010). Este resíduo vem sendo utilizado em diversos processos como geração de energia, produção de papel e celulose, alimentação animal e produtos baseados na fermentação (PANDEY et al, 2000) e tem grande potencial como substrato para a produção de etanol de segunda geração.

## 2.2 A hemicelulose

A hemicelulose é o segundo mais abundante material orgânico renovável de origem vegetal, é formada por diferentes polissacarídeos, compostos de açúcares com cinco átomos de carbono como xilose e arabinose e com seis átomos como glicose, manose e galactose bem como ácidos orgânicos, urônico e acético (Figura 1) (FENGEL; WEGENER, 1989; GÍRIO et al, 2010; SAHA, 2003).

**Figura 1** Estrutura química parcial da hemicelulose.



Fonte: adaptado de FENGEL e WEGENER, 1989.

Conforme a composição e predominância de monossacarídeos (Tabela 2) as hemiceluloses recebem diferentes denominações como glucuronoxilanas, principal constituinte de madeiras duras, galactoglucomananas, maior constituinte de madeiras moles, arabinoglucurono-xilanas, presente principalmente em materiais não lenhoso (culturas agrícolas), arabinoxilanas, galacto-arabino-glucurono-xilana, homopolímeros de xilose, homoxilanas, ocorrem somente em algas (GÍRIO et al., 2010). A xilana, mais comumente encontrada na parede celular de plantas terrestres, é composta principalmente por xilose com ligações  $\beta(1-4)$ D-xilopiranosídicas (ADSUL et al, 2004). A fração de pentoses em resíduos agro-industriais é bastante significativa variando de 5-20% em xilose e 1-5% em arabinose (Tabela 1).

Como principais produtos da fração hemicelulósica temos o etanol e o xilitol, provenientes da xilose. A hemicelulose é mais facilmente hidrolisada que a celulose, que é um homopolímero mais cristalino (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000). É necessário inicialmente

um pré-tratamento para obtenção dos monossacarídeos da hemicelulose, podendo assim, serem fermentados por microrganismos específicos, para obtenção dos produtos desejados.

**Tabela 2 Composição da hemicelulose de materiais lignocelulósicos.**

<b>Composição (g.100g<sub>material seco</sub><sup>-1</sup>)</b>	<b>Xilose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Manose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Ácido Urônico</b>	<b>Grupo acetil</b>
<b>Bagaço de cana</b>	20,5-25,6	2,3-6,3	0,5-0,6	1,6	-	-
<b>Casca de Arroz</b>	17,7	1,9	-	-	-	1,62
<b>Casca da soja *</b>	19,6	5,9	-	-	2	0,6
<b>Palha de Arroz</b>	14,8-23	2,7-4,5	1,8	0,4	-	-
<b>Sabugo de milho</b>	28-35,3	3,2-5	-	1-1,2	3	1,9-3,8
<b>Pinho (Madeira mole)</b>	5,3-10,6	2-4,2	5,6-13,3	1,9-3,8	2,5-6	1,2-1,9
<b>Eucalipto</b>	14-19,1	0,6-1	1-2	1-1,9	2	3-3,6

Fonte: GÍRIO et al., 2010.

\*CASSALES et al., 2011.

Diversos pré-tratamentos vem sendo estudados para diferentes materiais lignocelulósicos e entre eles os pré-tratamentos ácidos se destacam, pois resultam em um hidrolisado líquido de hemicelulose rico em xilose e com menores quantidades de derivados de lignina, que podem ser inibidores do metabolismo celular, quando comparado com outros pré-tratamentos (BETANCUR; PEREIRA JR., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; GÍRIO et al, 2010). Contudo, maior a intensidade do tratamento ácido, maior a degradação dos monômeros de açúcares tais como furfural e hidroximetilfurfural, os quais também são inibidores do metabolismo celular. Assim, se o objetivo é liberar monômeros de xilose, o tratamento ácido deve ser brando para evitar perda de celulose e degradação de monômeros.

### 2.3 Metabolismo da xilose em leveduras

A assimilação do substrato através da membrana da levedura é o primeiro passo para a fermentação, e apesar da *Saccharomyces cerevisiae* ser o microrganismo sequenciado com o maior número de transportadores de glicose, (MAIER et al., 2002) um sistema específico para pentoses ainda não foi identificado (BERTILSSON; ANDERSSON; LIDÉN, 2008).

Acredita-se que a captação de xilose pelas leveduras seja mediada, de forma inespecífica, pelos transportadores de hexoses (HAMACHER; BECKER, 2002), sem gasto de energia, por difusão facilitada (JOJIMA et al, 2010). Da família dos transportadores de monossacarídeos, 17 genes são responsáveis pela codificação das proteínas transportadoras de

hexoses, (HXT1-11 HXT13-17 e Gal2) (BOLES; HOLLENBERG,1997) e cada proteína apresenta diferentes afinidades e especificidades pelos diversos substratos (JOJIMA et al, 2010). A preferência desses transportadores para xilose é bem menor que para glicose (BERTILSSON, OLOFSSON; LIDÉN, 2009), sendo cerca de 5-200 vezes mais baixo, tendo valores de Km variando entre 130 mM e 1,5M (PITKANEN et al, 2005).

A fim de compreender e aumentar a captação de xilose pela *Saccharomyces cerevisiae* muitos estudos vem sendo realizados. Em 2002, Hamacher et al. utilizaram uma linhagem com capacidade de metabolizar xilose e ao deletar todos os genes envolvidos no transporte de açúcares notaram a perda da habilidade desta crescer em xilose. Ao reintroduzi-los, um a um, puderam determinar que os genes Hxt4, Hxt5, Hxt7 e Gal2 das proteínas transportadoras eram os mais importantes na captação da pentose, entretanto a superexpressão deles não resultou em maior crescimento em condições aeróbicas, nem aumentou a fermentação de xilose em anaerobiose. Assim, apenas a presença dos genes não é suficiente para explicar o transporte.

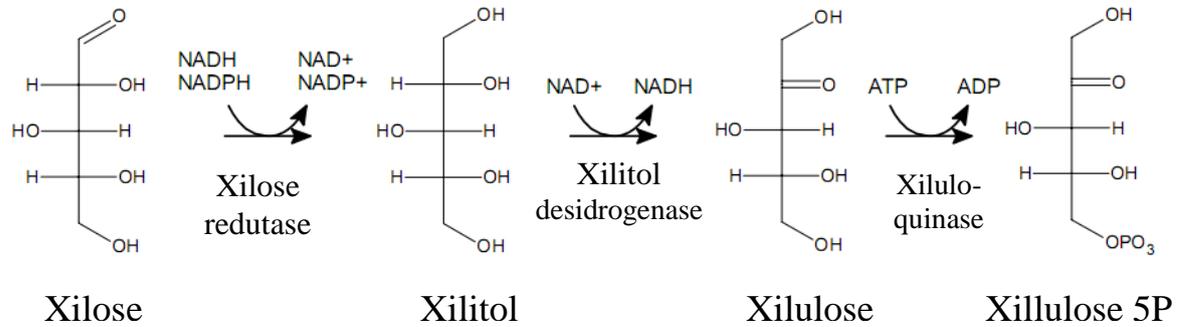
Transportadores heterólogos de leveduras que naturalmente metabolizam xilose como *Candida intermedia*, *Scheffersomyces stipitis* (antigamente *Pichia stipitis*) e *Arabidopsis thaliana* (HECTOR et al., 2008; LEANDRO; GONÇALVES; SPENCER-MARTINS, 2006) foram expresso com sucesso em *S. cerevisiae*, permitindo o crescimento nesta fonte de carbono, porém a fermentação continuou ineficiente (RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM, 2010; SALOHEIMO et al., 2007).

Após a captação pela levedura, a xilose precisa ser convertida a xilulose, forma na qual pode ser metabolizada, sendo fosforilada pela xiluloquinase a xilulose 5-fosfato e assimilada pela via das pentoses fosfato (HAHN-HAGERDAL; PAMMENT, 2004, KUYPER et al 2004). Leveduras convertem xilose a xilulose com a produção de um intermediário, xilitol, gerado pela redução da xilose, pela xilose redutase (XR) com cofator preferencial NADPH, seguida da oxidação do xilitol a xilulose, pela xilitol desidrogenase (XDR) que necessita de NAD<sup>+</sup>(Figura 2).

Leveduras não possuem atividade transidrogenase, capaz de interconverte NADPH em NADH (BRUINENBERG, VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1983; KUYPER et al 2004) e a inespecificidade da correlação das coenzimas causa um desequilíbrio redox, sendo então, necessário a regeneração destes cofatores (JEFFRIES, 1983). O NADP<sup>+</sup> é reduzido no ciclo das pentoses fosfato, enquanto o NADH é oxidado na cadeia respiratória (Figura 3(a)) (KUYPER et al 2004). A quantidade de oxigênio presente a fim de recuperar o NAD<sup>+</sup> deve

ser limitada para evitar a utilização da xilose para formação de biomassa (MARIS et al., 2007) e assim obter rendimento estequiométrico teórico de etanol de  $0,46\text{g g}_{\text{xilose}}^{-1}$ .

**Figura 2 Conversão da xilose a xilitol pela xilose redutase e de xilitol a xilulose pela xilitol desidrogenase. A fosforilação da xilulose é catalisada pela xiluloquinase..**

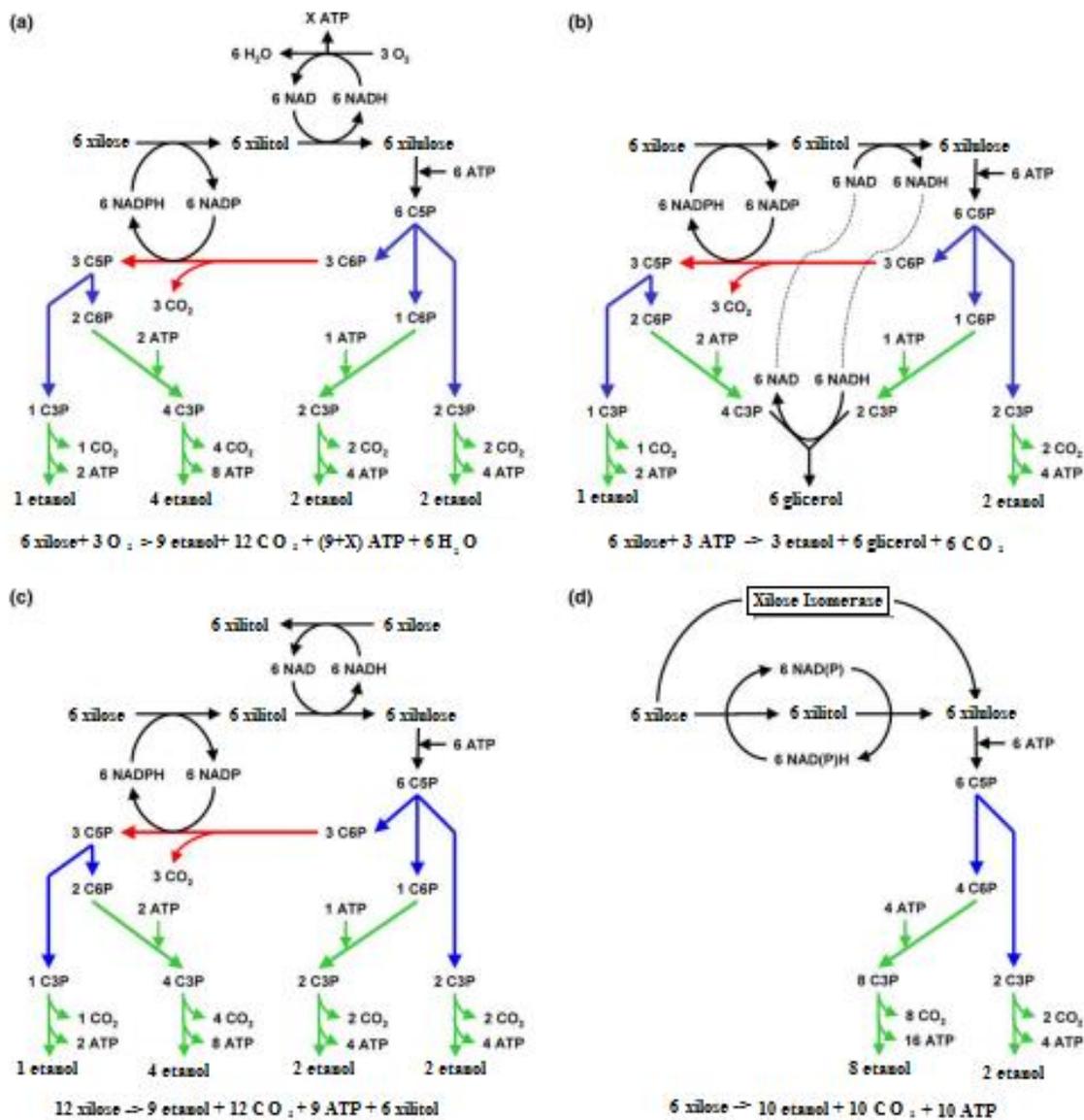


Fonte: Acervo próprio

Estudando o metabolismo de *Candida utilis*, levedura que é capaz de crescer com xilose em condições de oxigenação, Bruinenberg et al. (1983) transferem de aerobiose para anaerobiose o cultivo com xilose e a levedura para de consumir xilose e não produz etanol, diferente do que ocorre quando se usa glicose como fonte de carbono. Contudo ao adicionar xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5), enzima que catalisa isomerização de xilose a xilulose, mesmo em anaerobiose o microrganismo converteu xilose imediatamente a etanol indicando que a deficiência no metabolismo está na conversão de xilose a xilulose. Quando testaram a adição de acetoína (3-hidroxibutanona) ao meio de xilose e levedura houve a produção de etanol, estequiometricamente concomitante com a redução deste a 2,3 butanediol, sugerindo a necessidade de um aceptor de hidrogênio para regeneração do NADH, que não necessariamente precisa ser o oxigênio.

Em condições anaeróbicas de crescimento com glicose, *S. cerevisiae* produz glicerol ao reoxidar o excesso de NADH proveniente de reações de biossínteses, porém no metabolismo da xilose a quantidade do cofator a ser oxidada é muito grande e a pentose é desviada nessa regeneração, diminuindo a produção de etanol e ainda requerendo ATP (Figura 3(b)), não resolvendo o desbalanço (MARIS et al, 2006). Algumas poucas espécies de leveduras como *Scheffersomyces stipitis* (TOIVOLA et al, 1984) e *Pachysolen tannophilus* (BRUINENBERG et al, 1984) apresentam atividade da xilose redutase ligada a NADH, sendo possível a fermentação anaeróbica, reoxidando o NADH, porém com a produção de xilitol(Figura 3(c)) (BRUINENBERG et al, 1984; KUYPER et al, 2004).

Figura 3 Diferentes opções metabólicas para a fermentação alcoólica de xilose com um balanço redox.



Nota: As cores indicam as vias centrais no metabolismo de carboidratos: vermelho: glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase (via hexose-monofosfato); azul: reações de rearranjo no ciclo das pentoses-fosfato; verde: glicólise. Abreviaturas; C6P: hexose-6-fosfato, C5P: pentose-5-fosfato, e C3P: triose-3-fosfato. (a) NADPH-específica xilose redutase e NAD-específica xilitol desidrogenase (aeróbico). (b) NADPH-específica xilose redutase e NAD-específica xilitol desidrogenase (anaeróbico). (c) Xilose redutase com a especificidade do cofator duplo (NADPH / NADH) e NAD-específica xilitol desidrogenase. (d) Xilose redutase e xilitol desidrogenase combinados com especificidades no cofactor (equivalente a xilose isomerase) (KUYPER *et al*, 2004).

A fermentação alcoólica anaeróbica eficiente de xilose só é possível evitando o desbalanço redox, quando as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase têm correspondência nas coenzimas (BRUINENBERG *et al*, 1983) ou interconvertendo em um

passo xilose a xilulose com xilose isomerase, como ocorre na metabolização da xilose em bactérias e *Archaea* (Figura 3 (d))( BRUINENBERG et al, 1983; KUYPER *et al*, 2004).

*Saccharomyces cerevisiae* modificadas geneticamente, com inserção de XR e XDR, foram desenvolvidas para possibilitar o consumo de xilose e convertê-la em etanol. Os genes de microrganismos fermentadores naturais de xilose, como *Scheffersomyces stipitis*, *Candida Shehatae* foram inseridos para que essa levedura fosse capaz de metabolizar xilose a xilitol e deste a xilulose. Entretanto a questão da dificuldade do transporte associado ao desbalanço redox ainda inviabilizam a reação, sendo baixas as taxas de consumo dessa pentose e de produção de etanol, além da formação de xilitol como subproduto (JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002; KÖTTER; CIRIACY, 1993).

#### 2.4 Metabolismo da xilulose em *Saccharomyces cerevisiae*

A xilulose é assimilada por *Saccharomyces cerevisiae* muito mais rapidamente que a xilose, porém mais lenta que a glicose. Transportadores de xilulose não são descritos na literatura e pouco se tem relatado sobre o metabolismo isolado da xilulose em leveduras provavelmente decorrente da dificuldade de obtenção desse açúcar.

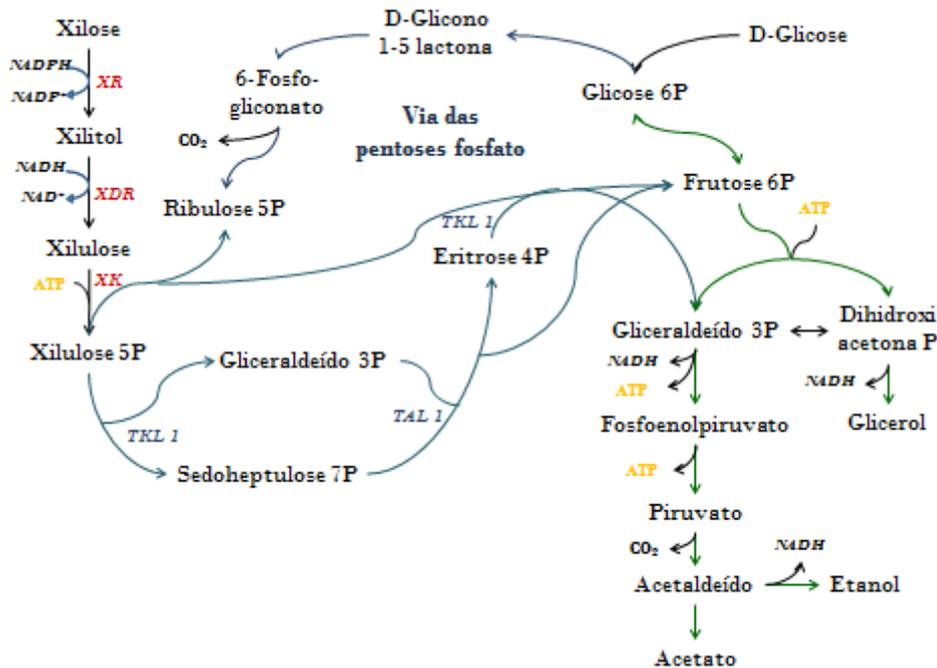
A incorporação de xilose isomerase heteróloga (de outros microrganismos) no genoma da *S. cerevisiae* corresponde a imagem (d) na Figura 3. A expressão funcional da XI foi bem sucedida com um gene da bactéria termofílica *Thermus thermophilus*, contudo apresentava baixa atividade na levedura e requeria altas temperaturas (KUYPER et al., 2004; WALFRIDSSON et al., 1996). Mais recentemente, a expressão de um gene codificador da XI de um fungo, *Piromyces spp*, foi conseguida, e por biologia evolutiva uma linhagem foi capaz de alcançar rendimento de  $0,42 \text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$  a partir de  $20 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de xilose, porém levando 100 horas para a conversão total. Baixa produção de xilitol foi observada (KUYPER et al., 2004).

Embora o isômero da xilose seja consumido pela levedura, ainda há limitações na fermentação da xilulose. A xilulose para ser transformada em etanol segue por um caminho muito mais longo, envolvendo gasto de ATP, diversas enzimas a mais, se comparado com o metabolismo fermentativo da glicose (Figura 4) (CHIANG et al., 1981 b).

A xilulose para entrar no metabolismo pela via das pentoses fosfato, via já existente em *S. cerevisiae*, passa por uma fosforilação com a enzima, também já presente nessa levedura, xiluloquinase (XK). A seguir, esse substrato é metabolizado nessa via onde chega a piruvato e a partir daí é processado da mesma maneira que na fermentação da glicose,

resultando em etanol em condições anaeróbicas ou podendo ser canalizada para cadeia respiratória em presença de oxigênio, gerando energia para crescimento celular (JEFFRIES, 2006; JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002).

**Figura 4** Metabolismo da xilose em leveduras.



Fonte: Adaptado de JEFFRIES, 2006.

Nota: XR- xilose redutase, XDR- xilitol desidrogenase, XK- Xiluloquinase, TKL1- transcetolase, TAL1- transaldolase.

Estudando a via das pentoses fosfato Senac e Hahn-Hägerdal (1990) notaram desequilíbrio de duas moléculas intermediárias dessa via, o S7P (sedoheptulose 7 fosfato) em alta concentração e ausência de E4P (eritrose 4 fosfato). Como a S7P juntamente com G3P (gliceraldeído 3 fosfato) são convertidas em F6P (frutose 6 fosfato) e E4P pela transaldolase (TAL1), esse acúmulo de S7P e ausência de E4P pode ser devido a ineficiência da ação desta enzima, ou falta de G3P, que é consumido pela via glicolítica. Organismos consumidores de xilose apresentam maior atividade para esta enzima. Como apenas 0.9% da glicose passa pela via pentose fosfato em *S. cerevisiae*, a baixa atividade da transaldolase indica baixo desenvolvimento para esta via, prejudicando a assimilação da xilulose por esse microrganismo.

Ao analisar linhagens geneticamente modificadas foi possível verificar a influência das enzimas dessa via. Uma linhagem possuía os genes XR e XDR de *S. stipitis*, além de superexpressar a XK endógena e outra superexpressava 4 enzimas da via das pentoses fosfato,

além desses genes para utilização da xilose. A primeira levou 68 horas para consumir  $33\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , em batelada a  $30^\circ\text{C}$ ,  $5\text{g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  enquanto a segunda, sob as mesmas condições, consumiu  $54\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  no mesmo intervalo de tempo (JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002). Esses resultados mostram que uma ou mais enzimas da via não-oxidativa das pentoses fosfatos controlam a taxa de fermentação da xilulose. Entretanto, ao analisar o rendimento em etanol e xilitol ( $\text{g}_{\text{etanol xilitol}}\cdot\text{g}_{\text{xilulose consumida}}^{-1}$ ) observa-se um aumento no rendimento em etanol, com a linhagem superexpressando as 4 enzimas ( de  $0,33$  para  $0,39\text{ g}_{\text{etanol}}\cdot\text{g}_{\text{xilulose consumida}}^{-1}$ ), mas também do rendimento em xilitol ( de  $0,02$  para  $0,17\text{ g}_{\text{xilitol}}\cdot\text{g}_{\text{xilulose consumida}}^{-1}$ ), assim a xilulose adicional assimilada não aumenta proporcionalmente a produção de etanol, pois é desviada para xilitol. Por algum fluxo metabólico a célula leva xilulose a xilitol pela enzima xilitol desidrogenase (XDR), que tem afinidade tanto por xilitol como por xilulose (RIZZI et al., 1990).

O metabolismo da xilulose não foi totalmente compreendido e os mecanismos celulares que levam ao direcionamento da pentose a etanol ou xilitol ainda não são claros. Além disso, cada linhagem pode se comportar de uma maneira, já que podem diferir quanto a expressão dos genes devido a adaptações sofridas com o tempo.

## 2.5 Fermentação da xilulose

Xilulose é uma cetopentose que não é naturalmente encontrada na natureza, é comercializada a altos preços ( $25\text{ mg}$  por R\$  $807,00$ , cotação Sigma-Aldrich em agosto de 2012) com 95% de pureza. Essa dificuldade na obtenção prejudica estudos referentes à utilização deste açúcar por microrganismos.

A xilose é isômero da xilulose e pode ser convertida a esta forma em reação catalisada pela xilose isomerase. Xilose isomerase (XI) é uma enzima capaz de converter xilose em xilulose contudo tem relação de equilíbrio xilose/xilulose elevada (5:1) (HOCHSTER; WATSON, 1954). A xilulose pura pode ser obtida por separação cromatográfica em resina aniônica com bissulfito (LINDBERG; SLESSOR, 1967; OLSSON et al, 1994) ou borato (CHIANG et al, 1981a).

Partindo da solução xilose/xilulose obtida no equilíbrio da isomerização com glicose isomerase, Chiang e col. em 1981a desenvolveram um método utilizando microorganismos que consumiam primeiramente xilose e depois xilulose, alcançando 90% de pureza. Pronk e col. (1988) empregaram *Acinetobacter calcoaceticus* para oxidar a xilose a ácido xilônico, que era separado por precipitação em metanol seguida de troca iônica, obtendo pureza semelhante à comercializada. Soluções com alta concentração de xilulose podem ser

conseguidas adicionando a solução de isomerização borato ou aluminato ou submetendo a solução à precipitação de xilose em etanol a baixas temperaturas (CHIANG et al., 1981 a).

A produção dessas soluções purificadas de xilulose e de xaropes de xilulose com alta proporção xilulose/xilose permitiu análises experimentais com esse substrato, investigando um pouco mais seu efeito em meios de cultivo e fermentativos. Gong e col. em 1981 estudaram a capacidade de vários microrganismos utilizarem diferentes fontes de carbono, como glucose, xilose, xilulose e xilitol em condições aeróbicas e anaeróbicas. Todas as linhagens foram capazes de utilizar qualquer um dos substratos testados aerobicamente, exceto pela linhagem geneticamente modificada deficiente na respiração. Essa linhagem, a *Saccharomyces cerevisiae* 24860, foi capaz de utilizar glicose e xilulose, mas não xilose nem xilitol. Essa comprovação mostra que leveduras possuem transportadores para a xilulose, assim como para xilose, além de apresentarem capacidade de assimilação da xilulose em condições anaeróbicas, o que não acontece com a xilose.

Para determinar condições ótimas de fermentação de xilulose para leveduras de panificação *S. cerevisiae* foi utilizado por Chiang e col. (1981b) xaropes de pentoses com diferentes proporções xilulose/xilose e diferentes condições de fermentação, como pH, temperatura, quantidade de células. A taxa de consumo da xilulose foi bem menor que a de glicose ou frutose (CHIANG et al, 1981b; SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990) e o aumento da concentração celular foi uma alternativa a esse obstáculo. A taxa de produção de etanol cresceu linearmente com o aumento da densidade celular de 50 até 150g<sub>massa seca</sub>.L<sup>-1</sup> de reator não sendo mais significativo o aumento da concentração celular para concentração inicial de xilulose 75g.L<sup>-1</sup>. A temperatura influenciou na taxa inicial de fermentação e na produção de etanol de xilulose. Entre 35 e 40 C não houve variações na taxa inicial de produção nem na produção final de etanol, contudo para altas temperaturas como 45 C a produção de etanol foi menor que para baixas temperaturas, 30 C. Tanto a viabilidade celular como a habilidade de fermentar diminuíram com o tempo a altas temperaturas, sendo consideradas pelos autores temperaturas próximas a 35 C como ideal para fermentação de xilulose. Variando o pH de 4 para 6 foi observado pouca diferença na produção de etanol, já para valores superiores, como pH 7, a fermentação foi mais lenta, com taxa inicial de produtividade mais baixa e produção final de etanol igual a 67% da fermentação em pH 4. Altos pHs também foram desfavoráveis ao processo fermentativo de xilose pois, além de possibilitar o crescimento de microrganismos contaminantes, ainda favorece a formação de xilitol, sendo essa produção praticamente triplicada quando se compara fermentações de xilulose a pH 4 e pH 7.

Esses pesquisadores avaliaram ainda a influência da concentração de xilose no transporte de xilulose. Diferentes proporções xilose/xilulose (1; 1,5; 2; 2,5 e 3) foram testadas em fermentações de xilulose e não foi observado interferência significativa, sugerindo que o mecanismo de assimilação da xilose e da xilulose sejam diferentes, pois não é observado fase lag para a utilização de xilulose. O aumento da concentração de xilulose interferiu na fermentação, aumentando a taxa inicial da produção de etanol, contudo a produção de etanol diminui depois de 8 horas, e no fim de 24 horas os ensaios tem a mesma produção de etanol (cerca de  $13\text{g.L}^{-1}$ ), independente da concentração inicial de substrato. Provavelmente a concentração de etanol acumulado durante a fermentação seja responsável pela queda na taxa de produção de etanol, já que a presença de etanol no início das fermentações provocou diminuição da taxa de produção de etanol.

Fermentações de xilulose apresentam também a formação de xilitol, glicerol e ácido acético. O xilitol é proveniente tanto da xilose que é consumida em baixas quantidades como também da redução da xilulose, evidenciando a presença de xilitol desidrogenase em *S. cerevisiae* (GONG *et al*, 1981). Baixa temperatura, pHs mais altos e alta concentração de xilose favorecem a produção de xilitol.

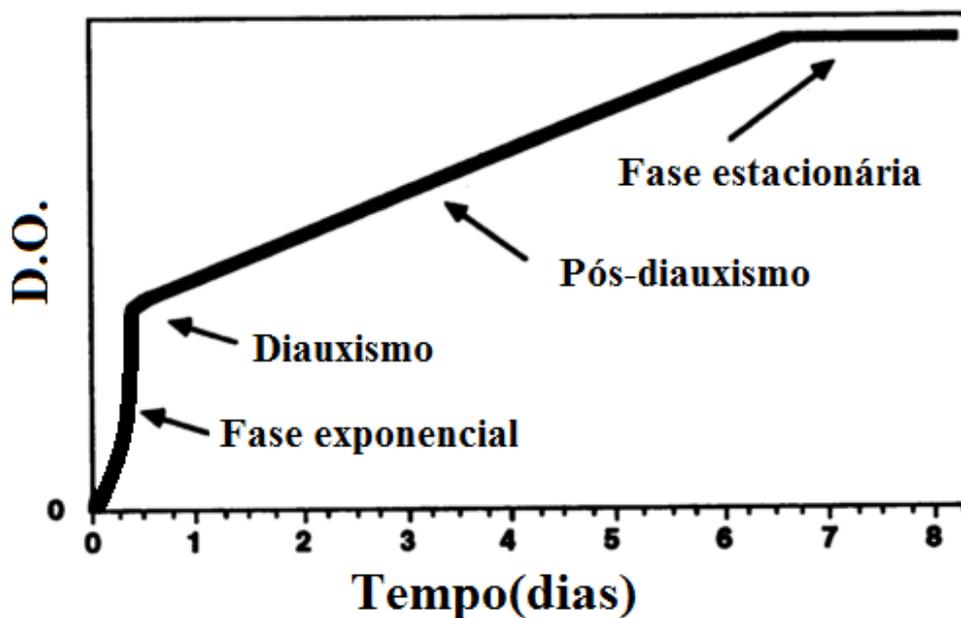
## **2.6 *Saccharomyces cerevisiae***

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura já utilizada desde o princípio da história para a fabricação de pães, vinho, cerveja, e é atualmente o principal microrganismo utilizado na indústria de álcool combustível. Na fermentação da glicose, cumpre todas as características desejáveis para o processo: apresenta elevada eficiência na conversão do substrato em produto, alta tolerância a etanol e a altas concentrações de açúcar, não exige condições de processo muito complexas, nem meios de cultivo dispendiosos, não é patogênica (BETTIGA, HAHN-HÄGERDAL, GORWA-GRAUSLUND, 2008; PIŠKUR, 2006; WERNER-WASHBURNE *et al* 1993). Essa levedura mantém o pH citosólico mais ou menos constante em meios extracelulares entre pH 3,5 e 9 (VERDUYN, 1991), permitindo operação a baixos pH, diminuindo risco de contaminação bacteriana. É um microrganismo mesófilo (24-40°C), tendo como temperatura de crescimento ideal menor que a temperatura de fermentação.

Microrganismos como leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, diante da falta de alimento cessam o crescimento e param de se reproduzir, entrando na fase estacionária. As células nesse estágio se diferenciam de forma que mantém sua viabilidade por extensos períodos mesmo sem nutrientes, contudo preservam capacidade de crescer novamente quando

nutrientes necessários tornam a ser disponibilizados (WERNER-WASHBURNE et al 1993). Em crescimento em meio rico como YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) é possível observar diferentes fases antes da fase estacionária (Figura 5). Na fase exponencial as células crescem consumindo glicose em anaerobiose, já que acontece repressão de enzimas da respiração em concentrações altas de açúcares (acima da concentração crítica- entre 0,9 e 9g.L<sup>-1</sup>). Em crescimentos em batelada, o açúcar é todo consumido antes que as células possam retomar sua atividade mitocondrial, assim, a glicose acaba e acontece o diauxismo, a levedura para de crescer, e reativa seu metabolismo para respiração, consumindo assim o etanol produzido na primeira etapa. Pós diauxismo o crescimento celular retoma em baixas taxas, utilizando a energia da respiração (PIŠKUR, 2006; RETORI; VOLPE, 2000; WERNER-WASHBURNE et al 1993).

**Figura 5** Densidade ótica durante crescimento de *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de WERNER-WASHBURNE et al 1993.

A fase que segue todas essas modificações metabólicas nas células é a fase estacionária. A falta de outros nutrientes, não só da fonte de carbono, como nitrogênio, fósforo, enxofre podem levar o cultivo ao estado estacionário. As células da fase estacionária são fisiológica, bioquímica e morfológicamente distintas das células da fase de crescimento exponencial, são mais resistentes a vários tipos de estresses, além de manter viabilidades altas, cerca de 100%, em meio sem adição de nutrientes, por mais de três meses após terem atingido estado estacionário em meio rico (WERNER-WASHBURNE et al 1993; LILLIE e PRINGLE, 1980).

### 2.6.1 Linhagens industriais de *S. cerevisiae*

Na produção industrial de etanol a *S. cerevisiae* foi utilizada até meados dos anos 90 proveniente da indústria de panificação. Embora permitisse uma partida rápida, segura e de baixo custo, foi verificado por cariotipagem em diversas usinas que a levedura de panificação não era capaz de prevalecer no processo, sendo substituída por linhagens selvagens (AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2008).

A maioria das usinas opera em batelada alimentada, alimentando mosto e biomassa, por cerca de 200 a 300 dias com alta densidade celular (10-17% p/v em base úmida). Com isso é fundamental economicamente que haja reciclo de células durante o processo. No final de cada fermentação a concentração de etanol chega a 7-11% (v/v), correspondendo a aproximadamente 93% do rendimento teórico, e a de substrato a 0,1%, levando cerca de 6-11 horas, assim, as células são recicladas cerca de 400 a 600 vezes durante a safra. A levedura é centrifugada e passa por um tratamento ácido antes de retornar à dorna de fermentação, para evitar contaminações bacterianas. A partir dos anos 90 constatou-se que as leveduras utilizadas como inóculo eram totalmente substituídas por linhagens nativas logo no começo da safra, mas que leveduras isoladas em safras anteriores, na mesma unidade, eram capazes sim de permanecer no processo (AMORIM et al., 2011; ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006; BASSO et al., 2008).

As leveduras nativas, com a capacidade de dominar e prevalecer na fermentação durante a safra, infelizmente apresentam desvantagens como formação excessiva de espuma, alta taxa de sedimentação, longos períodos de fermentação com alta concentração de açúcar residual (BASSO et al., 2008).

A busca por linhagens capazes de competir com leveduras nativas levou a um estudo de 12 anos realizado por Basso et al (2008) onde linhagens de panificação como Fleishmann<sup>®</sup> e Itaiquara<sup>®</sup> compuseram a partida por duas safras em usinas brasileiras, e foram acompanhadas. Na maioria das destilarias essas linhagens foram substituídas por linhagens selvagens em um período curto, 20-30 dias. Linhagens coletadas nas usinas foram reintroduzidas no processo em safras posteriores, nas próprias unidades e também em outras usinas, e acompanhadas características como dominância, viabilidade, rendimento. Essas linhagens selecionadas passaram então a ser utilizadas amplamente pelo setor sucro-alcooleiro; receberam nomes com as iniciais das unidades de origem: BG-1 (Usina Barra Grande), CAT-1 (Usina Catanduva), CR-1 (Usina Cresciumal), PE-2 (Usina Pedra Grande), AS-1 (Usina Santa Adélia) (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). As linhagens mais

utilizadas nas usinas brasileiras são a PE-2, CAT-1 e a BG-1, sendo responsáveis por mais de 60% do etanol produzido na safra 2007/2008. Essas leveduras apresentam perfis muito semelhantes entre si, e como apresentado na Tabela 3, características superiores às leveduras de panificação antes empregadas (BASSO et al., 2008).

**Tabela 3 Parâmetros fisiológicos fermentativos da levedura de panificação e da linhagem selecionada PE-2 durante um ciclo fermentativo na usina, usando caldo de cana e melaço a 33°C.**

Parâmetros Fermentativos	Levedura de panificação	PE-2
<b>Rendimento em etanol(%)*</b>	88.1 ± 1.01	92.0 ± 1.12
<b>Glicerol (%)*</b>	5.4 ± 0.25	3.38 ± 0.33
<b>Aumento de biomassa (%)**</b>	5.8 ± 0.61	8.2 ± 0.84
<b>Viabilidade (%)**</b>	48 ± 1.1	94 ± 1.9
<b>Trealose(%base seca)**</b>	4.0 ± 0.22	9.5 ± 0.29
<b>Glicogênio (%base seca)**</b>	9.0 ± 0.43	16 ± 0.51

Fonte: BASSO et al., 2008.

\* Cálculo com base no açúcar consumido

\*\* Dados calculados no final do ciclo fermentativo

## 2.7 Xilose Isomerase

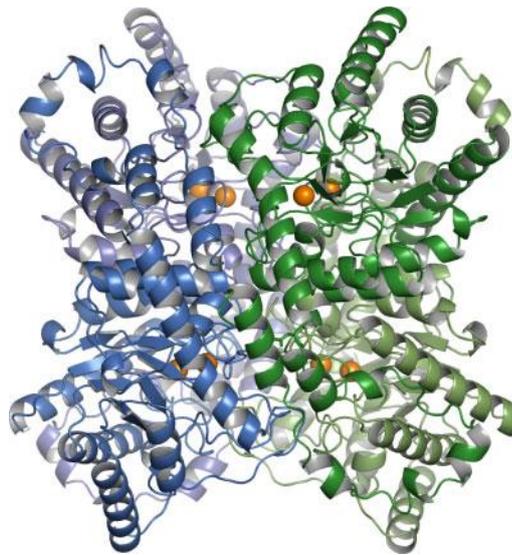
A xilose isomerase (EC:5.3.1.5) é uma enzima que catalisa a interconversão aldose-cetose de xilose-xilulose, seu substrato natural (BLOW et al., 1992; MARIS et al., 2007; PRONK et al., 1988) como também a de glicose- frutose, por isso pode ser chamada também de glicose isomerase (BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, 1996). É uma das enzimas mais utilizadas na indústria, sendo empregada em larga escala para produção de xarope de frutose (BHAT; JOSHI; KOTHARI, 1979; BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, 1996; BLOW et al., 1992), além de possuir potencial aplicação na produção de etanol de resíduos lignocelulósicos (BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, 1996; BLOW et al., 1992).

Microrganismos são a principal fonte de produção desta enzima, sendo geralmente encontrada em espécies de bactérias, como de *Streptomyces e Bacillus* (BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, 1996), em fungos anaeróbios, *Piromyces sp, Candida utilis, Scheffersomyces stipitis*, e em algumas plantas, *Hordeum vulgare, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa e Medicago truncatula* (MARIS et al., 2007).

A xilose isomerase de *Streptomyces rubiginosus* é uma metaloproteína de 173KDa com quatro sub-unidades iguais, cada uma com dois cátions (Figura 6) ( JANIS et al., 2008).

Um dos cátions de cada subunidade atua como metal de ligação ao substrato, enquanto o outro catalisa a isomerização, por isso é necessário que exista a ligação dos metais para obter a espécie catalítica. Os íons  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Co^{+2}$  são ativadores, sendo que o  $Mg^{+2}$  afeta principalmente a atividade da enzima e o  $Mn^{+2}$  a estabilidade; enquanto íons  $Ni^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  são inibidores (JANIS et al., 2008). Também são inibidores da XI polióis, como o sorbitol e o xilitol, formas reduzidas da glicose e da xilose respectivamente. Esses polióis imitam a forma linear dos açúcares, se ligando com alta afinidade ao sítio ativo da enzima (BASTELAERE, VANGRYSPPERRE; KERSTERS-HILDERSON, 1991) sendo essa interação maior em baixos pH (KOVALEVSKY et al., 2012).

**Figura 6** Estrutura cristalina da glicose isomerase de *Streptomyces rubiginosus*. Dois monômeros da estrutura tetramérica estão representados em azul e os outros dois em verde. Esferas em laranja representam os cátions de  $Mg^{2+}$ .



Fonte: JANIS et al., 2008

A faixa de pH ótima para a enzima é entre 7 e 8 (KOVALEVSKY et al., 2012.) abaixo desse pH a atividade enzimática cai devido a perda dos dois cátions do sítio ativo e da dissociação dos monômeros (JANIS et al., 2008). A temperatura ótima está entre 60 e 80 C e aumenta na presença de  $Co^{2+}$  (BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, 1996).

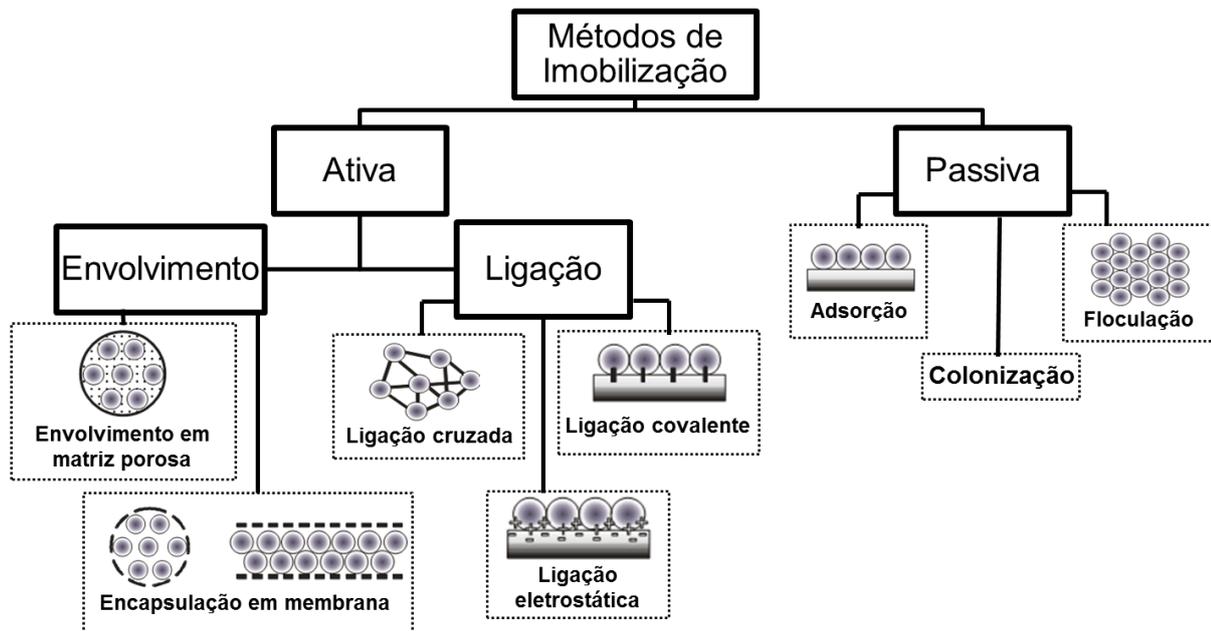
## 2.8 Imobilização

A utilização de enzimas, células, componentes celulares e moléculas orgânicas em processos biotecnológicos vêm se destacando nas últimas décadas, e o aperfeiçoamento de

processos já estabelecidos e a implementação de novas tecnologias empregando esses biocatalisadores, vem sendo constantemente estudados. A imobilização, tanto de células como de enzimas, consiste no confinamento físico, restringindo a mobilidade, em um espaço definido onde são mantidas suas atividades catalíticas (FREEMAN; LILY, 1998; SHULER; KARGI, 2006).

A imobilização pode ser passiva ou natural, quando é decorrente de processos naturais como floculação ou formação de filmes biológicos, que naturalmente aderem a suportes inertes ou bioativos. Ou pode ser ativa ou artificial, quando o aprisionamento ou ligação dos agentes biológicos ocorrem por fatores químicos ou físicos (Figura 7) (COVIZZI et al, 2007; SHULER; KARGI, 2006).

**Figura 7 Métodos de imobilização de agentes biológicos.**



Fonte: Adaptado de COVIZZI et al, 2007

Diversas técnicas podem ser selecionadas para imobilização, de acordo com o tipo de agente a ser imobilizado e o tipo de utilização a que este será submetido. Os métodos são divididos em duas categorias: envolvimento, que pode ser por engaiolamento ou encapsulação, ou ligação, se dividindo em adsorção ou covalente.

O envolvimento é um aprisionamento físico da célula ou da enzima, por engaiolamento em uma matriz porosa ou por encapsulação por membranas semi-permeáveis, onde não há uma malha entre as células aprisionadas. Imobilizações por ligação envolvem interações químicas entre os agentes biológicos e os suportes, mantendo-os unidos. A técnica de ligação por adsorção acontece por forças de interação como interações eletrostáticas,

ligações iônicas entre suporte e célula/enzima, e o método com ligação covalente ocorre entre grupamentos químicos que reagem covalentemente, geralmente sendo necessária a ativação desses grupos por reagentes químicos como glutaraldeído, carbodiimida. Quando a células ou enzimas se ligam entre si, por grupos ativados por estes agentes químicos, a imobilização é conhecida como entre-cruzamento.

As técnicas de imobilização para microrganismos e enzimas são muito similares, contudo é necessário garantir condições que mantenham as enzimas e as células metabolicamente ativas, adotando suportes, reagente químicos e protocolos compatíveis com cada um. Na tabela Tabela 4 são listados alguns dos suportes mais utilizados para cada técnica.

**Tabela 4- Tipos de imobilização e exemplos de suportes empregados**

<b>Técnica de imobilização</b>	<b>Suportes</b>
Engaiolamento	Agar, poliacrilamida, alginato, quitosana, k-carragenana e pectina.
Encapsulação	Nylon, celulose, poliacrilato, membranas de poliéster.
Ligação por adsorção	Sílica, alumina , vidro poroso, cerâmica, celulose, amido, gelatina.
Ligação covalente	Quitosana-glutaraldeído, iodoacetil-celulose

Fonte: Shuler e Kargi, 2002.

Vantagens associadas à imobilização de células/enzimas levam a menores custos de operação e facilitam o processo (BUČKO et al., 2012; SHULER; KARGI 2006) pois:

- Possibilitam a aplicação de reações enzimáticas de múltiplas etapas;
- Apresentam rendimentos e produtividades elevados, com utilização de altos fluxos sem perda de células/enzimas;
- Estabilidade operacional geralmente alta;
- Possibilitam a reutilização dos catalisadores dispensando operações de extração e/ou purificação;
- Permitem altas densidades celulares e enzimáticas;
- Densidades celulares e atividades enzimáticas podem ser mantidas por longos períodos de operação;
- Aumento na pureza dos produtos, sendo mais facilmente separados da biopartícula catalítica;
- São menos suscetíveis a contaminações microbianas.

Por outro lado as seguintes desvantagens potenciais são apresentadas:

- Reações indesejáveis podem ocorrer pela presença de várias enzimas cataliticamente ativas;
- Perda de atividade durante o processo de imobilização
- Desprendimento de células e enzimas do suporte;
- Problemas ligados à transferência de massa intra-particular.

## 2.9 Simultânea Isomerização e Fermentação de xilose

Uma maneira de produzir etanol a partir da xilose é, primeiramente, converter xilose em xilulose, em reação catalisada por xilose isomerase, seguido de fermentação para etanol por leveduras (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Como a isomerização da xilose tem equilíbrio deslocado no sentido da produção de xilose, a execução da isomerização e da fermentação em simultâneo tem a vantagem de deslocar o equilíbrio da reação de isomerização no sentido de formação de xilulose. No entanto, no caso do processo simultâneo, a escolha do pH e da temperatura do processo precisa ser um compromisso entre valores em que enzima e microrganismo possam operar (du PREEZ, 1994).

A fermentação por leveduras ocorre com maior eficiências a pH próximos a 5, contudo a XI tem muito baixa atividade nessa faixa, sendo ainda mais suscetível a inibição por xilitol. Entretanto a fermentação de xilulose ocorre entre pHs 4-6, possibilitando a reação de isomerização mesmo que com baixo rendimento. O uso de glicose isomerase imobilizada permitiria a utilização de alta concentração do biocatalisador no reator, compensando as baixas velocidades de isomerização. Assim, apesar das diferenças entre as velocidades de isomerização e fermentação os rendimentos finais em etanol podem ser altos (LASTICK et al., 1990).

A determinação de condições que favoreçam alta produtividade e seletividade em etanol é função de muitos parâmetros como massa celular, pH e seu controle durante a fermentação, temperatura, influência da aeração, concentração de enzima, concentração de substrato e até da linhagem de microrganismo escolhida.

A viabilidade do processo SIF foi avaliado por Gong et al (1981) com linhagem de *S. cerevisiae* de panificação, isomerizando 120g.L<sup>-1</sup> de xilose em pH 6, 40 C a 650 rpm. O consumo de todo açúcar levou 24 horas com rendimento de 85% de etanol, houve produção de sub-produtos, dentre eles o xilitol. O pH foi controlado durante a SIF e os autores

salientam a importância de técnicas que possibilitem o controle desse parâmetro no processo para sua viabilização.

Alguns parâmetros como influência da aeração, utilização de azida sódica, um inibidor da respiração, concentração de enzima, massa celular foram estudados por Hahn-Hägerdal, Berner; Skoog (1986). As SIFs com azida tiveram altos rendimentos em etanol e baixa produção de outros produtos. Além disso a azida, diminuindo a formação de ácido acético, ajudou a manter o pH em uma faixa ainda adequada para manutenção da atividade enzimática. A quantidade de células aumentava a taxa de produção de etanol e com  $75 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  de células, a maior concentração celular avaliada,  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de XI a 30 C, pH inicial 6 em presença de 4,6 mM de azida o rendimento teórico de etanol foi obtido, partindo de  $42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose em 24 horas. Os autores destacaram que para tornar o processo economicamente viável é necessário manter a enzima ativa, além de implementar formas de reutiliza-la.

Utilizar enzima imobilizada foi uma estratégia escolhida por Rao et al (2008) na qual XI foi coimobilizada com urease e uréia foi adicionada ao meio reacional. Esse biocatalisador além de permitir a reutilização da XI ainda tem, em seu interior, pH favorável a isomerização, independente do pH do meio externo. Mesmo em um meio com pH ácido, no interior do pellet o pH é mais alto graças a presença de amônia proveniente da hidrólise da uréia pela uréase. Além disso, foi adicionado tetraborato de sódio no meio com objetivo de alterar o equilíbrio para a formação de xilulose. Esse biocatalisador foi capaz de isomerizar xilose a xilulose a 34 C em pH 4,5.

Yuan e col. (2011) testaram esse biocatalisador descrito acima em SIF a pH 4,5, 34 C em meio contendo 60 e  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose e xilose, respectivamente, além de 0,05M de borato e 0,01-0,1 M de uréia. Com  $200 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  de levedura de panificação toda glicose foi consumida rapidamente, em aproximadamente 2 horas, porém a xilose em dez horas teve conversão de 60%. Os pesquisadores relatam diminuição da taxa de isomerização no decorrer da SIF devido a inibição pelo xilitol que é formado durante o processamento da xilulose. Assim, realizam um experimento com o biocatalisador isomerizando previamente 70% da xilose a xilulose e só então adicionando as leveduras. Esse procedimento aumentou o consumo de pentoses alcançando rendimento em etanol de 81%. Nesse caso a produção de xilitol foi reduzida.

No ano seguinte, 2012, o mesmo grupo apresenta uma nova configuração para a SIF empregando o mesmo biocatalisador. Em um reator de leito fixo, onde ocorre a isomerização, foi utilizada XI coimobilizada com uréase e sequencialmente esta ligado a um reator de fibra

oca com  $200 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  de levedura. Utiliza borato, e opera a  $34^{\circ}\text{C}$  em pH do meio 4,5 em SIF contendo xilose e glicose. A glicose foi rapidamente consumida,  $60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  em duas horas, enquanto apenas 66% dos  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose foi convertida em dez horas. Houve produção de etanol, com  $0,39\text{g}_{\text{etanol}}\cdot\text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$ , e também formação de xilitol, em concentração 4,5 menor que a de etanol. A produção de xilitol presente no processo SIF diminuiu quando houve utilização de solução de pentoses já pré-isomerizado e foi ausente realizando fermentação de xarope de xilulose e xilose ( $21$  e  $9\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Esse sistema apresentou a mesma inibição enzimática da XI por xilitol, prejudicando o esgotamento das pentoses.

Em 2012, Silva e col. também desenvolveram um biocatalisador contendo levedura de panificação e XI coimobilizadas em gel de alginato de cálcio. Uma SIF teste foi realizada com xilose  $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  inicial, pH do meio reacional 6, temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  alcançando conversão de 75,4% em 48 horas. Houve produção de etanol, xilitol e em menores quantidades glicerol e ácido acético. A queda no pH foi apontada como a causa da lenta conversão, já que nas primeiras 12 horas de ensaio, quando o pH ainda não era tão baixo, cerca de 40% do açúcar foi assimilado.

Embora a queda do pH inviabilizasse o esgotamento do substrato o biocatalisador inovador pode ser aprimorado e as condições operacionais estudadas. A manutenção do pH pode ser feita com o sal carbonato de cálcio, que pode ser coimobilizado no catalisador, e assim outros parâmetros operacionais podem ser estudados com intuito de aumentar o rendimento, produtividade e seletividade em etanol.

### 3 Materiais e Métodos

#### *Materiais*

Para a realização deste trabalho, os principais reagentes utilizados foram: extrato enzimático comercial Gensweet SGI (xilose isomerase (EC5.3.1.5) de *Streptomyces rubiginosus*) cedida por Genencor International (Palo Alto-CA-USA) imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído (Silva et al, 2012), com atividade final de 1200 UI.g<sup>-1</sup> derivado a 60°C e pH 7 . Os microrganismos utilizados foram a *Saccharomyces cerevisiae* de panificação obtida no fermento biológico fresco da marca Itaiquara<sup>®</sup> (Brasil) e linhagens industriais, BG-1 e CAT-1, cedidas pelo Professor Andreas L. Gombert (Brasil) .Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2 % (Polymar Ind. Ltda, Brasil), solução de glutaraldeído, 25% em água (Vetec, Brasil); Kit para medida de glicose por método enzimático (Laborlab, Brasil), xilose e xilulose da Sigma-Aldrich, antibiótico Kamoran da Química Real<sup>®</sup>. Demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

#### *Métodos*

Os estudos do processo SIF propostos nesse trabalho utilizam um biocatalisador especialmente preparado. Com a finalidade de aliar a capacidade catalítica da enzima xilose isomerase, isomerizando xilose a xilulose, com as desejáveis características fermentativas da levedura *S. cerevisiae*, já consagrada na indústria alcooleira, um pellet de alginato de cálcio imobilizando esses dois agentes biológicos foi desenvolvido.

Para tal, primeiramente a enzima solúvel XI foi imobilizada em gel de quitosana, previamente ativado com glutaraldeído, possibilitando que a enzima, devido a essa nova conformação, ficasse aprisionada na matriz polimérica formada por alginato de cálcio. As células de levedura possuem tamanho adequado para a imobilização em alginato sem necessidade e outras intervenções.

#### 3.1 Produção do derivado enzimático

##### *Preparação do gel de quitosana ativado com glutaraldeído*

A quitosana em pó 2% (m/m) foi solubilizada em uma solução de ácido acético 2% (v/v) e homogeneizada por 30 minutos a temperatura ambiente. A solução homogênea foi aquecida, mantida a 50°C e adicionado KOH 0,5 M na proporção 3:2 (v/v)(solução KOH/solução quitosana), mantendo-se sob agitação durante 30 minutos. A ativação do

suporte foi realizada mediante a adição de 0,8 % (v/v) de glutaraldeído, nas mesmas condições anteriores de temperatura e agitação por 30 minutos. Imediatamente após o tempo de ativação o gel foi lavado com excesso de água destilada à temperatura ambiente até a neutralização do mesmo, conforme Budriene e Gorochovceva. (2005). Após a preparação do suporte procedeu-se a determinação da umidade, em Balança Determinadora de Umidade (Marte<sup>®</sup> – modelo ID50), do gel e a imobilização da glicose isomerase.

Esse equipamento é provido de um programa de secagem automática no qual a amostra era seca até que não houvesse variação de peso. Nesse momento, o equipamento automaticamente informava o final do processo e o respectivo valor em % de umidade do material analisado.

#### *Imobilização da enzima*

Preparou-se uma solução enzimática com concentração ajustada para oferecer  $50\text{mg}_{\text{enzima}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{suporte}}$  em tampão tris-maleato 50mM pH7, contendo  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 mM) e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,5 mM), 25°C. Retirou-se 1mL para controle da estabilidade da enzima sob condições de imobilização e ao restante da solução adicionou-se massa de suporte na razão 1  $\text{g}_{\text{gel}}/10 \text{ mL}$  de solução enzimática (diluição de aproximadamente 1,1 da solução enzimática). Essa reação ocorreu à temperatura ambiente.

A imobilização foi finalizada após 20 horas, quando adicionou-se borohidreto de sódio ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}_{\text{suspensão}}^{-1}$ ) e transcorridos 30 minutos o derivado obtido foi lavado em filtro sob vácuo com tampão Tris maleato, 200 mM, pH 7, depois com água destilada e por fim com tampão Tris maleato, 50mM, pH 7 para remoção de enzima adsorvida e do borohidreto de sódio. O derivado (gel de quitosana com enzima imobilizada), tratado posteriormente pela sigla IXI-Ch (Imobilize Xylose Isomerase in Chitosan), foi armazenado a 4°C em solução de benzoato de sódio 0,1%.

#### *Parâmetros de Imobilização:*

*Dosagem de proteína* : A quantificação foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Albumina bovina cristalina foi usada como padrão para construção da curva de calibração.

*Atividade enzimática*: Um volume conhecido de enzima solúvel ou massa de gel de quitosana contendo enzima imobilizada foi adicionado a 5 mL de solução de frutose (360

g/L), pH 7, em tampão Tris maleato 50mM, contendo  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (50mM) e  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (2,5 mM), sob agitação a 60 C. Acompanhou-se o aumento da concentração de glicose em função do tempo, para curtos tempos de reação (menos que 10% de conversão) de modo a se medir a velocidade inicial da reação (LADISCH, EMERY; RODWELL; 1977). A reação foi interrompida com ácido clorídrico 20% m/v na proporção 1:1 para inativação da enzima.

A concentração de glicose foi determinada por reação com Glicose Oxidase/ Peroxidase (Kit comercial para dosagem de glicose), a 37 C por 5 minutos, seguido de medida de absorvância a 505 nm. Utiliza-se curva de calibração de glicose, que é obtida para cada lote de análise. Uma unidade (UI) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu$ mol de glicose por minuto sob as condições de ensaio descritas. O cálculo da atividade é realizada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Atividade}(UI \cdot mL^{-1}) = \frac{\Delta P / \Delta t \cdot V_{\text{reação}} \cdot \text{diluição}}{MM_{\text{glicose}} \cdot V_{\text{enzima}}} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:  $V_{\text{reação}}$ : volume da reação (5,1 mL de solução);  $V_{\text{enzima}}$ : volume da enzima (0,1 mL de enzima);  $MM_{\text{glicose}}$ : massa molar da glicose (0,180 mg glicose  $\cdot \mu$ mol glicose<sup>-1</sup>);  $\Delta P / \Delta t$  tangente do trecho linear da curva de glicose liberada em função do tempo.

#### *Cálculo dos Parâmetros de Imobilização*

*Cálculo do Rendimento de imobilização por proteína (R<sub>P</sub>(%))*: O rendimento de proteína imobilizada (R<sub>P</sub>) foi quantificada com base na concentração de proteína oferecida no início da imobilização, considerando o efeito da diluição da solução de imobilização de enzima devido à adição do suporte, e a concentração de proteína presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostrado na Equação 2:

$$R_P(\%) = \frac{P_o - P_f}{P_o} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: R<sub>P</sub>(%) é a porcentagem de proteína imobilizada, P<sub>o</sub> e P<sub>f</sub> são as concentrações de proteína no tempo inicial e final no sobrenadante em mg/mL, respectivamente.

*Cálculo do Rendimento de imobilização por atividade enzimática (R<sub>A</sub>(%))*: O rendimento de imobilização por atividade enzimática foi quantificada de modo semelhante ao descrito para o rendimento de proteína, porém além do efeito da diluição da solução de imobilização na atividade oferecida inicial, levou em conta também, a possível inativação da enzima devido às condições de imobilização, mostrado na Equação 3:

$$R_A(\%) = \frac{(A_o - A_B) - A_f}{(A_o - A_B)} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: RA(%) é a porcentagem de atividade enzimática imobilizada, Ao e Af são as atividades enzimáticas no tempo inicial e final no sobrenadante em mg/mL, respectivamente, e AB a atividade enzimática medida no controle(branco).

*Cálculo da atividade enzimática recuperada(AR(%)):* Foi calculada utilizando a atividade da enzima imobilizada  $A_{der}$  (UI.g<sup>-1</sup>) e comparada com a atividade teoricamente imobilizada, como mostra a Equação 4 ( RODRIGUES et. al.; 2008).

$$AR(\%) = \frac{A_{der}}{A_t} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: At é a enzima imobilizada teórica em unidades (UI. g<sup>-1</sup><sub>gel</sub>), foi calculada aplicando o rendimento de imobilização, por atividade (RA), na carga de enzima oferecida (em UI. g<sup>-1</sup><sub>gel</sub>).

## 3.2 Produção dos biocatalisadores

Foram preparados três diferentes biocatalisadores. Um continha o derivado enzimático e a levedura imobilizados em alginato de cálcio, ao outro foi apenas adicionado carbonato de cálcio e um terceiro não continha o derivado enzimático, sendo constituído somente por levedura e CaCO<sub>3</sub> envolvidos pelo alginato.

### 3.2.1 Biocatalisador sem CaCO<sub>3</sub>

#### *Ativação levedura*

A levedura de panificação Itaiquara<sup>®</sup> (inóculo de *S. cerevisiae*, 24 gms.L<sup>-1</sup>), fermento fresco, foi ativada em meio contendo KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2 g.L<sup>-1</sup>), extrato de Levedura (5 g.L<sup>-1</sup>), soytone (5 g.L<sup>-1</sup>), uréia (1,5 g.L<sup>-1</sup>), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,1 g.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (1,9 g.L<sup>-1</sup>) e glicose (20 g.L<sup>-1</sup>), com pH inicial 6,0, 30°C.

Essa mistura de levedura e meio de ativação foi realizada em frascos Erlenmeyers com um volume vazio maior que o resultante, de modo a se obter uma dissolução homogênea. Feito isto, corrigiu-se o pH para 6 e levou-se a um ambiente termostatizado a 30°C (shaker estático), permanecendo por 1h.

Decorrido o tempo, a mistura foi centrifugada a 4°C, 5.10<sup>3</sup> rpm por 5 minutos. Feita a centrifugação de toda a solução, a massa de levedura era submetida a uma filtração a vácuo, e a partir daí, uma amostra era submetida a determinação de umidade.

Alguns testes realizados mostraram que a ativação em glicose não influenciava no processo de SIF e esta etapa não foi mais realizada para os próximos biocatalisadores.

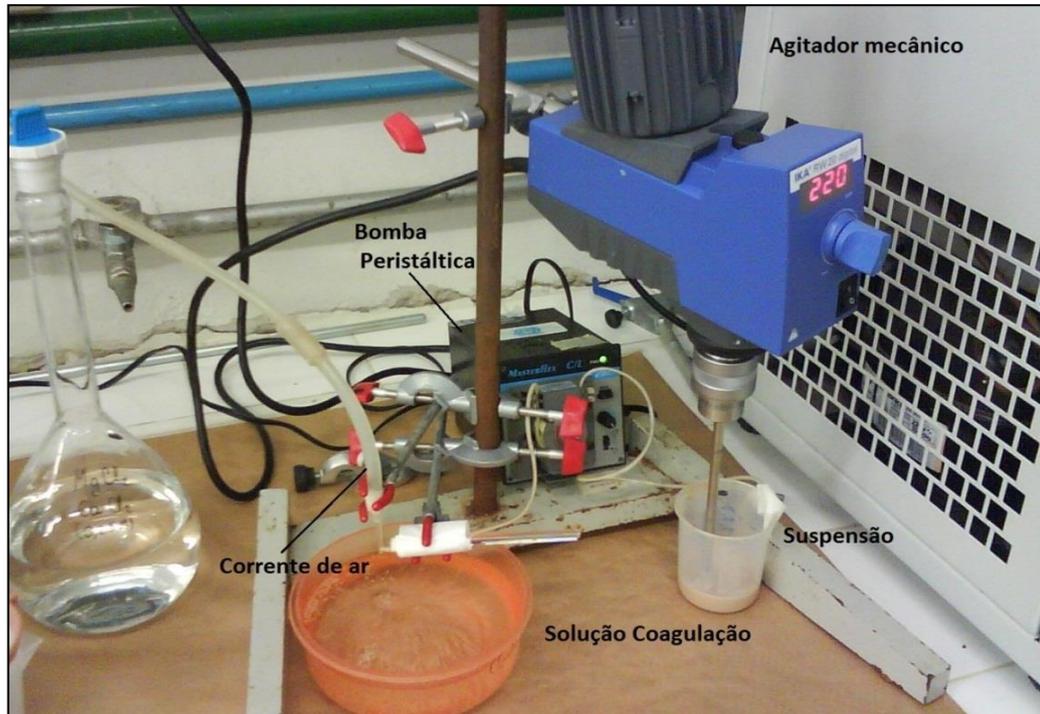
#### *Preparação do biocatalisador*

A elaboração era iniciada com a solubilização de 1% de alginato de sódio em água, utilizando um agitador magnético, e posterior adição da enzima e levedura na concentração determinada, nesse caso 16% de levedura em massa seca e 5% de enzima IXI-Ch.

Preparada a suspensão, antes de ser levada ao sistema de coagulação, ela foi passada em uma peneira plástica para homogeneização, evitando entupimento da mangueira ligada a bomba peristáltica. A suspensão obtida, mantida sob agitação, foi bombeada pela mangueira e uma corrente de ar auxiliava a formação dos pellets que gotejavam em uma solução contendo  $\text{CaCl}_2$  0,25 M e  $\text{MgCl}_2$  0,25M. Os pellets formados eram armazenados em geladeira por 18 e 24 horas na própria solução de coagulação.

Para o melhor entendimento do processo de imobilização em alginato a Figura 8 ilustra o sistema descrito.

**Figura 8 Sistema para a Coagulação do biocatalisador.**



Fonte: Acervo próprio

Uma amostra de biocatalisador foi reservada para realizar a determinação da umidade por secagem em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Análise em duplicata.

### 3.2.2 Biocatalisador com CaCO<sub>3</sub>

Foi preparado um conjunto de biocatalisadores contendo CaCO<sub>3</sub> sólido (1%) com diferentes concentrações de IXI-Ch e levedura coimobilizadas em gel de alginato, seguindo o mesmo procedimento citado anteriormente, porém sem a etapa de ativação da levedura. Alguns estudos paralelos mostraram que a ativação em glicose da levedura de panificação não influenciava na fermentação.

A cura desses biocatalisadores foi realizada em geladeira a 4°C, por cerca de 20 horas, com meio contendo os mesmos sais que o meio a ser empregado na SIF (Tabela 6), exceto pela ausência de xilose. O pH dessa solução era ajustado de acordo com o ensaio a ser realizado, sendo o mesmo valor desejado para o processo SIF. Essa estratégia almejava padronizar o pH inicial dos experimentos.

#### *Levedura Itaiquara*<sup>®</sup>

As concentrações da suspensão de pellets para estudar a influência da concentração de enzima e levedura no reator estão descritas na Tabela 5.

**Tabela 5 Composições em porcentagem mássica dos biocatalisadores utilizados nos ensaios realizados.**

Levedura/Enzima	Levedura(%)	Enzima(%)	Alginato de sódio(%)	CaCO <sub>3</sub> (%)
17%L 5%Ez	17	5	1	1
5%L 20%Ez	5	20	1	0,5
10%L 5%Ez	10	5	1	0,5
10%L 10%Ez	10	10	1	0,5
10%L 20%Ez	10	20	1	1

Para ensaios posteriores, como avaliação da influência do pH e da temperatura, foram sempre adotados a concentração 10% levedura em massa seca e 20% de IXI-Ch.

#### *Leveduras cultivadas*

Os ensaios realizados com as cepas CAT-1 e BG-1 empregaram a concentração 10% levedura em massa seca e 20% de IXI-Ch.

- *Cultivo de linhagens industriais de Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas para SIF de xilose duas linhagens industriais de leveduras, as *S. cerevisiae* BG-1 e CAT-1. Essas linhagens foram doadas pelo Prof. Andreas L Gombert da Universidade de São Paulo e armazenadas em glicerol 20% em freezer -80 C.

Os cultivos foram realizados da mesma maneira para as duas linhagens. Para reativação, foi retirada com uma alça do criotubo uma pequena amostra, e estriada em placa de petri contendo aproximadamente 20mL de meio YPD sólido (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% e ágar 2%). As placas foram incubadas em estufa a 30 C por 48 horas e posteriormente armazenadas em geladeira (BASSO et al., 2008).

Uma colônia de cada linhagem foi selecionada e repicada em uma nova placa de petri com mesmo meio citado anteriormente, e novamente incubada sob as mesmas condições. Essas novas placas, oriundas de apenas uma colônia, foram armazenadas em geladeira e amostras foram cultivadas para a produção dos biocatalisadores e emprego em SIF de xilose.

Primeiramente foi realizado o pré-cultivo das leveduras em erlenmeyers de 125 mL com utilização de 20% do volume com meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%). Uma colônia da placa de petri era inoculada no meio e incubada em Shaker a 28°C, 250 rpm por 24 horas, quando a fase estacionária já havia sido atingida. Após esse período, era medido a D.O. do pré-cultivo em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm e a suspensão era diluída 10 vezes em novo meio YPD, em erlenmeyers haletados de 1 L contendo 20% do volume de meio.

Os cultivos eram realizados em shaker com rotação de 250 rpm a 28°C por 24 horas, quando então a suspensão era centrifugada por 10 minutos a  $4 \times 10^3$  rpm e a massa celular recuperada era lavada e novamente centrifugada. Amostras eram utilizadas para determinação de massa seca em estufa a 60°C por 24 horas.

### **3.2.3 Biocatalisadores sem enzima**

Os biocatalisadores sem o derivado enzimático foram produzidos e curados do mesmo modo que os biocatalisadores com  $\text{CaCO}_3$ . Era composto também por 1% de alginato de sódio e 0,5% de  $\text{CaCO}_3$ , e continha 10% de levedura Itaiquara<sup>®</sup> em base seca.

## **3.3 Ensaios de fermentação e de Simultânea Isomerização e Fermentação (SIF)**

*Ensaios da isomerização e fermentação simultâneas sem  $\text{CaCO}_3$ :*

Os ensaios de SIF de xilose foram realizados em batelada utilizando tubos falcon de 50mL, mantidos a 35°C sob agitação de 150rpm em shaker, sendo usado um número total de reatores igual a quantidade desejada de pontos de análise (cada reator representou um tempo de análise) . O meio utilizado é o mesmo descrito para a ativação da levedura com substituição da glicose por 120 g.L<sup>-1</sup> de xilose, pH inicial 6 e o volume reacional total era 8 mL, sendo 4 mL de meio e 4 g de pellets (Figura 9). Em intervalos de tempo regulares eram recolhidas amostras (um reator por vez), para medidas de pH, viabilidade celular e consumo de substrato e produtos formados. O tempo máximo de acompanhamento dos ensaios foi 48 h.

**Figura 9** Reatores utilizados nos ensaios de isomerização e fermentação de xilose com glicose isomerase e *S.cerevisiae* coimobilizados em alginato de cálcio.



#### *Viabilidade celular*

Viabilidade celular foi verificada por microscopia óptica (microscópio Olympus BX50) mediante a contagem de células utilizando Câmara de Neubauer. A análise foi feita no início e final de cada SIF.

Para a contagem de células no interior do biocatalisador, este foi dissolvido em solução de citrato de sódio 4%, mantendo a proporção de 0,5g de biocatalisador : 10mL de solução de citrato 4%. Após a dissolução, realizou-se a diluição necessária para a contagem, sendo a última diluição realizada no corante azul de metileno, células viáveis não eram coradas, enquanto as mortas apresentavam coloração azul (TROVATI et al., 2009).

A viabilidade celular é definida como sendo a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas no espaço definido da câmara de contagem.

#### *Quantificação das pentoses e produtos da SIF*

As amostras retiradas dos ensaios eram filtradas em membrana 0,2 $\mu$ m e nelas quantificou-se xilose, xilulose, xilitol, ácido acético, glicerol e etanol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu SCL-10A equipado com detectores de índice de refração e de UV-visível. Os dois primeiros compostos foram quantificados usando coluna Aminex HPX87-C (300 $\times$ 7,8 mm; BIO-RAD) a 80°C, água ultra pura como efluente com vazão de 0,6mL.min<sup>-1</sup>, enquanto os últimos foram quantificados usando a coluna Aminex HPX87-H (300 $\times$ 7,8 mm; BIO-RAD) a 45°C, ácido sulfúrico 5mM como efluente com vazão de 0,6mL.min<sup>-1</sup> (CHANDRAKANT e BISARIA; 2000).

*Ensaios da isomerização e fermentação simultâneas com pH controlado:*

Os ensaios de SIF de xilose com objetivo de encontrar a melhor concentração de enzima e levedura no reator foram realizados em batelada utilizando tubos falcon de 50mL, mantidos a 35°C sob agitação de 150rpm, sendo usado um número total de reatores igual a quantidade desejada de pontos de análise (cada reator representou um tempo de análise). O volume reacional total composto por 1 mL de meio para cada 1 g de pellets (Figura 9). O meio reacional, com composição descrita na Tabela 4, teve pH ajustado para 5,6 e foi filtrado em membrana 0,45 micra para esterelização; sendo o kamoran adicionado após essa etapa. Como na composição do biocatalisador havia água, cerca de 85% de umidade, o meio era diluído aproximadamente 1,8 vezes. Em ensaios que avaliaram a influência do pH e da temperatura foram apenas varidas os valores desses parâmetros, pH 6,5 a 35°C e pH 5,6 para temperaturas iguais a 32 e 37°C.

**Tabela 6 Composições dos meios para ensaios realizados em shaker termostatizado a 35°C, sob agitação de 150 rpm e pH inicial ajustado para 5,6.**

Componente	Concentrações (g.L <sup>-1</sup> )
Xilose	120
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4
Ureia	3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	1,9
Kamoran	*

Nota:\*Foi adicionado o volume de Kamoran de uma solução alcóolica 1:1 de concentração 4 g/L de modo a obter uma concentração de 4 ppm no meio reacional.

Em intervalos de tempo regulares eram recolhidas amostras para medidas de pH e consumo de substrato e produtos formados, viabilidade celular era realizada no tempo inicial e final do processo. O tempo máximo de acompanhamento dos ensaios foi 24 h.

Análises de viabilidade, concentração celular e quantificação das pentoses e produtos da SIF são realizadas pelos mesmos procedimentos descrito para os ensaios sem  $\text{CaCO}_3$ .

#### *Estudo de diferentes linhagens de Saccharomyces cerevisiae em SIF de xilose*

Para o estudo do desempenho de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* foram selecionadas duas linhagens industriais, a CAT-1 e a BG-1. Após o cultivo foram produzidos pellets compostos por 10% de levedura em massa seca e 20% do derivado enzimático IXI-Ch e 0,5% de  $\text{CaCO}_3$ . A umidade das leveduras cultivadas foi previamente determinada e construída uma curva padrão de D.O.xmassa seca, que serviu como estimativa para a produção dos biocatalisadores.

As reações de SIF foram conduzidas e analisadas da mesma maneira que as SIFs com biocatalisadores com carbonato de Cálcio a pH 5,6 e temperaturas 32, 27 e 40°C.

### **3.4 Fermentações de xilose e de xarope de xilulose**

#### *Produção da solução xilose/xilulose na proporção inversa ao equilíbrio de isomerização*

O xarope de xilulose foi produzido a partir de uma solução de 700g/L de xilose,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 mM solubilizados em tampão Fosfato 50 mM a pH 7,0. A reação de isomerização era iniciada com a adição de xilose isomerase imobilizada em quitosana, na concentração de  $5\text{g} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ , sob agitação e a 68 C. Amostras eram retiradas para verificar a proporção de xilose/xilulose e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna Aminex HPX87-C, a 80°C, água Milli-Q como efluente com vazão de  $0.6\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , detector índice de refração. Quando valores constantes de xilose e xilulose alcançaram a proporção de equilíbrio e se mantiveram constantes, o meio reacional foi filtrado sob vácuo para separação da enzima. A solução obtida foi reduzida a um terço de seu volume utilizando-se um rotaevaporador a 45°C e posteriormente diluída quatro vezes em etanol P.A. Em etanol a solução foi resfriada a 4°C e, por diferença na solubilidade em etanol a baixas temperaturas parte da xilose precipitou, podendo ser separada da xilulose dissolvida

por filtração sob vácuo (CHIANG et al, 1981b). A solução etanólica foi armazenada em geladeira e ainda filtradas algumas vezes, quando surgia corpo de fundo.

A proporção xilose/xilulose na solução após inversão com etanol foi 35:65, muito próxima a produzida no trabalho de Chiang et al.(1981b), 33:67, sendo melhorada com as sucessivas filtrações da xilose que precipitava durante o período de armazenamento em geladeira, até 13:87.

Para a utilização como substrato na fermentação o etanol foi evaporado em rotaevaporador, resultando em um xarope viscoso de xilulose.

#### *Fermentações com biocatalisador*

Foram realizadas fermentações com biocatalisadores que continham apenas e levedura e  $\text{CaCO}_3$  imobilizada no alginato de cálcio. A concentração celular foi de  $50 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  de levedura Itaiquara<sup>®</sup> correspondendo a 10% do pellet. Como substratos analisados foi utilizado xilose, na mesma concentração utilizada para as SIFs ( $65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose), e um xarope de xilulose, com concentração aproximada de  $58 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilulose e  $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose. As condições de operação, composição do meio, pH, temperatura, e as de análises, foram iguais às empregadas para as SIFs em presença do carbonato.

#### *Fermentações com células livre*

Essas fermentações foram realizadas com a mesma concentração que as fermentações com biocatalisadores,  $50 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  não imobilizadas. Como substratos foram utilizados três composições diferentes: apenas xilose, xilose mais etanol e xilose, xilulose mais etanol. O meio de saís utilizado foi o mesmo empregado para as SIFs, contudo a diluição decorrente da mistura do meio com a levedura de panificação é menor, considerando que em média a levedura tem 67% de umidade, a diluição será em média de 1,2. As soluções que continham xilose e xilose e etanol tinham concentração inicial de xilose  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . O meio da fermentação que iniciou com etanol continha  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Do xarope contendo xilulose e xilose foi preparada uma solução com aproximadamente 80 e  $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente. Com esta solução foi realizada uma fermentação, desta vez utilizando tubos de 2,5mL fechados, cada tubo representando um ponto. As condições foram as mesmas das demais fermentações. Foi realizado também a diluição dessa solução mãe duas e quatro vezes, obtendo assim concentrações decrescentes de substrato.

### 3.5 Cálculos dos parâmetros estudados

*Conversão (%)*: é a concentração de açúcar consumida ( $S_i - S_r$ ) dividida pela concentração inicial ( $S_i$ ) vezes 100.

$$\text{Conversão}(\%) = \frac{S_i - S_r}{S_i} \times 100$$

Onde:  $S_i$  - concentração de substrato inicial,  $S_r$ - concentração de substrato residual quantificado no meio.

Os parâmetros como os rendimentos, produtividade, seletividade foram calculados nos tempos onde a conversão era próxima a 95% ou quando havia maiores produtividades ou ainda ao final do ensaio.

*Rendimento (Y)*: é a concentração de produto (etanol ou xilitol) dividida pela concentração de xilose inicial, expressa em  $\text{g.g}^{-1}$ .

$$Y_p = \frac{C_p}{S_i}$$

Onde:  $C_p$  - concentração de produto (etanol ou xilitol).

*Rendimento metabólico ( $Y_{met}$ )*: é a concentração de etanol dividida pela concentração de açúcar consumida, expressa em  $\text{g.g}^{-1}$ .

$$Y_{met} = \frac{C_E}{S_i - S_r}$$

Onde:  $C_E$  - concentração de etanol.

*Rendimento específico ( $Y_{esp}$ )*: é a concentração de etanol dividida pela massa de células em base seca, expressa em  $\text{g.g}_{ms}^{-1}$ .

$$Y_{esp} = \frac{C_E}{C_x}$$

Onde:  $C_x$  - massa celular em base seca.

*Velocidade de assimilação específica ( $Ass_{esp}$ )*: é a concentração de açúcar consumido por grama de massa seca celular por hora, expressa em  $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

$$Ass_{esp} = \frac{S_i - S_r}{C_x \cdot t}$$

*Produtividade (Pr)*: é a concentração de produto dividida pelo tempo, expressa em  $\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ .

$$Pr = \frac{Cp}{t}$$

Onde: t - instante de tempo.

*Seletividade*: é a concentração de etanol dividida pela concentração de xilitol.

$$Seletividade = \frac{C_E}{C_{XOH}}$$

Onde:  $C_{XOH}$  - concentração de xilitol.

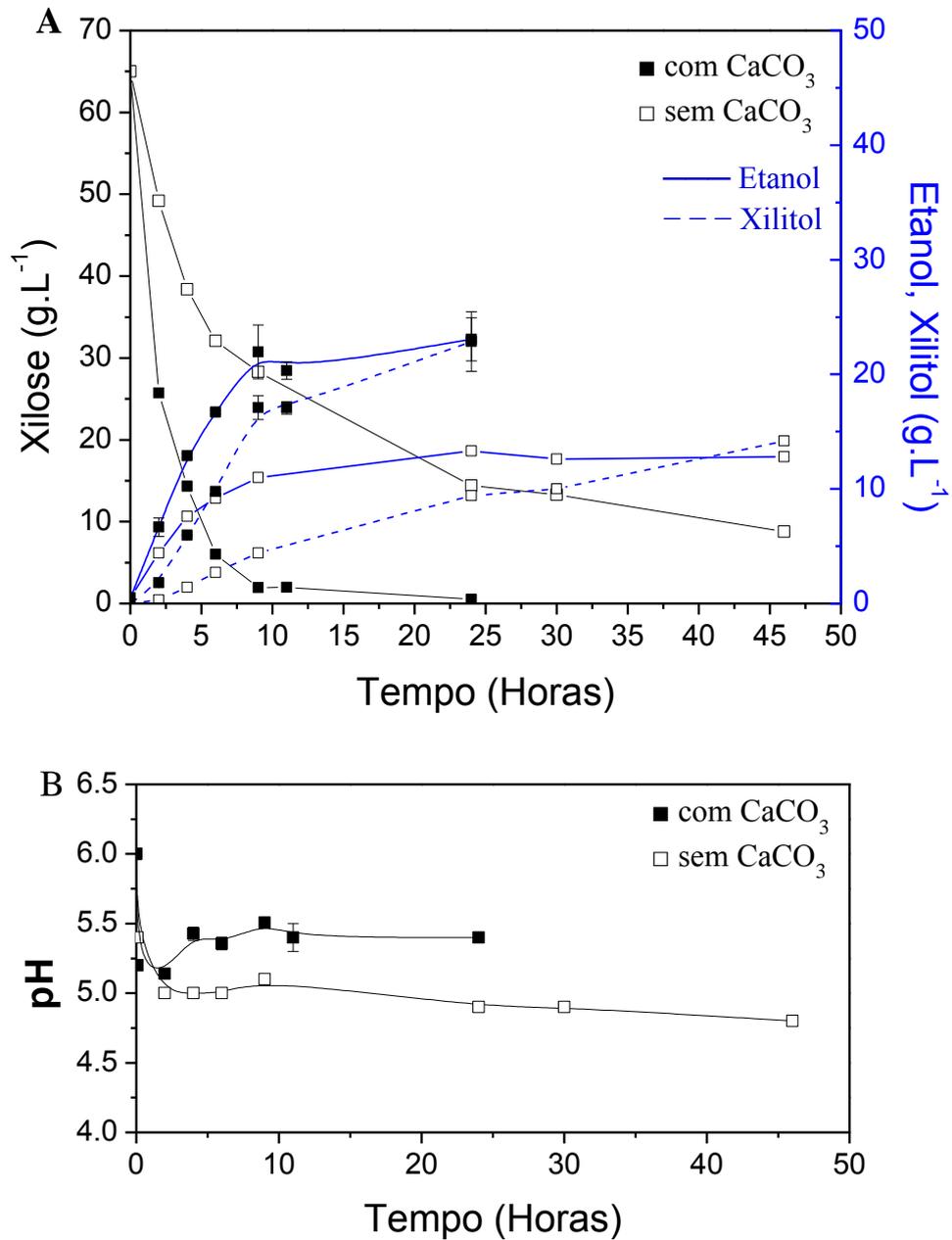
## 4 Resultados e discussão

### 4.1 SIF e controle do pH

A realização de simultânea isomerização e fermentação de xilose a etanol requer busca de condições operacionais adequadas para viabilizar o processo. Neste trabalho, foram utilizados biocatalisadores contendo enzima e levedura imobilizadas em alginato de cálcio. A imobilização permite utilizar alta concentração de enzima e levedura no reator, melhorando as condições do processo já que nenhuma das reações está operando em suas condições ideais. A queda do pH durante a reação, que sempre ocorre na fermentação (GONG et al., 1981), a menor afinidade da levedura por xilulose, relativamente à glicose, e a inibição da enzima por xilitol (YUAN et al, 2012) são fenômenos que conhecidamente dificultam o esgotamento da xilose no processo SIF.

Assim, variáveis que possivelmente afetarão o processo são as concentrações de enzima e levedura no reator, o pH, a temperatura e a linhagem da levedura utilizada e serão, portanto, investigadas neste trabalho. Os primeiros biocatalisadores testados continham apenas enzima e levedura coimobilizados em alginato de cálcio, e foram testados em SIF de xilose  $65 \text{ g.L}^{-1}$  inicial, pH inicial do meio reacional 6, temperatura de  $35^\circ\text{C}$ . A xilose foi isomerizada a xilulose, que foi consumida, com conversão de 86% em 46 horas (Figura 10-A), sendo os principais produtos formados o etanol e o xilitol. A viabilidade celular se manteve acima de 90% nos ensaios mesmo após 48 horas de reação. Silva e col. (2012), testando a viabilidade desses biocatalisadores observaram a isomerização da xilose a xilulose e o consumo desta, com conversão de 75,4% em 48 horas. As maiores taxas de consumo e produção aconteceram nas primeiras 10 horas de ensaio, observando-se ocorrer queda do pH a valores inferiores a 5 (Figura 10-B). A queda do pH é observada na fermentação de xilulose assim como na de glicose (GONG et al, 1981), e como a enzima XI abaixo de pH 5 tem atividade quase nula, a etapa de isomerização se torna limitante no processo, independente da carga enzimática utilizada. Outro problema decorrente da queda do pH é a inibição mais acentuada da XI por xilitol, que é produzido durante a fermentação.

**Figura 10** SIFs realizadas com catalisadores com e sem  $\text{CaCO}_3$  coimobilizados. Concentrações semelhantes de levedura e enzima no reator ( $80$  e  $85 \text{ g}_{\text{ms}} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$  e  $30 \cdot 10^3 \text{ UI} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ ). (A) Substrato e produtos da SIFs de  $65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de xilose inicial a  $35^\circ\text{C}$ ,  $150 \text{ rpm}$ . (B) pHs medidos durante as SIFs.



Controlar o pH da SIF durante o processo (GONG et al, 1981), utilização de azida (HAHN-HIIGERDAL, BERNER; SKOOG, 1986) ou abordar soluções inovadoras (YUAN et al, 2012) são importantes para viabilizar a isomerização juntamente com a fermentação.

Neste trabalho, a estratégia utilizada para controle de pH no processo foi incorporar carbonato de cálcio ao biocatalisador. As Figuras 10-A e B mostram como esse procedimento permitiu a manutenção do pH acima de 5, com conseqüente altas velocidades de consumo de xilose e de produção de etanol, mais de 90% de consumo do açúcar em 9 horas.

As SIFs passaram a ser realizadas então com a incorporação do carbonato de cálcio no biocatalisador final e, conforme poderá ser visto pelos resultados a serem apresentados nos itens posteriores, foi sempre possível manter o pH estável entre 5,1 e 5,6.

Comparando-se dois ensaios, com e sem  $\text{CaCO}_3$  (Figura 10) com a mesma concentração enzimática,  $30 \cdot 10^3 \text{ U.L}^{-1}_{\text{reator}}$ , e concentrações celulares semelhantes, 80 e 85  $\text{g}_{\text{ms}} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ , fica clara a importância de se manter o controle do pH no processo. A estratégia foi eficiente para controle do pH e nota-se grande diferença no rendimento, produtividade, seletividade e no tempo de conversão (Tabela 7) dos dois processos, sempre sendo vantajoso o processo com  $\text{CaCO}_3$ .

Os principais produtos nas duas fermentações foram o etanol e o xilitol, com formação de ácido acético e glicerol em baixas concentrações, abaixo de  $4 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Embora a produção de etanol seja favorecida, a produção de xilitol também aumenta com o aumento da conversão do substrato. Tanto a produtividade como o rendimento em xilitol também aumentam bastante, sendo iguais, no final dos ensaios, as concentrações de etanol e xilitol.

A produção de etanol a partir de xilulose em condições fermentativas tem rendimento próximo do teórico com linhagens de *S. cerevisiae*, contudo parte pode ser desviada para a produção de xilitol (GONG et al., 1981, CHIANG et al., 1981a, HAHN-HIIGERDAL, BERNER; SKOOG, 1986). Os rendimentos em xilitol citados na literatura são baixos quando a fermentação utiliza xilulose como substrato, cerca de  $0,1 \text{g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$ , sendo maiores em presença de xilose (GONG et al., 1981), sugerindo que embora possa ser produzido a partir da xilulose, sua maior formação se deve à xilose. Em contraponto, o consumo de xilose em condições anaeróbicas é muito baixo. A enzima XDR, que oxida o xilitol a xilulose com afinidade pelo cofator  $\text{NAD}^+$ , tem também atividade no sentido inverso, ou seja, reduzindo a xilulose a xilitol, oxidando o cofator NADH (RIZZI et al., 1989). Dessa maneira, dependendo dos fluxos metabólicos celulares, a levedura pode excretar xilitol mesmo sendo xilulose o substrato.

**Tabela 7** Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial ( $S_i=65\text{g.L}^{-1}$ ) a  $35\text{ }^\circ\text{C}$  e  $150\text{ rpm}$ , catalisada por xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído (IXI-Ch) e *S. cerevisiae* linhagem de panificação Itaquara<sup>®</sup> (em  $\text{g}_{\text{ms}}$ - grama em massa seca) coimobilizadas em alginato de cálcio, e nas fermentações de xarope de xilulose ( $58\text{g.L}^{-1}$  –xilulose,  $9\text{g.L}^{-1}$  –xilose) e de xilose ( $65\text{g.L}^{-1}$ ), biocatalisador sem IXI-Ch. T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade.

Ensaio	Levedura		Enzima		T (h)	Conversão (%)	$\text{pH}_i\text{-pH}_f$	Y E/Si ( $\text{g.g}^{-1}$ )	Y X/Si ( $\text{g.g}^{-1}$ )	Pr E ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Pr X ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Seletividade
	%em massa	$\text{g.L}^{-1}$ reator	%em massa	UI.L <sup>-1</sup> reator								
1	16	80	5	$30.10^3$	46	86	5.4-4.8	0.20	0.22	0.28	0.31	0.90
2	17	85	5	$30.10^3$	9	96	5.6-5.4	$0.34 \pm 0.04$	$0.26 \pm 0.02$	$2.44 \pm 0.26$	$1.9 \pm 0.12$	$1.28 \pm 0.07$
3	5	25	20	$120.10^3$	24	97	5.6- 5.5	$0.24 \pm 0.01$	$0.12 \pm 0.01$	$0.67 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.04$	$2.02 \pm 0.36$
4	10	50	5	$30.10^3$	9	94	5.6-5.4	$0.28 \pm 3 \times 10^{-3}$	$0.18 \pm 0.01$	$2.01 \pm 0.02$	$1.33 \pm 0.04$	$1.51 \pm 0.03$
5	10	50	10	$60.10^3$	11	99	5.6-5.4	$0.34 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.02$	$2.04 \pm 0.12$	$0.81 \pm 0.17$	$2.57 \pm 0.4$
6	10	50	20	$120.10^3$	11	96	5.4-5.4	$0.35 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.01$	$2.07 \pm 0.17$	$0.85 \pm 0.06$	$2.42 \pm 0.01$
7	10	50		Xilulose ( $58\text{g.L}^{-1}$ )	5	97	4.8-5.1	$0.23 \pm 3 \times 10^{-3}$	$0.24 \pm 8 \times 10^{-3}$	$2.76 \pm 0.03$	$2.84 \pm 0.09$	$0.97 \pm 0.03$
8	10	50		Xilose ( $9\text{g.L}^{-1}$ )	48	17		0.01	0.04	0.01	0.05	0.27

Nota: \* SIF realizada sem adição de  $\text{CaCO}_3$ .

**Tabela 8** Parâmetros fisiológicos do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial ( $S_i=65\text{g.L}^{-1}$ ) a  $35\text{ }^\circ\text{C}$  e  $150\text{ rpm}$ , catalisada por xilose isomerase (Enz) imobilizada em quitosana-glutaraldeído e *S. cerevisiae* linhagem de panificação Itaiquara<sup>®</sup> (em  $\text{g}_{\text{ms}}$ - grama em massa seca) coimobilizadas em alginato de cálcio, e nas fermentações de xarope de xilulose ( $58\text{g.L}^{-1}$  –xilulose,  $9\text{g.L}^{-1}$  –xilose) e de xilose ( $65\text{g.L}^{-1}$ ), biocatalisador sem IXI-Ch. T: tempo,  $Y E_{\text{metabol}}$ : rendimento metabólico,  $Y E_{\text{esp}}$ : rendimento específico,  $Ass_{\text{esp}}$ : Velocidade específica de assimilação.

Ensaio	Levedura %em massa	Enzima %em massa	E/L	T (h)	Conversã o	$Y E_{\text{metabol}}$ ( $\frac{\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{Siconsumido}}^{-1}}{1}$ )	% Y E teórico	$Y E_{\text{esp}}$ ( $\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{ms}}^{-1}$ )	$Ass_{\text{esp}}$ ( $\text{g}_{\text{Siconsumido}} \cdot \text{g}_{\text{ms}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Seletividade
1	16	5	0.31	46	86%	0.23		0.16	0.015	0.90
2	17	5	0.29	9	96%	$0.35 \pm 0.04$		$0.26 \pm 0.02$	0.08	$1.28 \pm 0.07$
3	5	20	4.00	24	97%	$0.25 \pm 9 \times 10^{-3}$		$0.34 \pm 0.05$	0.105	$2.02 \pm 0.36$
4	10	5	0.50	9	94%	$0.29 \pm 0.01$		$0.36 \pm 4 \times 10^{-3}$	0.14	$1.51 \pm 0.03$
5	10	10	1.00	11	99%	$0.36 \pm 0.01$		$0.45 \pm 0.03$	0.12	$2.57 \pm 0.4$
6	10	20	2.00	11	96%	$0.35 \pm 0.03$		$0.46 \pm 0.04$	0.12	$2.42 \pm 0.01$
7	10		Xilulose	5	97%	$0.24 \pm 2 \times 10^{-3}$		$0.27 \pm 3 \times 10^{-3}$	0.23	$0.97 \pm 0.03$
8	10		Xilose	48	17%	0.06			4.10-3	0.27

\* SIF realizada sem adição de  $\text{CaCO}_3$ .

O biocatalisador apresentado por Silva et al. (2012) não possuía o carbonato de cálcio e a queda do pH foi apontada como a causa da baixa conversão, entretanto a SIF, que ocorreu nas mesmas condições que as apresentadas aqui, foi encerrada com 48 horas tendo a concentração de etanol superior à de xilitol. Como diferencial, esse biocatalisador era composto por enzima/levedura na proporção 1,5 quanto à composição do pellet, já os presentes ensaios tem proporção enzima/levedura de aproximadamente 0,3. Esses indicativos direcionaram os estudos para encontrar a melhor concentração dos agentes biológicos no reator.

#### **4.1.1 Conclusões**

Ensaio preliminar de simultânea isomerização e fermentação de xilose mostrou que pH inicial vai diminuindo com o avanço do processo devido a geração de ácidos, reduzindo atividade enzimática e tornando necessário o controle dessa variável. A estratégia desenvolvida no grupo para isso foi a coimobilização no gel também de carbonato de cálcio, 0,5-1%, que se mostrou eficiente, mantendo o pH acima de 5, o que permitiu conversão de xilose acima de 90% em 9 horas, e passou a ser utilizada na continuidade deste trabalho. Passou-se a seguir a estudar as influências das concentrações de enzima e levedura no reator no desempenho do processo SIF.

#### **4.2 Influência da concentração de enzima e levedura no reator no desempenho do processo SIF**

Ensaio anteriores realizados neste grupo, com biocatalisadores sem  $\text{CaCO}_3$ , indicavam que variações nas velocidades de isomerização e fermentação poderiam melhorar a seletividade em etanol. Com a modificação na proporção enzima/levedura é possível variar a quantidade de xilulose disponibilizada pela reação de isomerização, conseqüentemente influenciando a fermentação. Embora não fosse possível fazer afirmações definitivas, já que havia acentuada queda de pH nesses ensaios, desativando a enzima, SIFs realizadas com biocatalisadores com alta proporção enzima/levedura pareciam conduzir a melhores seletividades em etanol. As concentrações de enzima e levedura no reator eram variadas mudando-se a massa de IXI-Ch (gel de quitosana contendo enzima imobilizada) e levedura por grama de solução de alginato de sódio mantendo-se fixas as proporções 1:1 massa de biocatalisador:volume de meio no reator. Havia um limite físico no processo de coimobilização, sendo possível produzir biocatalisadores com no máximo 17% de levedura,

quando apenas 5% de enzima era empregado, e biocatalisadores com no máximo 38% de enzima, quando 4% de levedura era usada. Foram testadas as concentrações (%Levedura-Enzima no biocatalisador): 5-20, 17-5 e 10 levedura (Itaiquara<sup>®</sup>) com 5, 10 e 20% enzima.

Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 11 e 12 e Tabelas 7 e 8.

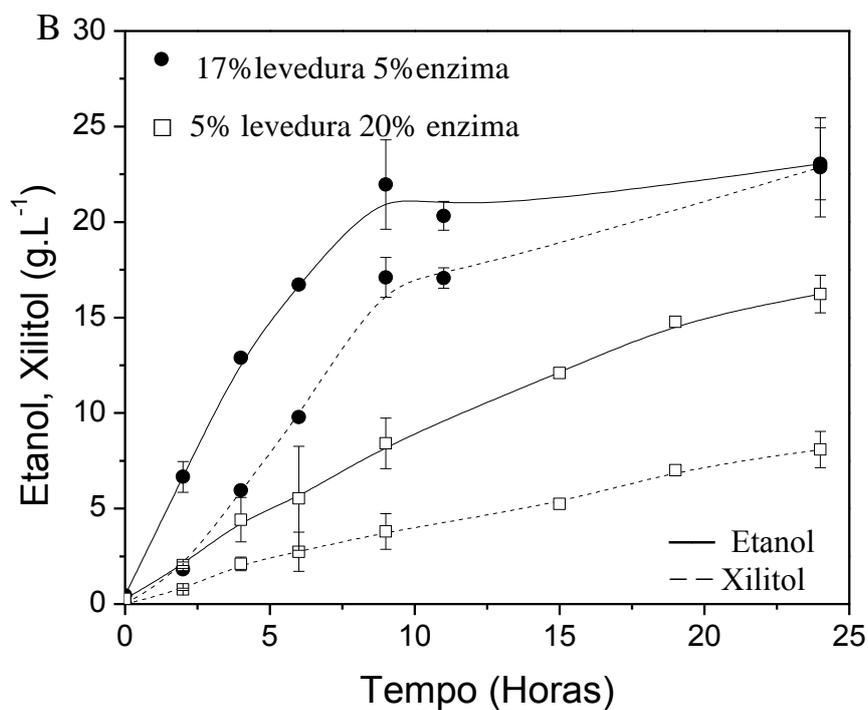
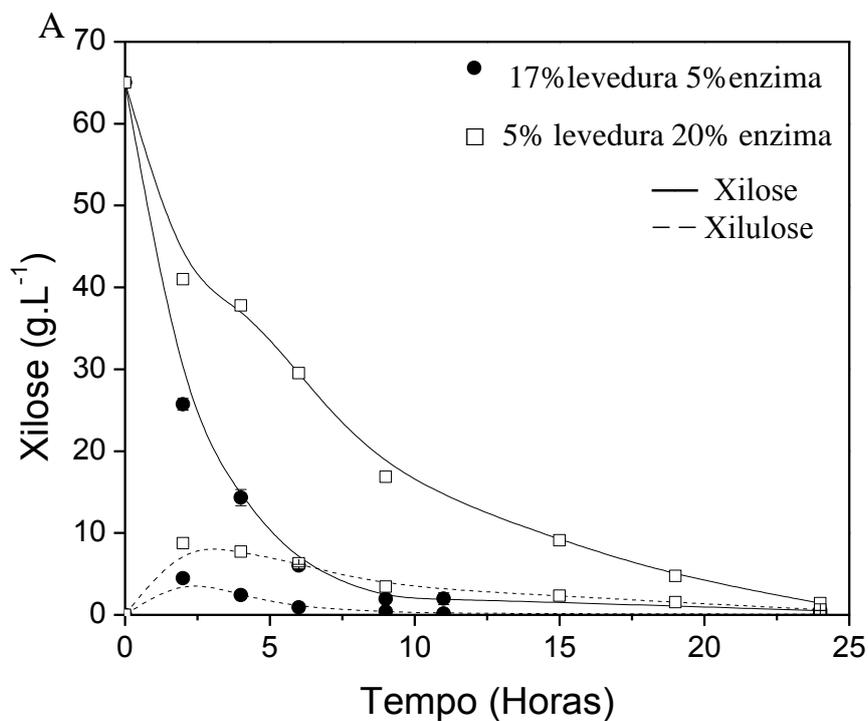
Neste trabalho, as SIFs realizadas com biocatalisadores contendo  $\text{CaCO}_3$  tiveram o pH estável, entre 5,1 e 5,6 durante todo o processo. As conversões alcançaram cerca de 95% em 9 horas, com produção principalmente de etanol e xilitol.

A utilização da xilose por leveduras é lenta e escolher altas cargas celulares aumenta a produtividade do processo (CHIANG et al., 1981 a). Na SIF com a maior carga de levedura,  $85 \text{ g}_{\text{ms}} \cdot \text{L}^{-1}$  reator (Ensaio 2), em 9 horas mais de 95% de açúcar havia sido convertido, enquanto que com a menor concentração,  $25 \text{ g}_{\text{ms}} \cdot \text{L}^{-1}$  reator (Ensaio 3), essa mesma conversão levou mais de 20 horas (Figura 11). Além de apresentar maior produtividade, a SIF contendo maior carga de levedura também tem maior rendimento em etanol (Tabela 7),  $0,34 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose inicial}}^{-1}$ , contudo menor seletividade (produz xilitol quase na mesma proporção que etanol  $S=1,28$ ).

Esses biocatalisadores, contendo alta e baixa concentração de células, possuíam composição invertida quanto à concentração de enzima, resultando em proporções enzima/levedura quase inversas (ver Tabela 7). Enquanto a SIF carregada com biocatalisadores com proporção enzima/levedura menor que um (Ensaio 2) convergiu na produção de etanol e xilitol, a com proporção enzima/levedura maior que um (Ensaio 3) tende a divergir nas concentrações desses produtos, produzindo menos xilitol.

A soma de glicerol e ácido acético é pequena, inferior a 10% da concentração dos produtos totais, em todos os testes com  $\text{CaCO}_3$  resultando então, em menor recuperação de carbono nos produtos medidos com a menor carga celular, onde o rendimento em etanol foi menor e a produção de xilitol também.

Figura 11 SIFs de  $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose inicial a  $35^\circ\text{C}$ , 150 rpm realizadas com biocatalisadores com proporção enzima/levedura menor e maior que um, alta ( $85 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$  e  $30\cdot 10^3 \text{ UI}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reator}}$ ) e baixa ( $25 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}_{\text{reator}}^{-1}$  e  $120\cdot 10^3 \text{ UI}\cdot\text{L}^{-1}_{\text{reator}}$ ) concentração de levedura no reator, respectivamente. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados nas fermentações.



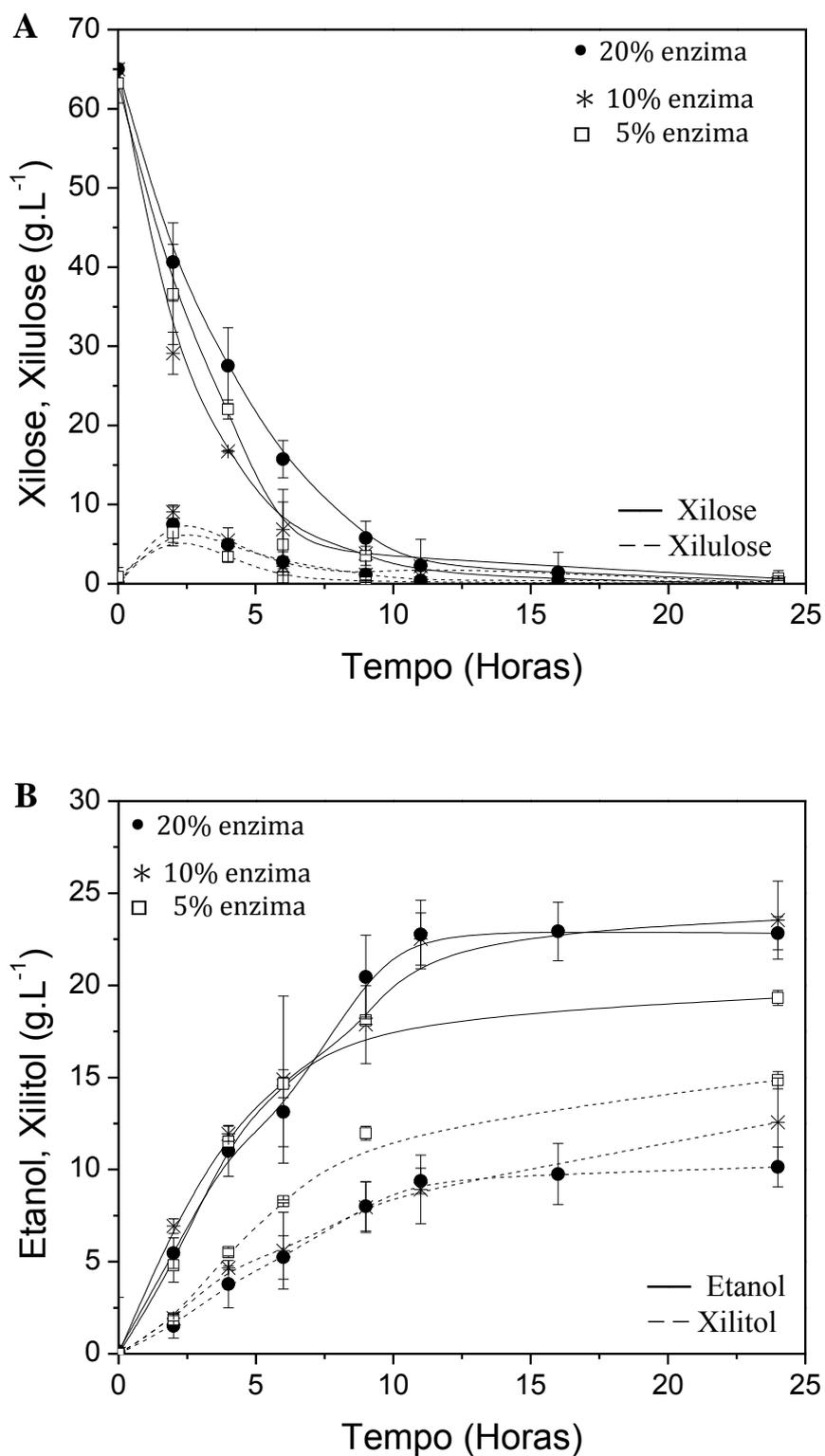
A quantidade de  $30 \cdot 10^3 \text{UI} \cdot \text{L}_{\text{reator}}^{-1}$ , equivalente a 5% de enzima no pellet, a menor concentração testada, foi suficiente para isomerizar xilose a xilulose em altas quantidades possibilitando que a mais alta concentração de levedura testada atingisse a maior produtividade máxima ( $3,35 \text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Considerando que *S. cerevisiae* principalmente consome xilulose, pode-se, somando a quantidade de açúcar consumido com a quantidade de xilulose residual, calcular a quantidade aproximada de xilose isomerizada a xilulose.

Na SIF com concentração celular alta e enzimática baixa,  $39 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de xilose foram isomerizadas nas primeiras duas horas, já na SIF com quatro vezes mais enzima e baixa concentração celular não foi isomerizada nem a metade desse valor no mesmo período. O processo está, portanto, limitado pela atividade celular. Sem consumo da xilulose, como a isomerização atinge equilíbrio, a isomerização para mesmo com altas concentrações de enzima.

Acima de  $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de açúcares, na SIF com biocatalisador com proporção enzima/levedura menor que um (Ensaio 2- alta concentração celular), a relação xilose/xilulose se manteve ligeiramente acima da relação de equilíbrio da reação de isomerização (5/1), significando esse excedente de xilose uma limitação do processo pela isomerização. Com a proporção enzima/levedura maior que um (Ensaio 3) a relação xilose/xilulose não excede 5/1, indicando que aquela quantidade de células assimila o substrato isomerizado pela enzima, mas contribui mais fracamente para o deslocamento do equilíbrio enzimático, pois, diferentemente do caso anterior, a xilulose não está em concentrações abaixo do equilíbrio.

Embora a SIF com proporção enzima/levedura maior que um tenha maior seletividade, a concentração celular avaliada foi muito baixa, prejudicando a produtividade e até o rendimento em etanol. Foram, testadas, por isso novas proporções. A quantidade celular foi então dobrada, correspondendo a 10% do pellet ( $50 \text{g}_{\text{ms}} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e concentrações crescentes de enzima foram avaliadas, 5%, 10% e 20% do pellet (Figura 12).

Figura 12 SIFs de  $65\text{g.L}^{-1}$  de xilose inicial a  $35^\circ\text{C}$ , 150 rpm realizadas com biocatalisadores dos ensaios 4, 5 e 6 (10% de levedura). (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados.



A produtividade em etanol aumentou, sendo igual para os três ensaios, e a conversão próxima a 95% foi obtida em torno de 9 horas (Tabela 7). Novamente foi possível observar que maiores proporções enzima/levedura favoreciam a produção de etanol, aumentando a seletividade com o aumento da concentração de enzima. A concentração de xilitol, embora possa ser reduzida com a modificação nas taxas de fermentação e isomerização, não foi eliminada do processo.

A concentração enzimática influenciou quando foi aumentada de 5% para 10 e 20%, quando a proporção enzima/levedura é igual e maior que um. É necessário avaliar a necessidade da utilização de quantidades elevadas de enzima considerando seu alto custo, porém esse estudo visa encontrar condições ideais para o processo SIF em reatores contínuos, onde a alta concentração enzimática é requerida para operação em longos períodos, sendo o biocatalisador com 10% de levedura e 20% de enzima o escolhido para os estudos seguintes.

O rendimento metabólico, rendimento em etanol calculado com a concentração de substrato consumido e não com o substrato inicial, foi semelhante ao rendimento em etanol, isso porque foram escolhidos pontos com alta conversão (acerca de 95%). O rendimento específico, isto é, rendimento em etanol calculado dividindo-se a produção de etanol pela massa seca de leveduras utilizada no ensaio, foi menor para a SIF com maior massa seca empregada. Aumentando-se a massa de enzima no biocatalisador, de 5% para 10 e 20%, aumentou-se a seletividade e o rendimento específico.

Esses resultados parecem indicar que maior a disponibilidade de xilulose mais alta a seletividade em etanol e estão de acordo com os obtidos por Yuan et al (2012), que demonstrou, realizando SIF com reatores de leito fixo, contendo enzima XI coimobilizada com urease, e de fibra oca, contendo levedura, ligados em série, que quanto mais xilulose inicial disponibilizada menos xilitol seria formado, conseguindo rendimento teórico quando empregou apenas levedura na fermentação de xarope contendo 21 e 9g.L<sup>-1</sup> de xilulose e xilose, respectivamente.

Decidiu-se assim, também testar esta hipótese neste trabalho. Xilulose não é disponível comercialmente como substrato. Foi desenvolvido no grupo estratégia de preparação de um xarope com concentração inicial de xilulose semelhante à concentração inicial de xilose empregada nas demais SIF e presença de xilose abaixo de 10g.L<sup>-1</sup>. O biocatalisador continha apenas levedura e CaCO<sub>3</sub>.

#### 4.2.1 Influência da concentração de xilulose na seletividade etanol/xilitol durante fermentação por *S. cerevisiae*.

Os perfis de consumo de açúcares e geração de produtos das fermentações dos açúcares sem a reação de isomerização, com o biocatalisador apenas contendo a levedura, são mostrados na Figura 13. Foi realizada uma fermentação apenas de xilose e de uma solução contendo uma concentração sete vezes mais alta de xilulose que de xilose. As condições utilizadas foram as mesmas para os demais processos SIF com controle de pH, exceto pela concentração inicial modificada no xarope de xilulose.

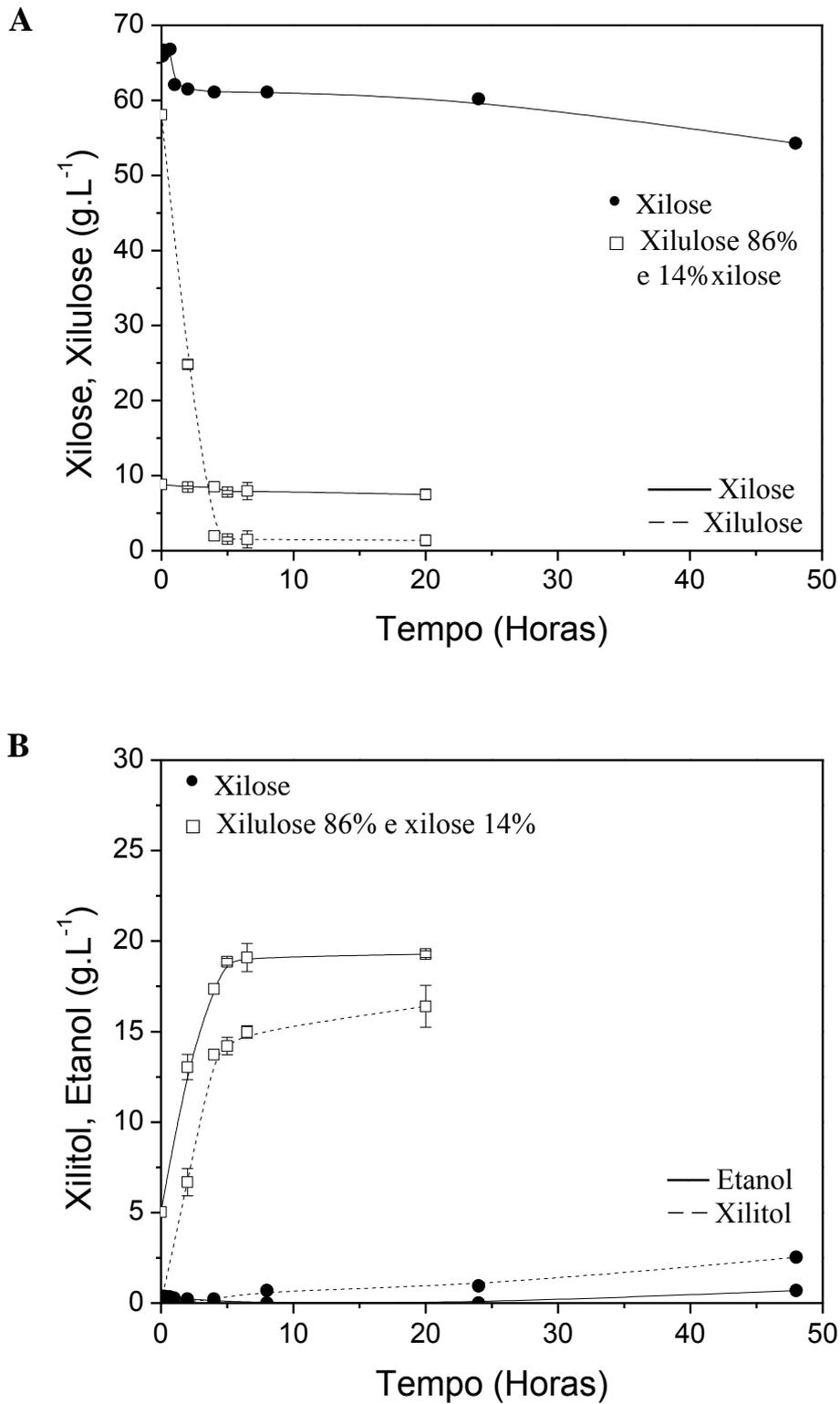
Observa-se, na Figura 13, que quando xilose é o único substrato, ocorre a utilização de apenas 17% deste em 48 horas, com produção de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  xilitol ( $0,22 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$ ) e quantidades muito reduzidas de etanol, glicerol e ácido acético (valores inferiores a  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). A assimilação de xilose por linhagens de *S. cerevisiae* é mesmo baixa em condições restritas de oxigenação (LEBEAU, JOUENNE; JUNTER, 1997; HAHN-HIIGERDAL, BERNER; SKOOG, 1986). A xilose presente no xarope de xilulose também foi pouco convertida (15% em 20 horas) enquanto aproximadamente  $58 \text{ g.L}^{-1}$  de xilulose (açúcar inicial) foi consumida em cinco horas. O principal produto da fermentação da xilulose foi o etanol,  $0,23 \pm 3 \times 10^{-3} \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$ , seguido do xilitol,  $0,24 \pm 3 \times 10^{-3} \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$ .

Diferentemente do inicialmente pensado, a produção de xilitol é resultado da fermentação da xilulose e não apenas da xilose, uma vez que o pequeno consumo desse substrato não explica a quantidade de xilitol formada.

Também contrariamente ao esperado, a seletividade não aumenta diretamente com o aumento da concentração de xilulose. Embora todos os ensaios anteriores, e os de Yuan et al, 2012, indicassem que maior a concentração de xilulose mais alta a seletividade etanol/xilitol, parece que outros fatores controlam essa rota metabólica, o que já deveria ser esperado. Buscou-se assim, correlacionar a seletividade com algum outro parâmetro do processo.

Analisando-se a Tabela 7 observa-se que as menores seletividades, para os ensaios com  $\text{CaCO}_3$ , são as do Ensaio 2, proporção enzima/levedura menor que um e do 7, ensaio com xarope de xilulose. Esses dois ensaios possuem as mais altas taxas de conversão no início do processo, consumindo altas concentrações de açúcar, enquanto nos outros ensaios esse consumo é menos acentuado (Tabela 9).

Figura 13 Fermentação de xilose e de xarope de xilulose nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 35°C, pH 5,6, 150rpm, levedura 50 gms.L<sup>-1</sup> reator, biocatalisadores sem XI. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados nas fermentações.



**Tabela 9** Assimilação de açúcar por hora (Ass) e assimilação específica de açúcar ( $Ass_{esp}$ ) no processo SIF  $65g.L^{-1}$  de xilose inicial a  $35^{\circ}C$ , 150 rpm realizadas com biocatalisadores com diferentes concentrações de enzima e levedura e na fermentação de xilulose  $58g.L^{-1}$ .

T (h)	Ensaio 2 (17%Lev 5% enzima)		Ensaio 3 (5%Lev 20% enzima)		Ensaio 6 (10%Lev 20% enzima)		Ensaio 7 (10%Lev 20% enzima)		
	Ass ( $g.h^{-1}$ )	$Ass_{esp}$ ( $g.h^{-1}.g_{ms}^{-1}$ )	Ass ( $g.h^{-1}$ )	$Ass_{esp}$ ( $g.h^{-1}.g_{ms}^{-1}$ )	Ass ( $g.h^{-1}$ )	$Ass_{esp}$ ( $g.h^{-1}.g_{ms}^{-1}$ )	T (h)	Ass ( $g.h^{-1}$ )	$Ass_{esp}$ ( $g.h^{-1}.g_{ms}^{-1}$ )
2	17.40	0.20	7.64	0.31	8.06	0.16	2	16.80	0.34
4	12.07	0.14	4.88	0.20	8.03	0.16	4	14.25	0.29
6	9.68	0.11	4.87	0.19	7.72	0.15	5	11.44	0.23
9	6.97	0.08	4.97	0.20	6.45	0.13	7	8.67	0.17
11	5.72	0.07			5.19	0.10	20	2.85	0.06
24	2.68	0.03	2.62	0.10	2.69	0.05			

Nota: T: tempo

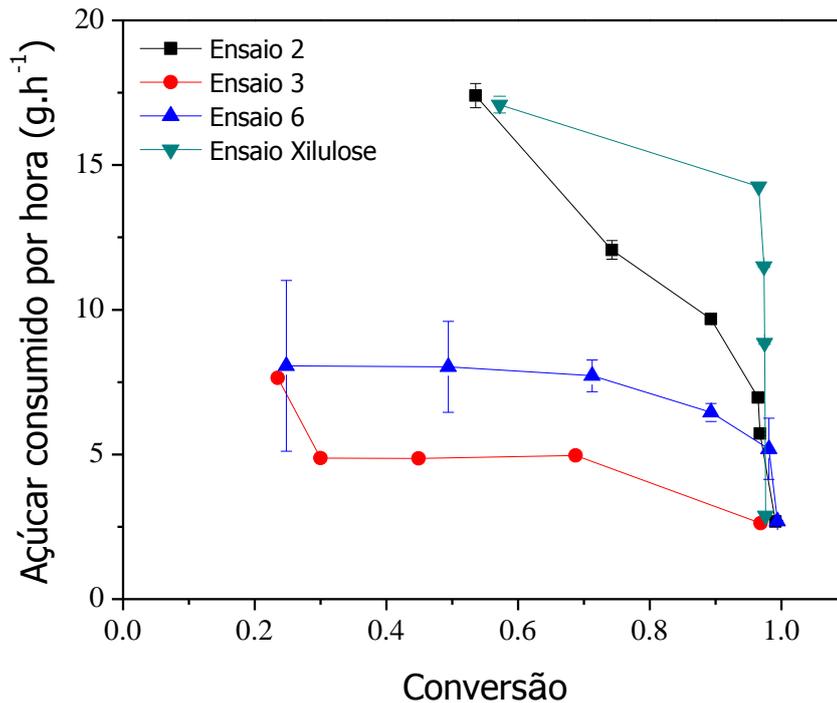
A rápida isomerização, ocasionada pela maior assimilação da xilulose na SIF com maior concentração de levedura, e a utilização de xilulose em alta concentração, disponível no xarope, levaram a altas produtividades, porém a baixa seletividade. Acredita-se que poderia ter ocorrido “over-flow” pois o fluxo de entrada da pentose deve ser mais alto do que aquele que a via pentose fosfato poderia metabolizar. Ocorrendo acúmulo de xilulose esta é retornada a xilitol, pela ação de xilitol desidrogenase- XDR (CHANG, GRIEST; 2007; RIZZI et al., 1989).

A concentração de açúcar consumida foi dividida pela concentração celular no reator e a velocidade específica para cada ensaio foi calculada para as SIFs 5% levedura e 20% enzima(Ensaio 2) e 17% levedura e 5% enzima (Ensaio 3) e para a fermentação de xilulose (Figura 14). A fermentação do xarope de xilulose teve a maior velocidade específica para as primeiras duas horas, e embora o baixo consumo de açúcar, a SIF com baixa concentração celular teve velocidade específica de consumo maior que a com alta concentração celular. Esse resultado foi contrário ao esperado, já que velocidades específicas semelhantes resultaram em efeitos contrários na seletividade. A seletividade em etanol claramente aumenta com a disponibilidade de xilulose, mas até uma determinada concentração. Acima desta, xilulose é transformada em xilitol para suprir as demandas redox da célula.

Em concordância, o experimento apresentado por Yuan et al. (2012), que utiliza xilulose em concentração 3 vezes inferior à deste trabalho, mostrou que é possível encontrar uma condição que não produza xilitol. Certamente, chegar a tão alta seletividade deve também depender da linhagem específica de levedura utilizada por esses autores, mas seus

resultados, em concordância com os obtidos neste trabalho, sinalizam que trabalhar com concentrações menores dessa pentose pode minimizar a formação de xilitol.

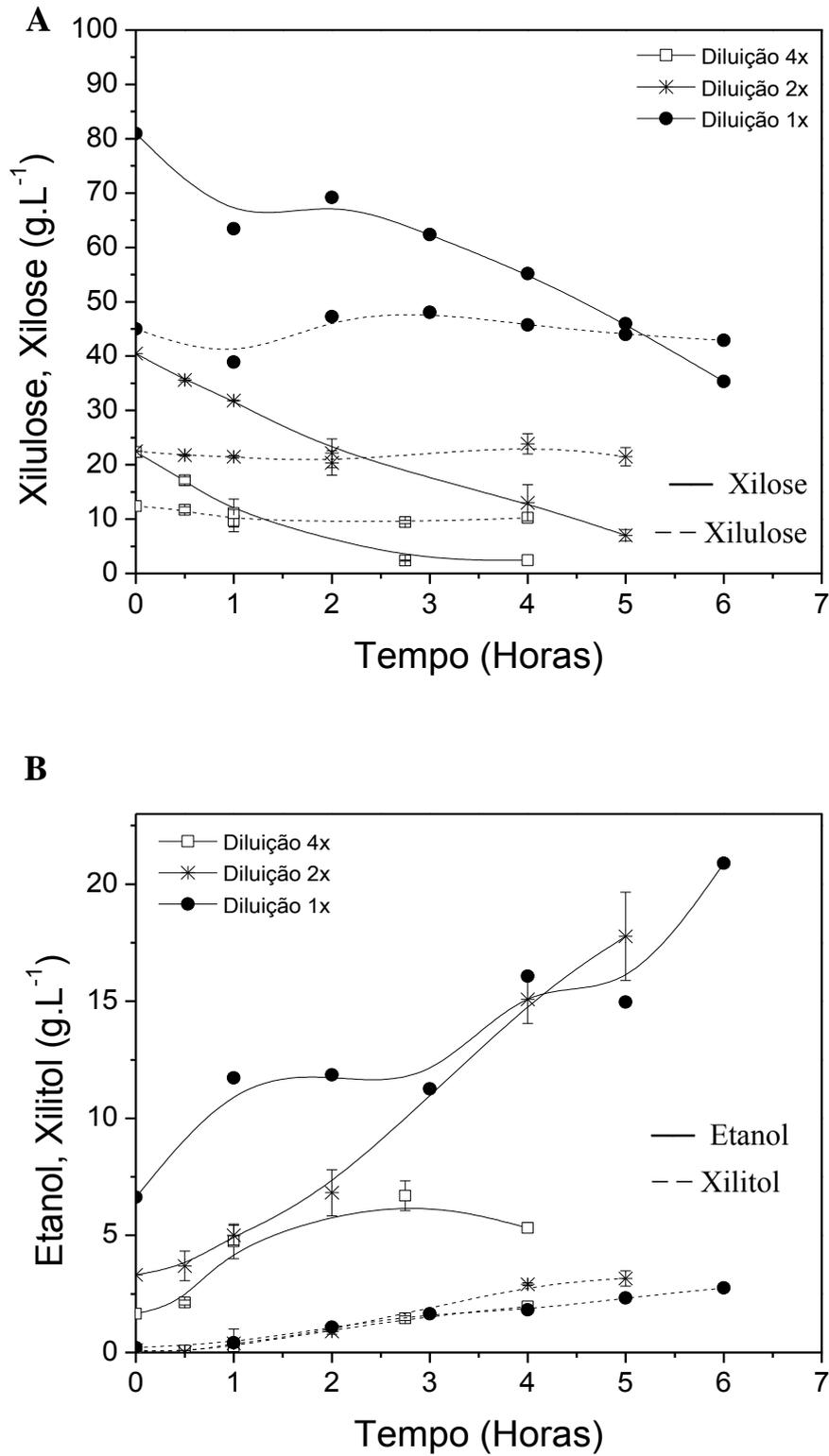
**Figura 14** Assimilação de açúcar por hora por conversão de substrato no processo SIF 65g.L<sup>-1</sup> de xilose inicial a 35°C, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com diferentes concentrações de enzima e levedura e na fermentação de xilulose 58g.L<sup>-1</sup>.



Nota: Ensaio 2 (17%Lev 5% enzima), Ensaio 3 (5%Lev 20% enzima), Ensaio 6 (10%Lev 20% enzima).

Outra abordagem então estudada neste trabalho, para tentar elucidar a resposta metabólica dessa levedura diante de diferentes concentrações de xilulose, foi a fermentação com células livres em tubos de 2,5mL. Uma solução contendo aproximadamente 80g.L<sup>-1</sup> de xilulose, 45g.L<sup>-1</sup> de xilose e 6g.L<sup>-1</sup> de etanol foi chamada de solução Diluição 1x e a partir dessa outras duas diluições foram feitas, 2 e 4 vezes, e com elas realizadas também fermentações (Figura 15). A fermentação com a solução diluída duas vezes foi realizada em triplicata enquanto a solução quatro vezes diluída em duplicata.

Figura 15 Fermentação de xaropes de xilulose com diferentes diluições, nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 32°C, pH 5,6, 150rpm, levedura livre 50 gms.L<sup>-1</sup> reator (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados nas fermentações.



Esse grupo de experimentos foi o último a ser realizado, sendo privilegiado nesse momento por ter sido realizado a 32°C, temperatura previamente testada e que possuía maior seletividade. Nesses ensaios aqui apresentados não houve consumo de xilose. A xilulose foi consumida, porém mais lentamente que observado na fermentação com a célula imobilizada, resultando em menores conversões (Tabela 10). A temperatura mais baixa não diminuiu esse parâmetro nas SIFs realizadas, portanto não justifica esse resultado. Estes ensaios, devido ao alto custo e dificuldade de obtenção da xilulose, foram realizados em tubos menores, de 2,5mL com 1mL de volume reacional. Pode ser que essa mudança conformacional não favoreceu a agitação necessária, prejudicando o consumo do substrato, além também da decantação das células livres. Nesse caso a oxigenação também sofre variação e como esse é um fator muito importante na fermentação, podemos relacionar a essa menor disponibilidade as menores conversões.

**Tabela 10** Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na fermentação de xaropes de xilulose com diferentes diluições. Levedura livre 50 gms.L<sup>-1</sup> reator.

Xilulose inicial -Si (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	Conversão	Y E/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Y X/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Pr E (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr X (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Seletividade
80	6	56%	0.18	0.03	2.38	0.46	5.18
40	5	83%	0.36 ± 0.05	0.08 ± 0.01	2.89 ± 0.38	0.63 ± 0.06	4.58 ± 0.6
20	2.75	88%	0.20 ± 0.05	0.07 ± 1x10 <sup>-3</sup>	1.48 ± 0.4	0.52 ± 0.01	2.84 ± 0.8

Nota: Y: rendimento, Pr : produtividade

Etanol e xilitol foram os principais produtos, sendo o melhor rendimento em etanol obtido na fermentação de 40g.L<sup>-1</sup> de xilulose, 0.36 ± 0.05 g.g<sup>-1</sup>. A fermentação com a mais alta concentração de xilulose teve baixo rendimento devido à baixa conversão, enquanto o rendimento baixo da fermentação com menor concentração de xilulose aconteceu decorrente do desvio para xilitol (menor seletividade), além de baixa recuperação do substrato nesses dois produtos analisados. Não foi observado o esperado, alta seletividade para a mais baixa concentração de xilulose, sendo possível verificar visualmente pelo gráfico que esse fenômeno é decorrente da igual produção de xilitol para os três ensaios, independente da concentração inicial de xilulose.

Outro fato interessante a ser ressaltado é a alta seletividade alcançada quando comparado com os resultados até então apresentados e mesmo com resultados conseguidos com Itaiquara<sup>®</sup> a 32°C (ver Tabela 12).

Fica claro, portanto, que para fermentações com esta levedura de panificação, apenas disponibilizar xilulose como substrato não garante alta seletividade, já que o metabolismo da

xilulose não é completamente conhecido em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, requerendo ainda estudos específicos para seu entendimento.

#### **4.2.2 Comparação entre fermentação de xilose por levedura imobilizada em gel com fermentação por levedura livre e na presença de etanol: influência da difusão de xilose no gel de alginato na concentração medida de xilose e avaliação de consumo aeróbico de etanol durante fermentação por *S. cerevisiae*.**

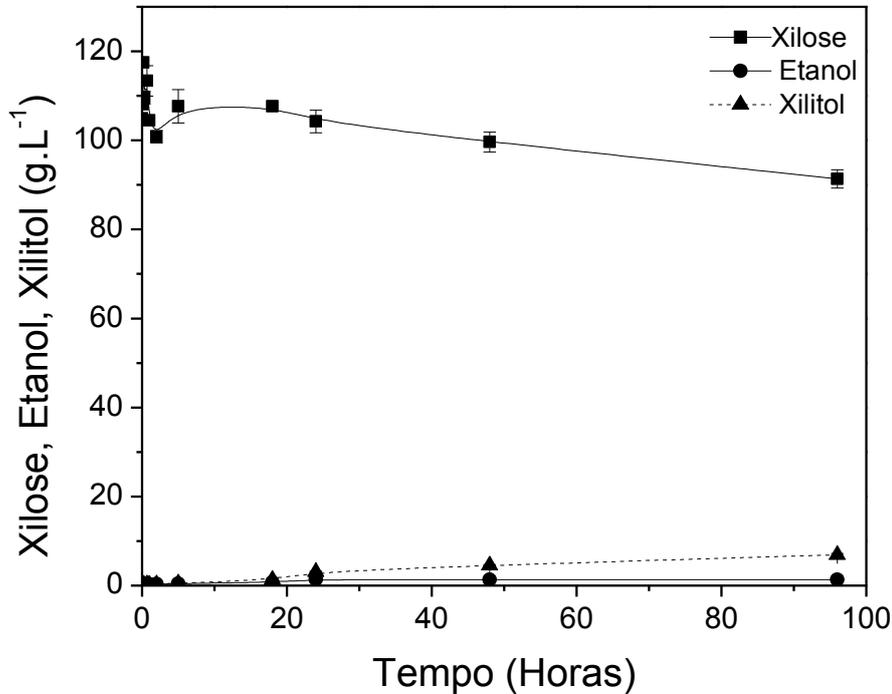
Foram avaliadas fermentações com células livres visando verificar a difusividade da xilose no biocatalisador. O ensaio empregou o meio, com os mesmos componentes, usado na fermentação com biocatalisador e as mesmas condições operacionais.

No ensaio anterior realizado com biocatalisador sem enzima foi verificado diminuição considerável da concentração de xilose logo nas primeiras horas de ensaio. Como de acordo com a literatura a *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar xilose em condições anaeróbicas surgiu a necessidade de avaliar se a quantificação do açúcar teria sido afetada pela difusão da xilose no gel. Como a oxigenação, em alguns casos, permite a utilização de xilose por leveduras, foi também avaliado em uma fermentação o consumo de etanol. A *S. cerevisiae* consome em aerobiose etanol como fonte de carbono, logo, se houver condições de oxigenação para consumo de etanol poder-se-ia observar consumo de xilose pelo mesmo motivo.

A Figura 16 mostra o perfil de consumo de substratos e de formação de produtos durante a fermentação de xilose com *S. cerevisiae* livre. O meio foi o mesmo utilizado nas SIFs, contudo, a diluição de sua composição pela água contida no biocatalisador é superior à diluição ocasionada pela umidade da levedura, resultando assim em uma concentração maior de xilose no meio (aproximadamente  $100\text{g.L}^{-1}$ ). Os valores da concentração de xilose variaram bastante na primeira hora de ensaio, decaindo em taxa muito menor no decorrer do ensaio, assim como no ensaio de fermentação de xilose com o biocatalisador. A conversão do substrato em 96 horas foi de 13% com produção de xilitol como produto principal e etanol.

Observa-se na Figura 15, que com células livres há o mesmo padrão de queda inicial de concentração de xilose que se observou quando a levedura estava imobilizada em gel de alginato, não sendo esse fenômeno pois relacionado com a difusão no gel.

**Figura 16** Fermentação de xilose nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 35°C, pH 5,6, 150rpm, levedura livres 50 gms.L<sup>-1</sup> reator.

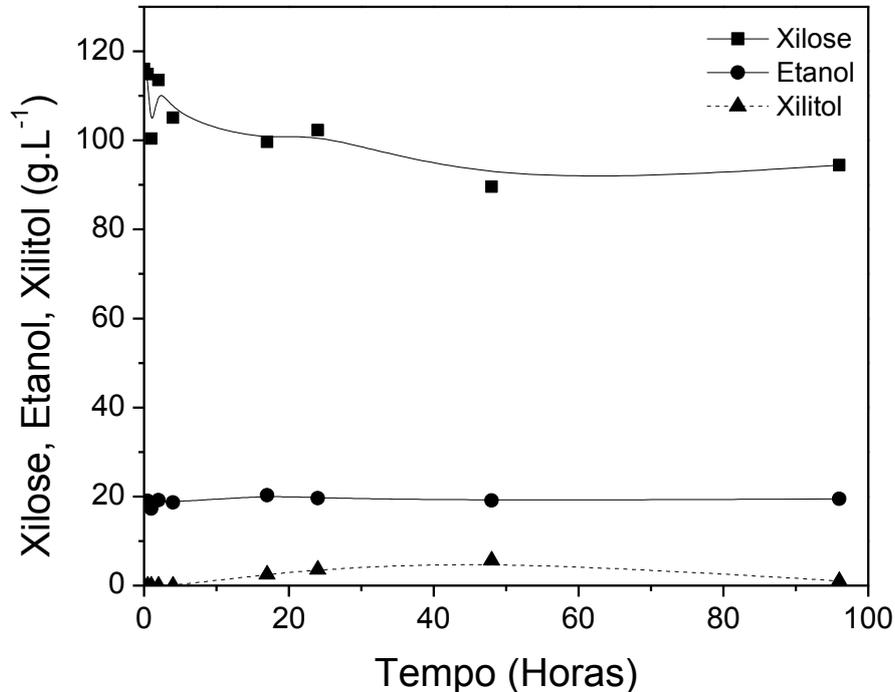


A fermentação em meio contendo xilose e etanol também apresentou oscilação na concentração de xilose na primeira hora de ensaio (Figura 17) sendo a conversão em 96 horas de aproximadamente 10%. Houve produção de xilitol e a produção de etanol, que nos ensaios de fermentação foi muito pequena, não pode ser quantificada já que havia quase 20g.L<sup>-1</sup> de etanol inicial, valor mais de 10 vezes superior ao produzido nas outras fermentações.

Em condições de aeração o etanol pode ser consumido, outros estudos realizados no grupo mostraram que essa linhagem de levedura de panificação consome o etanol quando há oxigenação disponível. Neste ensaio a concentração de etanol não variou durante as 96 horas de ensaio. Pode-se afirmar então que, nas condições destes experimentos, não há oxigenação suficiente para possibilitar o consumo do álcool, bem como o de xilose, e ainda que não há perdas significativas de etanol por evaporação durante os experimentos, amostragem e análises quantitativas.

Esse resultado foi importante para demonstrar que variações na concentração de etanol dos ensaios, tanto entre eles quanto comparativamente a pontos de um mesmo experimento, não são decorrentes de assimilação desse produto nem de perdas significativas por evaporação.

**Figura 17** Fermentação de xilose e etanol nas mesmas condições empregadas nas SIFs, 35°C, pH 5,6, 150rpm, levedura livres 50 gms.L<sup>-1</sup> reator.



#### 4.2.3 Conclusões

A variação das concentrações de enzima e levedura no reator foi obtida mudando-se a massa de IXI-Ch (gel de quitosana contendo enzima imobilizada) e levedura por grama de solução de alginato de sódio mantendo-se fixas as proporções 1:1 de massa de biocatalisador por volume de meio no reator. Utilizando-se pH inicial 5,6 e temperatura de 35°C, foram testadas as seguintes concentrações de Enzima-Levedura no biocatalisador (%): 5-20, 17-5 e 5, 10 e 20-10 levedura (Itaiquara<sup>®</sup>). Os resultados indicaram que maior a concentração celular, mais alta a produtividade em etanol, o que era esperado. Entretanto, mostraram também que mais alta a concentração de enzima mais alta a seletividade etano/xilitol, indicando que maior a disponibilidade de xilulose mais alta a seletividade. Uma vez que a concentração de xilulose fica sempre bem mais baixa que a de xilose no meio, pelo equilíbrio de isomerização ser na razão 1:5, foi preparado um xarope com concentração de xilulose 86%, xilose 10%, para testar essa hipótese. Contrariamente ao esperado, observou-se baixa seletividade, com formação de quantidades significativas de xilitol, mostrando que ocorre formação desse produto a partir de xilulose, possivelmente por mecanismo de “over-flow”, devido a desbalanceamento redox da célula. Minimizar produção de xilitol requer, portanto,

controle cuidadoso da liberação de xilulose para a levedura. Foi também verificado que ocorre pequeno consumo de xilose e que não ocorre consumo aeróbico de etanol nas condições dos experimentos. As concentrações de levedura e enzima selecionadas foram 10% levedura, 20% enzima, correspondendo a  $50 \text{ g}_{\text{ms}}\cdot\text{L}^{-1}$  reator e  $120\cdot 10^3 \text{ UI}\cdot\text{L}^{-1}$  reator, que levaram a produtividade em etanol de  $2,07 \pm 0,17 \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$ , para 96% de conversão em 11 horas, com seletividade etanol/xilitol =  $2,42 \pm 0,01$ .

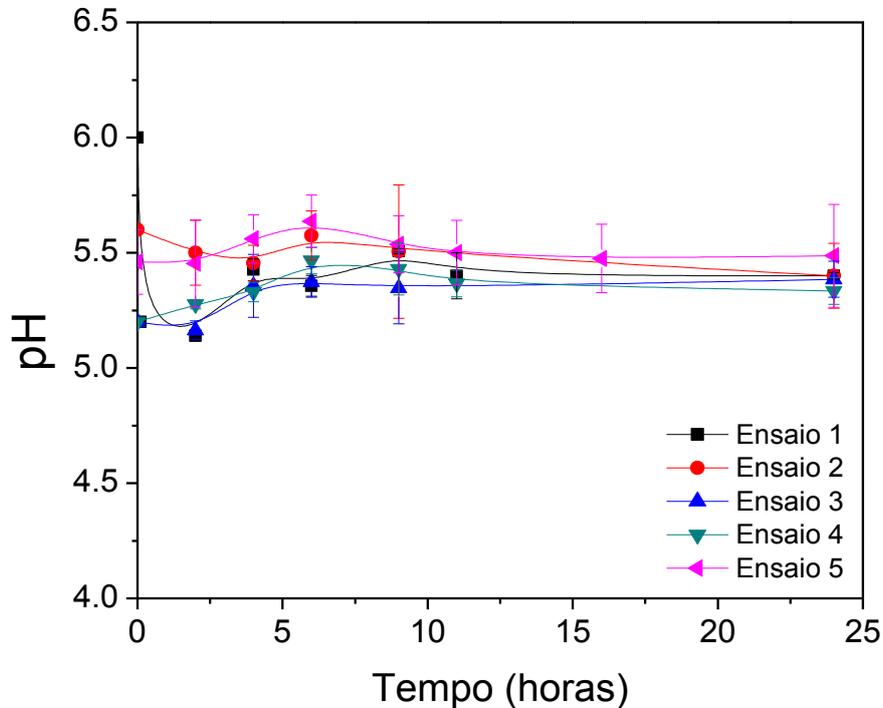
A próxima variável investigada foi o pH.

### 4.3 Influência do pH

O meio proposto e utilizado até então no trabalho foi um meio simples com pH abaixo de 5. Ao tentar se elevar esse valor com adição de base ocorria precipitação de algum ou alguns sais, o que tornava o meio turvo e dificultava a elevação do pH. Observou-se nos primeiros ensaios realizados, com biocatalisadores com e sem  $\text{CaCO}_3$ , que ao adicionar os pellets ao meio em pH 6 já ocorria queda do pH para valores próximos a 5,6, e por isso esse valor foi utilizado para as reações seguintes.

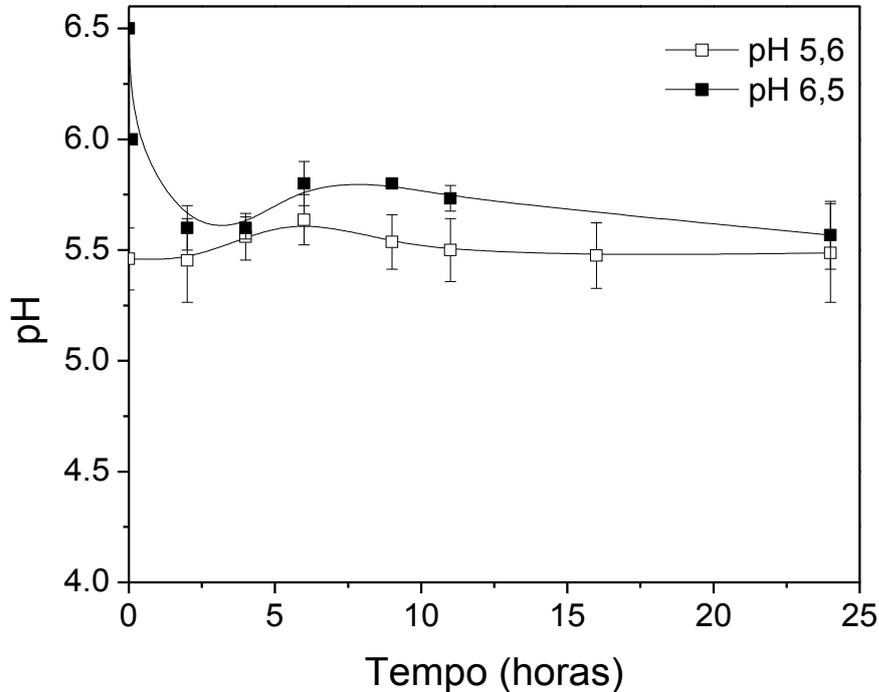
Com a preocupação de padronizar o pH no início das SIFs, visto a dificuldade em determinar a variação deste ao se misturar catalisadores e meio, foi proposto usar meio de cura, onde os pellets ficavam por cerca de 18 horas incubados na geladeira, com o pH já ajustado para 5,6. Essa estratégia não foi suficiente para conseguir ensaios com pHs precisos em 5,6, mas foi sempre mantido valores entre 5,2 e 5,6 (Figura 18). É possível verificar que alguns ensaios tiveram pH inicial menor que o pH final (5,2-5,4), enquanto outros tiveram queda, mas não inferiores a 5,3, mostrando que essa faixa é mantida como em um tampão, efeito esse proporcionado por  $\text{CaCO}_3$ , que solubilizado possui o íon  $\text{CO}_3^{2-}$  responsável por se ligar aos  $\text{H}^+$  do meio, gerando ácido carbônico, que se decompõe em gás carbônico e água.

**Figura 18** pHs das SIFs realizadas com biocatalisadores contendo  $\text{CaCO}_3$  a  $35^\circ\text{C}$ , 150rpm e  $65\text{g.L}^{-1}$  de xilose com Itaiquara<sup>®</sup>.



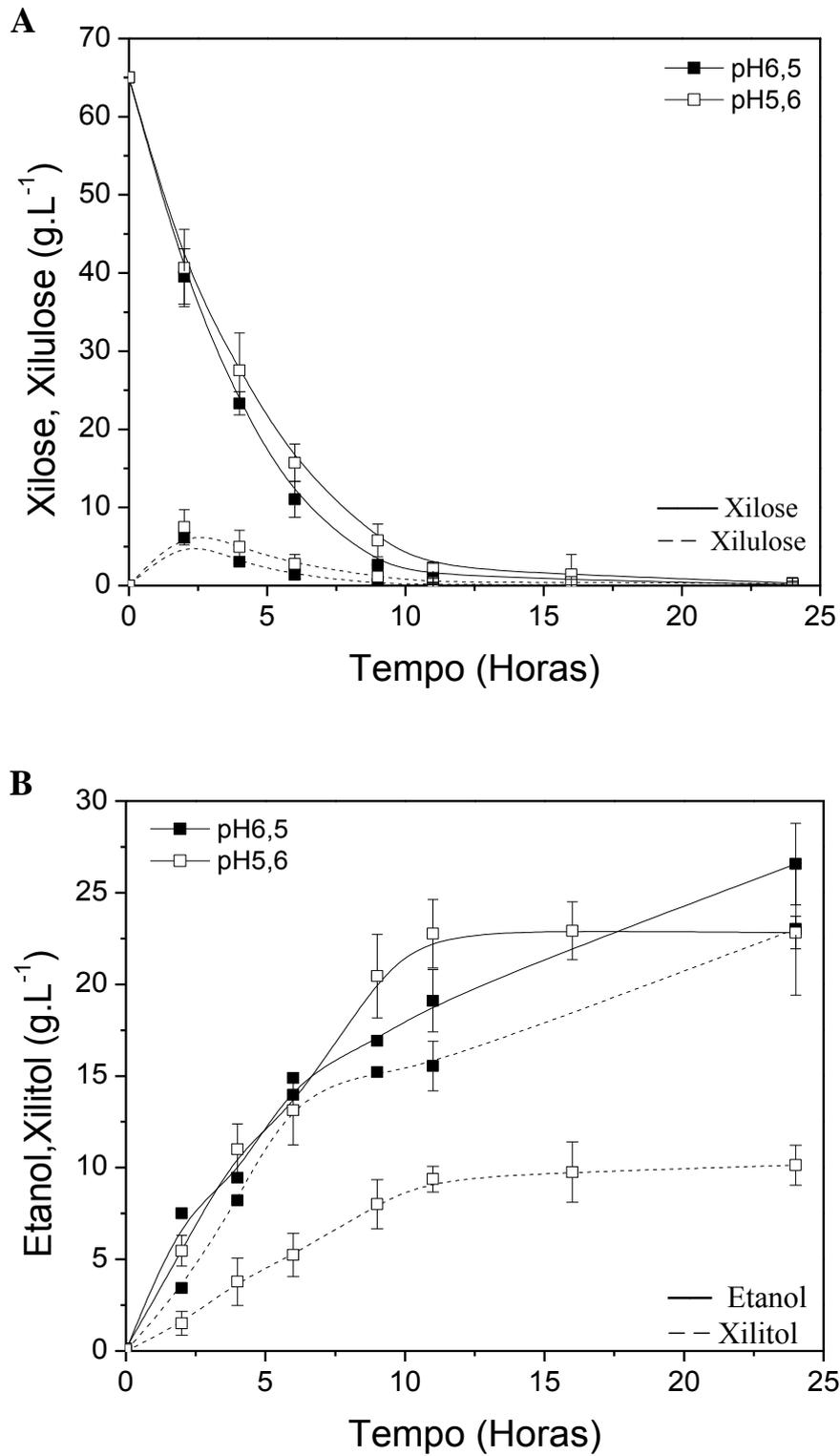
A faixa de estudo de pH para o processo SIF é bastante limitada. A isomerização requer pHs acima de 5 para a manutenção da atividade enzimática, acima de 7 há prejuízo para a fermentação além de propiciar a contaminação bacteriana (CHIANG, et al., 1981a). O estudo da influência do pH poderia ser feito entre 5 e 7. Anteriormente, sem controle do pH, foi observado xilose residual mesmo após 46 horas de ensaio e baixa taxa de conversão, devido á redução do pH que cai de 5 a 4.8 após 9 h (Figura 10-B). Já era sabido assim que o processo tinha desempenho fraco em pHs abaixo de 5,0 e que, portanto, era necessário controlar o pH. A estratégia adotada, coimobilização de carbonato de cálcio, “tamponava” o meio entre 5,2-5,6. Já se conhecia assim o efeito dessas duas regiões de pH. Buscou-se assim o efeito de pH inicial 6,0. Para isso, utilizou-se meio ajustado para 6,5 que, ao ser misturado aos pellets, tem o pH reduzido para 6. Contudo, ele continua a se reduzir e já nas próximas medições, a partir de duas horas, o pH já se encontra muito pouco acima da faixa dos pHs das SIFs anteriores, 5,8-5,5. O comportamento do pH durante o ensaio é apresentado na Figura 19.

**Figura 19** pH das SIFs realizadas a 35°C, 150rpm e 65g.L<sup>-1</sup> de xilose com biocatalisadores contendo CaCO<sub>3</sub>,10% de levedura e 20% de IXI-Ch. Meios com pH iniciais 5,6 e 6,5.



A Figura 20 mostra o acompanhamento da SIF com pH inicial do meio 6,5 em comparação ao da SIF com pH 5,6. O consumo de xilose é semelhante nos dois ensaios, sendo a conversão de 98% alcançada em 11 horas nos dois casos (Tabela 11), e, embora o pH maior favorecesse a reação de isomerização, as quantidades de xilulose presente no meio também são muito próximas (Figura 20). Como a diferença de pH não é tão grande quanto o desejado, o comportamento parecido era esperado. Quanto aos produtos é possível verificar produtividades em etanol semelhantes no início das reações, enquanto a produtividade do xilitol para o pH mais alto é bem maior, levando assim à diminuição da seletividade, mesmo que as produtividades em etanol nos tempos finais sejam semelhantes para esses pHs.

Figura 20 SIFs de  $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose inicial em pH inicial do meio 6,5 e 5,6, a  $35^\circ\text{C}$ , 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados.



**Tabela 11** Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com pHs diferentes: 5,6 e 6,5, a 35 °C e 150 rpm, catalisada por xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído e *S. cerevisiae* coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente.

Tempo (h)	pHi-pHf	Conversão	Y E/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Pr E (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr X (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Seletividade
11	6.5-5.5	98%	0.29 ± 0.03	1.74 ± 0.15	1.41 ± 0.12	1.23 ± 0.12
11	5.4-5.4	96%	0.35 ± 0.02	2.07 ± 0.17	0.85 ± 0.06	2.42 ± 0.01

Y: rendimento, Pr : produtividade.

Uma possível explicação para esse resultado pode estar no estudo realizado por Rizzi e col., em 1989. Nesse estudo, a enzima xilitol desidrogenase de *Scheffersomyces stipitis* foi purificada e caracterizada quanto à atividade enzimática para diversos substratos, mostrando maior afinidade para xilitol e xilulose. Teve como temperatura ótima 35°C, com pequena variação entre 30 e 40°C e atividade nula em pH abaixo de 5. A atividade enzimática cresce exponencialmente com a elevação do pH, sendo a atividade para pH 7 aproximadamente três vezes maior que para pH 6. Dessa maneira, o aumento de pH provoca aumento na atividade da enzima, convertendo xilulose em xilitol, desviando a fonte de carbono do produto de interesse, o etanol.

Esse resultado também concorda com os de Chiang et al. (1981a), que, em fermentações de xilulose, verificou que o pH entre 4 e 6 não interferiu na produção de etanol, mas para pHs mais elevados, como 7, a seletividade cai, pois a produção de xilitol aumenta.

A fermentação, que naturalmente decresce o pH do meio e acontece em faixas abaixo de 5, foi prejudicada com a elevação do pH, provavelmente pela a mudança metabólica, desencadeando o direcionamento para xilitol em detrimento do etanol. Tendo em vista esses resultados, independente do processo de isomerização e da assimilação da xilulose o pH selecionado para o prosseguimento dos estudos foi 5,6. A próxima variável estudada foi a temperatura.

#### 4.4 Influência da temperatura

O estudo dessa variável estava previsto para ser realizado apenas com a levedura comercial Itaiquara, microrganismo que vinha sendo utilizado para estudo das demais variáveis, e assim foi iniciado. Uma vez que o estudo de pH e das concentrações de levedura e de enzima foi feito a 35°C, foram testadas duas outras temperaturas, uma abaixo, 32 e uma acima, 37°C (Figura 21).

Temperatura acima de 37°C não é aplicável. Estudos realizados no grupo demonstraram que a levedura de panificação Itaiquara<sup>®</sup> a 40°C apresenta, após 24 horas de processo SIF, viabilidade inferior a 50%, o que inviabilizaria a aplicação dessa condição em processos longos. Por outro lado, uma vez que a temperatura de máxima atividade da enzima é 70°C, temperaturas menores ainda que 32°C devem inviabilizar a isomerização pela drástica redução da atividade enzimática e não foram, por isso, investigadas.

Para as temperaturas testadas, 32, 35 e 37°C a viabilidade após 24 horas foi sempre maior que 90%, sendo que para 32 e 35 °C a viabilidade não se alterou do início para o final e a 37°C observou-se uma ligeira queda, de 98,4% para 95% (Tabela 12). O pH se manteve entre 5,6-5,3 nesses ensaios.

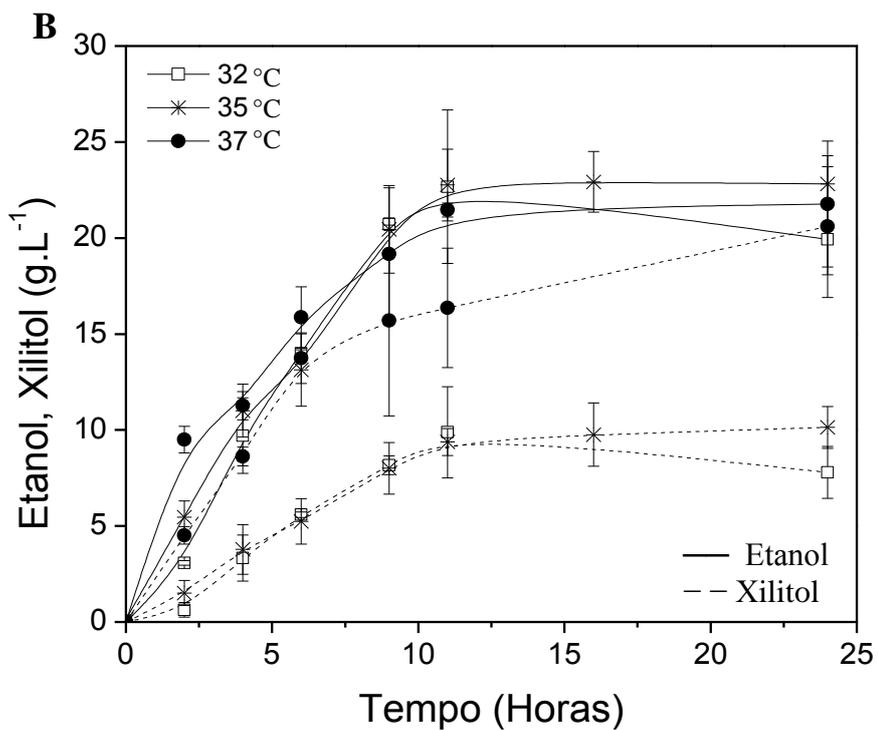
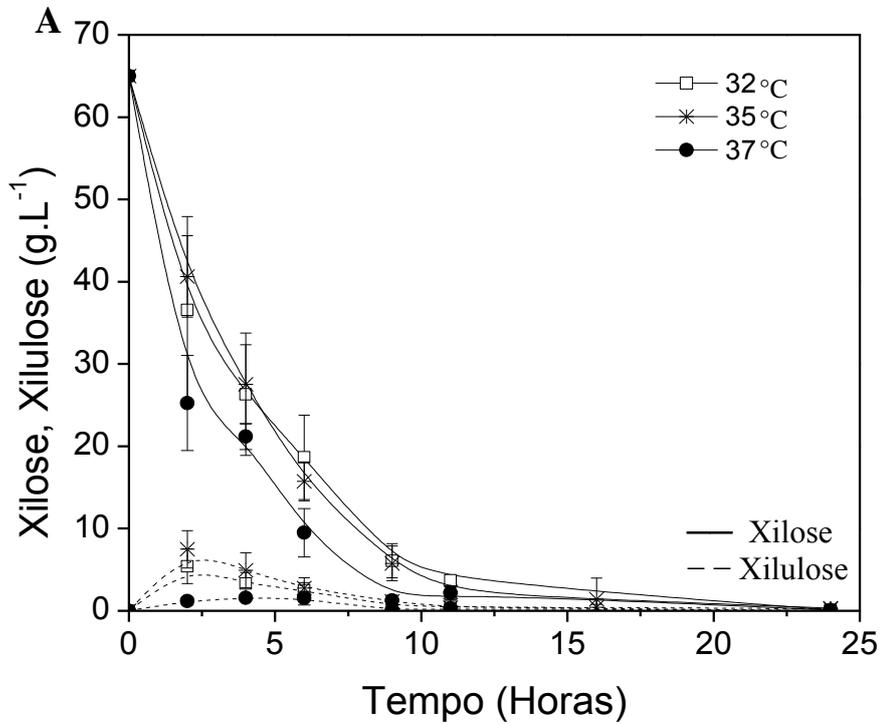
Na Figura 21 A são mostradas as concentrações de xilose e xilulose em função do tempo de ensaio. Para a temperatura 37°C, não é observado maior quantidade de xilulose disponível no meio, resultado esperado pelo aumento na velocidade de reação de isomerização; pelo contrário, a quantidade de xilulose residual entre 0 e 9 horas é menor para essa condição. Possivelmente, o aumento da temperatura, além de favorecer a reação de isomerização, também favoreça a captação e utilização do açúcar pela levedura, assim, o consumo mais acelerado da xilulose mascara o efeito do aumento da velocidade de isomerização. Analisando-se o perfil da conversão de xilose confirma-se essa hipótese, já que na temperatura de 37°C observam-se maiores taxas de conversão, alcançando 98% de conversão já em 9 horas.

**Tabela 12 Parâmetros cinéticos da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com diferentes temperaturas ( $\Theta$  °C): 32, 35 e 37°C a pH 5,6 e 150 rpm, catalisada por xilose isomerase imobilizada em quitosana-glutaraldeído (IXI-Ch) e *S. cerevisiae* Itaiquara<sup>®</sup> coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente.**

$\Theta$ (°C)	T (h)	Conversão	Y E/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Y X/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Pr E (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr X (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Seletividade
32	11	94%	0.35 ± 0.06	0.15 ± 0.04	2.06 ± 0.36	0.90 ± 0.22	2.31 ± 0.15
35	11	96%	0.35 ± 0.02	0.14 ± 0.01	2.07 ± 0.17	0.85 ± 0.06	2.42 ± 0.01
37	11	98%	0.33 ± 0.01	0.25 ± 0.05	1.95 ± 0.03	1.49 ± 0.28	1.34 ± 0.28

Y: rendimento, Pr : produtividade.

Figura 21 SIFs de  $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose inicial em diferentes temperaturas: 32, 35 e  $37^\circ\text{C}$ , pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados.



Embora a taxa de conversão da pentose tenha sido maior para a maior temperatura, isso não se refletiu na taxa de produção de etanol; às 9 horas de ensaio, a produtividade em etanol era a mesma que a produtividade para os outros ensaios nesse mesmo tempo, quando a conversão ainda era próxima a 90%. Foram comparados os parâmetros para o tempo de 11 horas, onde a conversão era próxima a 95% para as temperaturas de 32 e 35°C e quando a SIF a 37°C alcançou sua concentração mais alta de etanol (Tabela 12).

Os parâmetros em etanol como rendimento, produtividade foram iguais para as três temperaturas, entretanto esses parâmetros para xilitol foram iguais para 32 e 35 °C (Tabela 12) e menores que para 37°C. Isso causou a diminuição na seletividade etanol/xilitol.

O estudo de temperatura realizado por Chiang et al, 1981a com fermentação de xilulose conclui que baixas temperaturas favorecem formação de sub-produtos como o xilitol, sendo a temperatura de 35°C a selecionada; já que maiores temperaturas afetam a viabilidade e a capacidade de fermentar da levedura *S. cerevisiae*. Nossos resultados mostram um comportamento oposto, seja por efeito do processo simultâneo, seja pela linhagem da levedura. Decidiu-se, por isso, ao invés de se compararem diferentes linhagens de leveduras em uma mesma condição, conforme pretendido inicialmente, se proceder ao estudo do efeito da temperatura no desempenho do processo SIF para as outras duas linhagens a serem estudadas.

#### **4.5 Estudo do processo SIF com diferentes linhagens de levedura: BG-1 e CAT-1**

Para o estudo com diferentes linhagens foram escolhidas duas linhagens usadas industrialmente em usinas brasileiras, CAT-1 e BG-1. As condições de operação foram as já selecionadas nos itens anteriores, 50g<sub>ms</sub>.L<sup>-1</sup> e 20% de IXI-Ch, pH 5,6. Como a temperatura foi um parâmetro que influenciou muito na seletividade em etanol, foram estudadas diferentes temperaturas. Já que CAT-1 e BG-1 são leveduras mais tolerantes a “estresses” (BASSO et al., 2008), temperaturas de fermentação um pouco mais elevadas foram testadas: 37 e 40°C; e ainda a temperatura 32°C, condição favorável economicamente ao processo (menor gasto energético) e que mostrou produtividade, rendimento e seletividade iguais a 35 e superiores a 37°C para as SIFs com levedura de panificação Itaiquara<sup>®</sup>.

A obtenção da biomassa dessas leveduras foi por meio de cultivo em shaker, com erlenmeyers haletados, sendo necessário o preparo de um pré-inóculo prévio ao cultivo. As duas etapas para propagação de células ocorreram até que as células estivessem em fase lag e então foram quantificadas a D.O, massa seca e então utilizadas na etapa posterior.

#### 4.5.1 CAT-1

As SIFs realizadas com CAT-1 mostraram um comportamento semelhante às SIFs realizadas com levedura Itaiquara<sup>®</sup>, sendo a xilose isomerizada pela enzima e a xilulose consumida pela levedura, resultando em etanol e xilitol como principais produtos (Figura 23).

Para as três temperaturas, observou-se queda de pH mais drástica que o usual, quando comparado com o mesmo processo, usando levedura de panificação. As SIFs iniciaram com pH 5,4 e o pH reduziu para valores entre 4,7-4,8 (Figura 22).

Essa redução no pH deve ter sido responsável pela diminuição da taxa de consumo do açúcar, como mostrado na Tabela 13, onde se observa que conversões menores foram alcançadas em tempos maiores com essa levedura. Abaixo de pH 5, XI tem atividade muito baixa, resultando em relações xilose/xilulose muito mais altas que 5 (a relação de equilíbrio e valor próximo às relações de xilose/xilulose obtidas com SIFs Itaiquara<sup>®</sup> onde o pH era mantido acima de 5). Na realidade, o pH intra partícula deve estar em 5 ou pouco acima de 5, já que se sabe que abaixo desse valor a enzima praticamente não atua e mesmo que mais lentamente vem ocorrendo a isomerização.

**Figura 22** pHs das SIFs realizadas com biocatalisadores contendo  $\text{CaCO}_3$  para levedura CAT-1 em diferentes temperaturas, 150rpm e  $65\text{g.L}^{-1}$  de xilose.

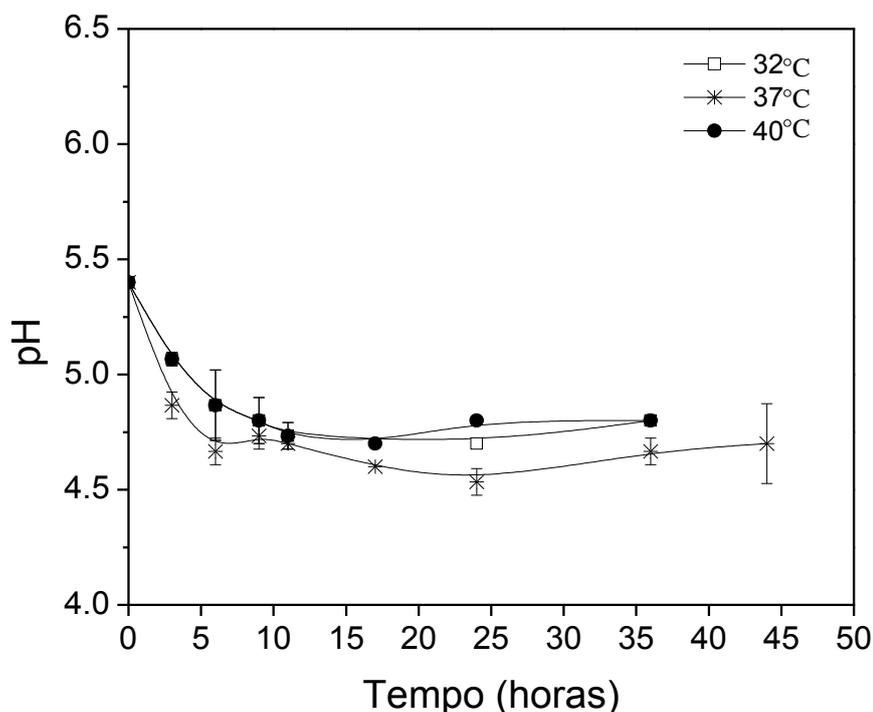
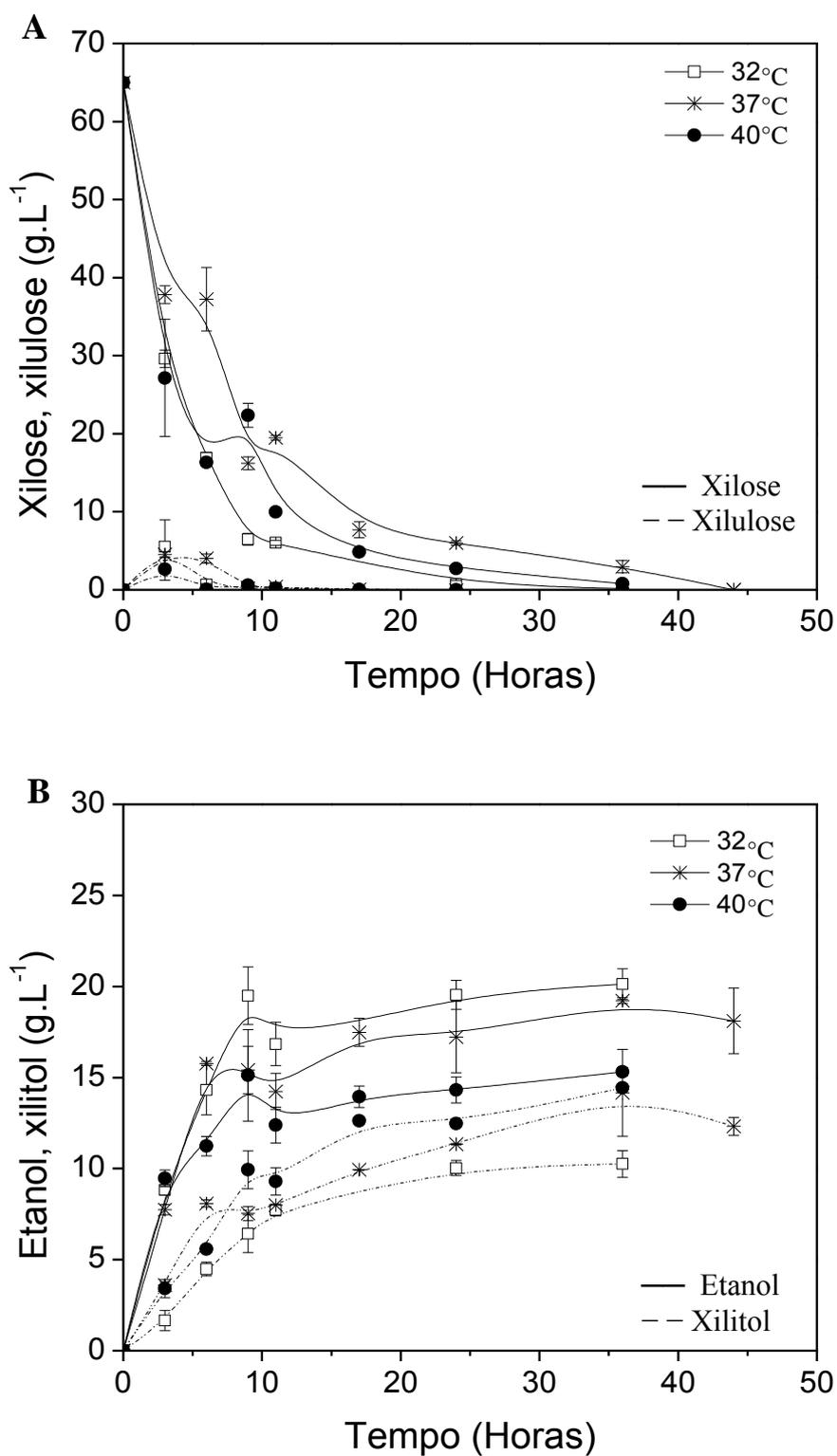


Figura 23 SIFs de  $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose inicial com CAT-1 em diferentes temperaturas: 32, 37 e  $40^\circ\text{C}$ , pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados.



**Tabela 13** Parâmetros cinéticos da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com a levedura CAT-1, pH 5,6, 150 rpm e diferentes temperaturas ( $\Theta$  °C): 32, 37 e 40°C, catalisada por IXI-Ch e levedura coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente.

$\Theta$ (°C)	T (h)	Conversão (%)	Y E/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Y X/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Pr E (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr X (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Seletividade	V <sub>i</sub> -V <sub>f</sub> (%)
32	9	90	0.30 ± 0.02	0.10 ± 0.02	2.17 ± 0.17	0.71 ± 0.12	3.06 ± 0.24	97-98
37	17	88	0.27 ± 0.01	0.15 ± 0	1.03 ± 0.05	0.58 ± 0	1.76 ± 0.08	99-99
40	17	92	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0	0.82 ± 0.03	0.74 ± 0.01	1.10 ± 0.04	97-95

T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade, V: viabilidade.

A causa da queda do pH não foi encontrada. A quantidade de ácido acético medida estava na mesma faixa medida para as outras SIFs, o meio reacional era o mesmo, o que difere é a linhagem e a origem da levedura, que é obtida por cultivo e não comprada prensada. Diferentes linhagens são responsáveis por variações na composição dos produtos de fermentações com condições operacionais iguais. Analisando a variação da composição química de aguardentes fermentadas por diferentes cepas de *S. cerevisiae*, a CAT-1 e a BG-1 foram leveduras com alta acidez volátil (ALCARDE, A.; MONTEIRO, B.; BELLUCO, A., 2012). Provavelmente devido a um metabolismo diferente, ao consumir a xilulose essa levedura produza algum ácido, que não foi quantificado, responsável por esse efeito.

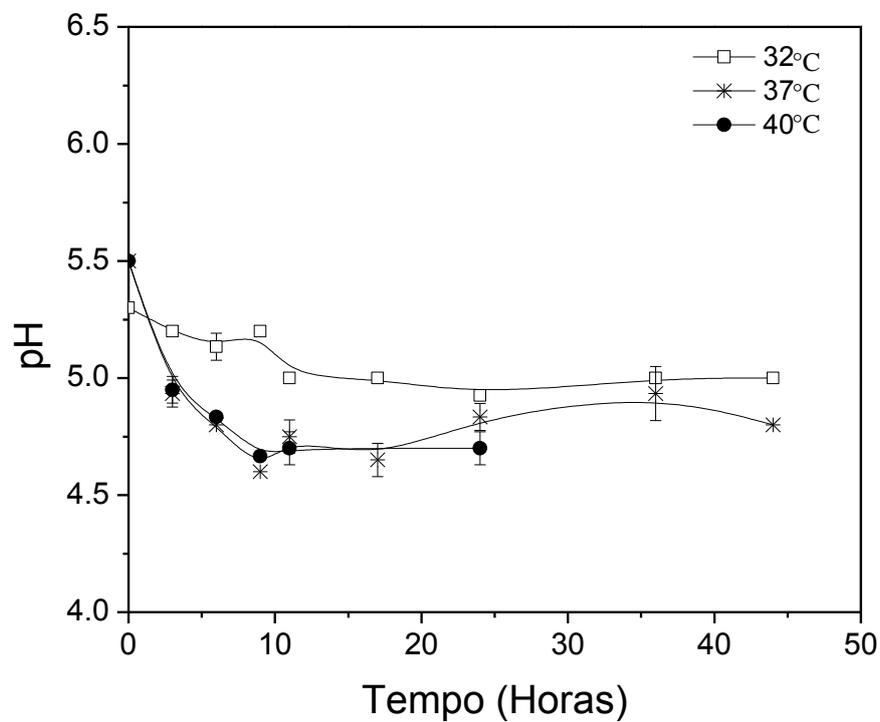
Embora o comportamento do pH tenha se assemelhado ao da SIF sem CaCO<sub>3</sub>, a conversão próxima de 90% foi alcançada já em 9 horas para a temperatura de 32°C, e em 17 horas para 37 e 40°C. Com a levedura CAT-1, foi observado por Costa (2011) que em fermentação de glicose ao se elevar a temperatura de 37 para 40°C as células não conseguiam mais consumir toda a glicose, diminuindo o rendimento em etanol de 0,48 pra 0,27g<sub>etanol</sub>.g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>.

Os parâmetros como rendimento e produtividade em etanol diminuíram com o aumento da temperatura, enquanto que esses mesmos parâmetros para xilitol foram elevados. Esse comportamento, o mesmo observado para a Itaiquara<sup>®</sup>, resulta na diminuição da seletividade etanol/xilitol. Como são apenas linhagens diferentes, o metabolismo fermentativo da xilulose deve ser evolutivamente semelhante e são ainda pouco compreendidos.

#### 4.5.2 BG-1

As SIFs realizadas com a levedura industrial BG-1 também apresentaram queda de pH durante o processo (5,5-4,7)(Figura 24). Contudo, diferentemente da CAT-1, a levedura BG-1 não foi capaz de alcançar conversões de 90% em menos de 11 horas para nenhuma temperatura avaliada (Tabela 14).

**Figura 24** pHs das SIFs realizadas com biocatalisadores contendo  $\text{CaCO}_3$  para levedura BG-1 em diferentes temperaturas, 150rpm e  $65\text{g.L}^{-1}$  de xilose.



**Tabela 14** Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si)  $65\text{g.L}^{-1}$  com a levedura BG-1, pH 5,6, 150 rpm e diferentes temperaturas ( $\Theta$  °C): 32, 37 e 40°C, catalisada por IXI-Ch e levedura coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente. T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade, V: viabilidade.

$\Theta$ (°C)	T (h)	Conversão (%)	Y E/Si ( $\text{g.g}^{-1}$ )	Y X/Si ( $\text{g.g}^{-1}$ )	Pr E ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Pr X ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	Seletividade	$V_i-V_f$ (%)
32	11	82	$0.29 \pm 0.03$	$0.09 \pm 0.01$	$1.72 \pm 0.16$	$0.54 \pm 0.04$	$3.19 \pm 0.11$	97-98
37	17	87	$0.28 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.01$	$1.07 \pm 0.02$	$0.56 \pm 0.03$	$1.91 \pm 0.14$	98-96
40	24	87	$0.06 \pm 0.04$	$0.2 \pm 0.2$	$0.16 \pm 0.1$	$0.53 \pm 0.55$	$0.31 \pm 0.19$	97-79

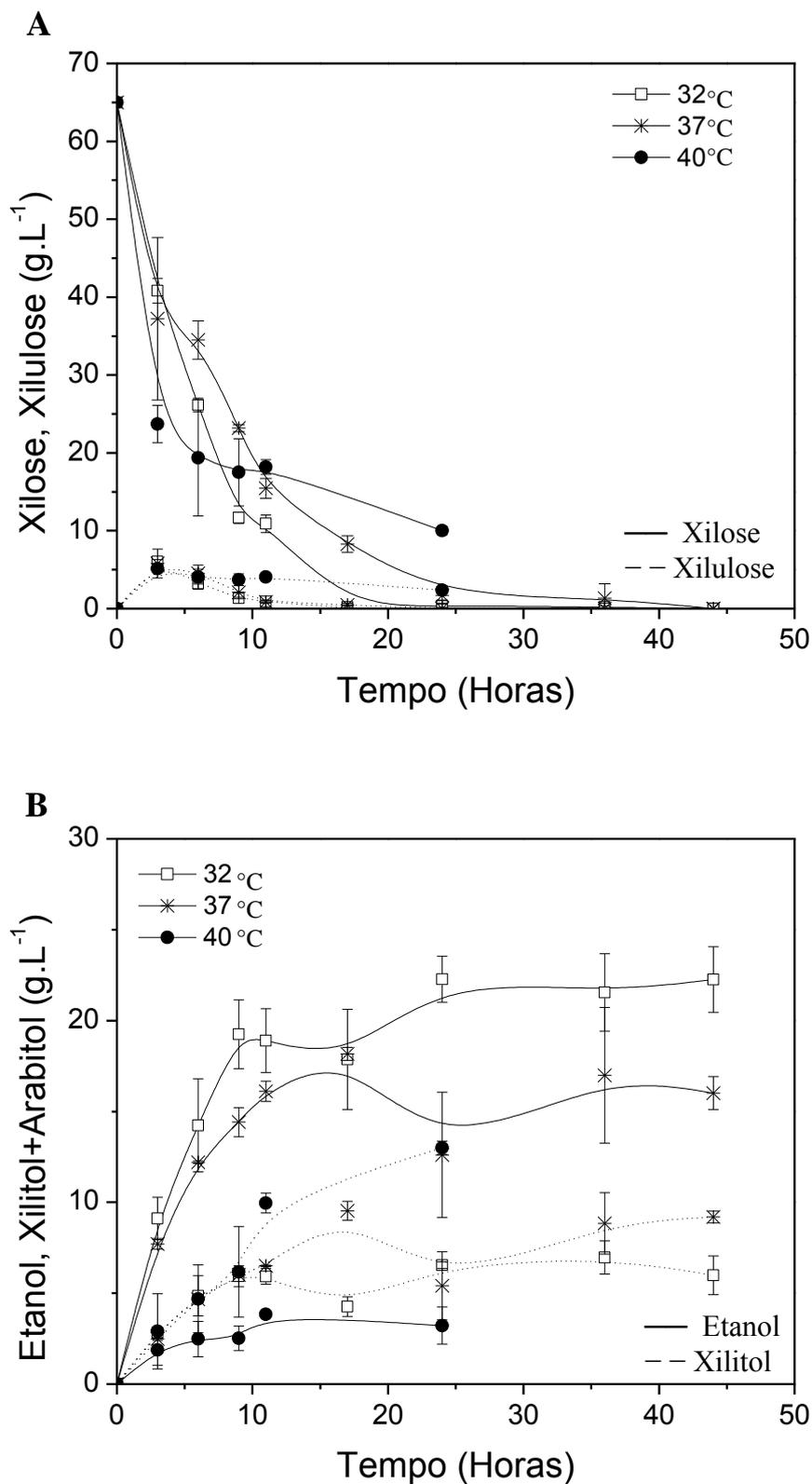
Com o ensaio a 40°C é possível notar que há xilulose residual no meio em todos os pontos amostrados, sempre respeitando a proporção 5:1 (xilose:xilulose)(Figura 25). Isso leva a crer que, embora seja sabido que o pH abaixo de 5 inviabiliza a reação de isomerização, a enzima ainda está ativa, sendo capaz de isomerizar xilose a xilulose mesmo em pH desfavorável. O pH já está abaixo de 5 em duas horas de ensaio a 40°C, mas a levedura continua a consumir (observando-se o decréscimo de xilose) e xilulose ainda está presente no meio, ou seja, a levedura consome xilulose, a enzima isomeriza xilose a xilulose, reduzindo assim, a concentração desta. É possível que a reação de isomerização ocorra, considerando que haja diferença entre o pH medido no meio e do interior do pellet. Como o CaCO<sub>3</sub> atua localmente, reagindo com H<sup>+</sup> formando CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, um micro-ambiente é criado, com pH mais elevado, e é justamente onde a enzima está imobilizada.

A levedura BG-1 produziu além de etanol e xilitol o arabitol. Esse álcool é produzido apenas nas SIFs com essa linhagem e tem peso e fórmula moleculares iguais as do xilitol. O arabitol é produzido em concentrações quase equivalentes às do xilitol, assim os parâmetros em xilitol foram modificados em decorrência desse subproduto, sendo somadas as concentrações desses dois pentois. Embora outro subproduto seja gerado nessa SIF, a concentração somada dos dois não é superior às concentrações da produção de xilitol obtida nas SIFs das outras linhagens. É como se a produção de xilitol fosse agora dividida em dois.

Os parâmetros da fermentação são apresentados na Tabela 14. Dentre as temperaturas testadas, novamente a menor, 32°C, apresentou maior taxa de conversão, maior produtividade em etanol. O rendimento em etanol foi o mesmo para 32 e 37°C, enquanto que para 40°C todos os parâmetros em etanol foram piores. O rendimento em xilitol e arabitol aumentou quando a temperatura foi aumentada, levando seletividade a decair com esse aumento.

Mesmo que linhagens como CAT-1 e BG-1 tenham perfis semelhantes quanto à fermentação de glicose, com rendimentos superiores a de leveduras de panificação como Itaiquara<sup>®</sup> e Fleishmann<sup>®</sup> (BASSO et al., 2008), em fermentação da xilose em processo SIF elas apresentam resultados diferentes, sendo os resultados da BG-1 inferiores aos da CAT-1 e da Itaiquara. A BG-1 possui talvez uma afinidade menor para essas pentoses que as outras linhagens estudadas.

Figura 25 SIFs de  $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose inicial com BG-1 em diferentes temperaturas: 32, 37 e  $40^\circ\text{C}$ , pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados.



#### 4.6 Seleção das condições de operação do processo batelada SIF

Empregar leveduras que tenham alta afinidade pelo substrato, altas taxas de conversão e produtividade, boa seletividade são requisitos básicos para a escolha do microrganismo a ser utilizado no processo SIF. Considerar a prevalência da linhagem durante o processo também deve ser levado em conta, contudo, ao se empregar células imobilizadas tem-se a vantagem de, aprisionando as células, diminuir riscos de contaminação. As linhagens CAT-1 e BG-1, selecionadas em unidades sucro-alcólicas, apresentam diversas vantagens sobre a levedura de panificação quando se trata da fermentação de glicose, pois predominam no meio fermentativo, prevenindo a dominância de linhagens com características indesejáveis à fermentação, como baixo rendimento, baixa taxa de conversão, formação de espuma e coagulações.

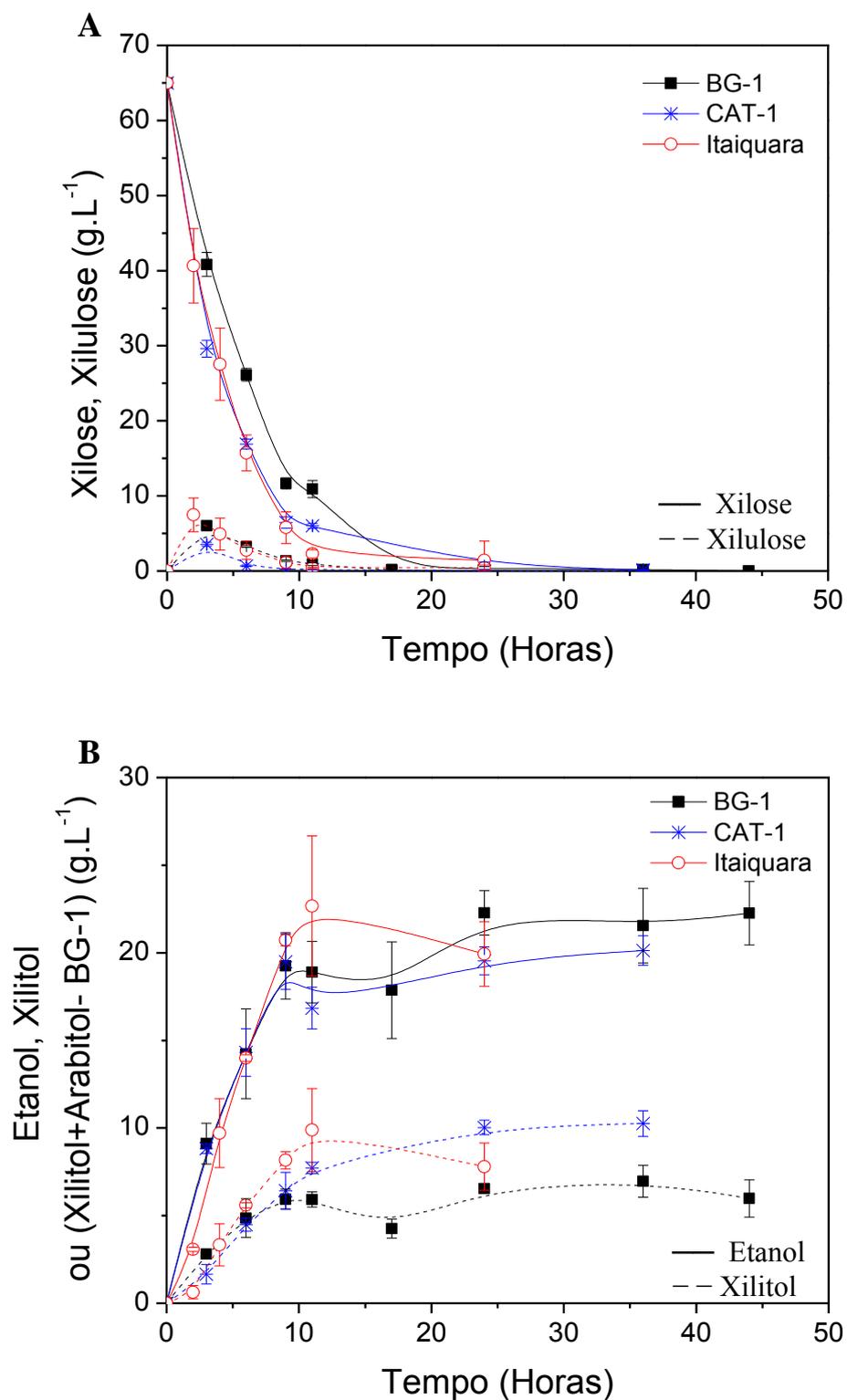
É possível notar diferenças nas três linhagens avaliadas nos processos SIFs. Entretanto, todas apresentaram a mesma tendência a 32°C, os parâmetros em etanol foram sempre favorecidos e os de xilitol diminuídos (Figura 26).

Comparando-se então essas três linhagens a 32°C é possível notar pela Figura 26 e com os dados da Tabela 15 que a produtividade e rendimento em etanol para as três linhagens, considerando-se os desvios padrões das triplicatas, são iguais. Pela figura observa-se o consumo mais lento do açúcar para a linhagem BG-1, enquanto a CAT-1 e a Itaiquara® diferem apenas após nove horas de ensaio, pois a CAT-1 demora um pouco mais para esgotar totalmente o substrato. As concentrações de xilulose diferem muito pouco para os três ensaios, sendo praticamente zero em 9 horas.

**Tabela 15 Parâmetros do processo da produção de etanol (E) e xilitol (X) na SIF de xilose inicial (Si) 65g.L<sup>-1</sup> com diferentes linhagens, a temperatura (Θ) 32°C, pH 5,6, 150 rpm, catalisada por IXI-Ch e levedura coimobilizadas em alginato na proporção 20% e 10% respectivamente. T: tempo, Y: rendimento, Pr : produtividade, V: viabilidade.**

Linhagem	Θ (°C)	T (h)	Conversão (%)	Y E/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Y X/Si (g.g <sup>-1</sup> )	Pr E (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr X (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Seletividade
Itaiquara®	32	11	94	0.35 ± 0.06	0.15 ± 0.04	2.06 ± 0.36	0.90 ± 0.22	2.31 ± 0.15
Cat-1	32	9	90	0.30 ± 0.02	0.10 ± 0.02	2.17 ± 0.17	0.71 ± 0.12	3.06 ± 0.24
BG-1	32	11	82	0.29 ± 0.03	0.09 ± 0.01	1.72 ± 0.16	0.54 ± 0.04	3.19 ± 0.11

Figura 26 Comparação das SIFs de 65 g.L<sup>-1</sup> de xilose inicial com Itaiquara<sup>®</sup>, CAT-1 e BG-1 a 32°C, pH inicial do meio 5,6, 150 rpm realizadas com biocatalisadores com 10% de levedura e 20% de IXI-Ch. (A) Consumo dos substratos. (B) Principais produtos formados.



A produção de etanol tem taxa de produção similar nos três ensaios, mostrando que embora a BG-1 assimile mais lentamente a pentose não há prejuízo quanto às produtividades iniciais. O que acontece é que a Itaiquara<sup>®</sup> consome mais açúcar, porém não a converte em etanol com a mesma seletividade que a BG-1 e que a CAT-1. Provavelmente essa levedura tenha metabolismo mais deficiente que as outras duas linhagens. O fato de que apenas uma pequena parte da glicose consumida por leveduras entra na via das pentoses fosfato, leva a crer que essa via seja pouco desenvolvida nesses microrganismos. Logo, se admitirmos que as leveduras de panificação foram substituídas por linhagens selecionadas industriais que alcançavam menores conversões e menores rendimentos, podemos entender que menos açúcar ainda passaria pela via pentose fosfato nessas linhagens.

No estudo realizado por Moraes (2013) foi observado que a seletividade da linhagem Itaiquara<sup>®</sup> era em certos pontos superior a seletividade da BG-1, e bastante superior a da CAT-1. Seus resultados diferem dos apresentados neste trabalho e como diferença metodológica tem-se a fase de cultivo empregada para o processo. Neste trabalho, as células foram cultivadas até a fase estacionária do cultivo, enquanto Moraes (2013) utilizou células em fase exponencial ainda. Como não foi realizado nenhum teste controle para essa variável, podemos apenas propor que em fase estacionária as células tenham metabolismo diferente e por isso alcancem melhores seletividades. É interessante observar que a linhagem de panificação encontra-se em fase estacionária, pois é capaz de manter alta viabilidade por longos períodos em prateleira.

Fica claro que há necessidade de uma melhor compreensão do metabolismo fermentativo da xilose e da xilulose em *Saccharomyces cerevisiae*, bem como de seleção de linhagens que tenham afinidade por xilose ou xilulose. É interessante ressaltar que essas linhagens são amplamente empregadas para a conversão de glicose e não de xilose ou xilulose. As linhagens como CAT-1, BG-1, PE-2, etc foram coletadas em dornas de fermentação nas condições de fermentação de glicose e selecionadas, estudadas, e caracterizadas em vários estudos. Logo, linhagens mais adaptadas para o processo SIF precisam ser também estudadas.

A predominância da linhagem no processo está diretamente relacionada com a capacidade de consumo de substrato, impedindo assim a proliferação de outros microrganismos. Dentre as três linhagens estudadas a BG-1 apresenta conversão inferior às outras, não alcançando 90% entre 9 e 11 horas. Já as outras duas linhagens apresentam

conversões de 90% em 9 horas. A Itaquara<sup>®</sup> alcançou aproximadamente 95% em 11 horas de processo SIF, mas CAT-1 alia boa conversão com alta seletividade.

Em um estudo em processo contínuo realizado por Silva (2013) os parâmetros selecionados neste trabalho como concentração de enzima e levedura, pH e temperatura puderam ser avaliados. A levedura que compunha o biocatalisador foi a de panificação Itaquara<sup>®</sup> que além de ser obtida facilmente mostrou melhor conversão e nenhum prejuízo quanto à produtividade. O reator contínuo foi operado por 7 dias com produção de etanol em concentrações superiores a 20 g.L<sup>-1</sup> e aproximadamente 12 g.L<sup>-1</sup> de xilitol. Como obstáculos ao prosseguimento do processo tiveram a contaminação e consequente queda do pH.

Diversos estudos buscam encontrar condições de processo, microrganismos que possibilitem a utilização da fração de pentoses dos materiais lignocelulósicos. A Tabela 16 expõe resumidamente alguns resultados importantes encontrados na literatura onde é possível observar que a conversão desse açúcar é lenta e tem como subproduto o xilitol. O controle de pH é obstáculo recorrente nesse processo. Os resultados alcançados neste trabalho são bastante significativos quando comparados a esses publicados na literatura.

Tabela 16. Comparação de alguns processos que utilizam xilose para produção de etanol.

Levedura	Concentração de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	Xilose inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Conversão (%)	Tempo (h)	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Pr <sub>E</sub> (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>E/Si</sub>	Xilitol (g.L <sup>-1</sup> )	pH	Θ (°C)	OBS:	Ref
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	4x10 <sup>8</sup> cel/mL	120	39	10	18	1.8	0.38	Nr	6	40	pH controlado	GONG et al, 1981
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YSC2, tipo II (Sigma Aldrich)	200	39	46	10	5,5	0.55	0.39	1,18	4,5	34	Inibição da XI por xilitol	YUAN et al, 2012
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3	60	100	48	21	0.43	0.35	8	5.7	35	pH controlado	LASTICK et al, 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	20	65	75,4	48	12	0.25	0.25	9.5	5.3	35	Queda no pH	SILVA et al, 2012
<i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i> UFMG-HMD-15.2	12.9	50	84.5	24	12.3	0.28	0.24	1.9	6		Fermentação	CADETE et al, 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MN8140XX **	50	50	65.5	12	10.7	0.89	0.21	6	6.1	30	Fermentação recombinante com XR, XDR e XK **	KATO et al., 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YRH1114***	D.O=2 Baixa concentração	50	64	91	13.6	0.14	0.272	4.8			Microaeração Recombinate com XI e XK ***	Hector et al, 2013
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> * (10%lev, 20%enz)</b>	50	65	94	11	≈23	2.06 ± 0.36	0.35 ± 0.06	≈10	5.6	32	<b>Presente trabalho</b>	

\* *Saccharomyces cerevisiae*: levedura de panificação

nr – não reportado

\*\*Linhagem diploide de *Saccharomyces cerevisiae* com expressão de xilose redutase(XR), xilitol desidrogenase (XDR) heteróloga de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, e superexpressão de xiluloquinase(XK).

\*\*\* Linhagem recombinante com xilose isomerase (XI) e xiluloquinase (XK) de *Prevotella ruminicola*. A linhagem passou por adaptação em xilose em microaeração.

## 5 Conclusões

Os resultados mostram que com o biocatalisador, coimobilizando enzima e levedura juntamente com  $\text{CaCO}_3$ , foi possível manter-se constante o pH e dessa forma, foi possível melhorar a conversão de 86% em 46 horas para 96% em apenas 11 horas. Os parâmetros da fermentação, conversão, produtividade, seletividade e rendimento em etanol foram aumentados. Com isso ainda, foi possível estudar a influência das concentrações de levedura e enzima nas SIFs de xilose. Os resultados obtidos confirmam que a produtividade e rendimento em etanol aumentam com a concentração de levedura, enquanto que a seletividade aumenta com a concentração de enzima. Os resultados foram muito promissores, indicando viabilidade técnica de produção de etanol a partir de xilose com o biocatalisador desenvolvido.

A concentração enzima e levedura no biocatalisador selecionada foi 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IXI-Ch. Essa composição escolhida apresentou parâmetros semelhantes a composição 10% de levedura em massa seca e 10% de enzima IXI-Ch, contudo a maior carga enzimática favorece mais tempo de uso em processos contínuos ou permite reutilização do biocatalisador em mais bateladas. O biocatalisador citado, em SIF a 35°C, pH 5,6, 150 rpm converteu em 11 horas 96% de 65  $\text{g.L}^{-1}$  de xilose, produzindo etanol com rendimento de  $0,35 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilulose}}^{-1}$ , produtividade  $2,07 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e seletividade  $2,42 \pm 0,01$  com relação ao xilitol.

As fermentações de xilose e de xarope de xilulose tiveram resultados satisfatórios. Em presença de xilose pouco açúcar foi consumido, cerca de 17% em 48 horas, e como produto principal tivemos o xilitol, seguido de etanol. A fermentação de xarope de xilulose com xilose comprovou a afinidade da *Saccharomyces cerevisiae* por xilulose e não por xilose e ainda esclareceu que, embora não seja esperado em condições anaeróbicas, a produção de xilitol é proveniente da xilulose. Disponibilizar xilulose em altas concentrações, 58  $\text{g.L}^{-1}$ , contrariamente ao esperado piorou a seletividade etanol/xilitol.

A variação do pH mostrou que aumentar o pH de 5,6 para 6,5 leva a diminuição de seletividade, produzindo mais xilitol e diminuindo o rendimento e a produtividade em etanol. Com o estudo da temperatura pode-se concluir que o aumento da temperatura de 32 para 35 e 37°C em SIFs com levedura Itaiquara<sup>®</sup> não resulta em aumento de produtividade, nem de rendimento em etanol, mas favorece o aumento desses parâmetros para o xilitol, levando a

queda na seletividade etanol/xilitol. Portanto, neste trabalho, os resultados obtidos mostraram que menores temperaturas e pHs, condições desejadas para a operação industrial, favorecem a seletividade em etanol sem prejudicar o rendimento e produtividade.

As linhagens avaliadas, CAT-1 e BG-1, também foram capazes de consumir a xilulose isomerizada pela enzima, contudo em taxa de conversão mais lenta. Quando foi avaliada a variação de temperatura elas se comportaram da mesma maneira que a Itaiquara, piorando os parâmetros em etanol quanto maior era a temperatura. Tiveram alta viabilidade celular, superior a 90% em 24 horas de ensaio, mesmo para 40°C.

A 32°C, as leveduras CAT-1 e Itaiquara apresentam produtividades  $2,06 \pm 0,362$  e  $2,07 \pm 0,17$  ( $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), rendimentos  $0,35 \pm 0,06$  e  $0,30 \pm 0,02$  ( $\text{g.g}^{-1}$ ) e conversões 90% e 94% semelhantes, mas CAT-1 apresenta mais alta seletividade  $3,06 \pm 0,24$  que Itaiquara  $2,31 \pm 0,15$  e parece ser a melhor opção para operação da SIF.

Tanto o screening por leveduras com maior afinidade pela xilulose e melhor seletividade em etanol, assim como uma melhor compreensão do metabolismo desse açúcar por *S. cerevisiae* são fundamentais para o estabelecimento de um processo industrial baseado no aproveitamento da fração hemicelulósica para a produção de etanol.

## 6 Referências bibliográficas

- ADSUL, M. et al. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, n. 1, p. 67-72, ago. 2004.
- ALCARDE, A.; MONTEIRO, B.; BELLUCO, A. Composição química de aguardentes de cana-de-açúcar fermentadas por diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1612-1618, 2012.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- ANDRIETTA, M.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. Bioetanol–Brasil, 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, v. 7, p. 1-16, 2006.
- ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 187-198, 2000.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BASTELAERE, P. VAN; VANGRYSPERRE, W.; KERSTERS-HILDERSON, H. Kinetic studies of Mg (2+)-, Co (2+)-and Mn (2+)-activated D-xylose isomerases. **Biochemical Journal**, v. 278, p. 285-292, 1991.
- BERTILSSON, M.; ANDERSSON, J.; LIDÉN, G. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 31, n. 4, p. 369-77, jul. 2008.
- BERTILSSON, M.; OLOFSSON, K.; LIDÉN, G. Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and cofermentation of pretreated spruce. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 8, jan. 2009.
- BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA, N. J. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, 2010.
- BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Biotechnology for Biofuels Comparing the xylose reductase / xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 16, p. 0-8, 2008.
- BHAT, R. R.; JOSHI, S.; KOTHARI, R. M. A simple method for the rapid and economical immobilization of glucose isomerase. **Enzyme and microbial technology**, v. 1, p. 113-116, 1979.
- BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. **Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 280-300, 1996.
- BLOW, D. M. et al. Structure and mechanism of D-xylose isomerase. **Faraday Discussions**, n. 93, p. 67-73, 1992.

BOLES, E; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, n.1, p.85-111, 1997.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein–Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248–254, 1976.

BRUINENBERG, P. M. et al. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 256-260, 1984.

BRUINENBERG, P. M. et al. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 287-292, 1983. b

BRUINENBERG, P.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. **Journal of general Microbiology**, n. 129, p. 965-971, 1983. a.

BUČKO, M. et al. Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems. v. 66, n. 11, p. 983-998, 2012.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.  $\beta$ -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Science Journal**, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2005.

CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Bioresource Technology Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675-4683, nov. 2011.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Application of a compatible xylose isomerase in simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 1, p. 32-39, fev. 2000.

CHANG, Q.; GRIEST, T. Functional studies of aldo-keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica Biophysica Acta.**, v. 1773, n. 3, p. 321-329, 2007.

CHIANG, L. C. et al. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 2, p. 284-9, ago. 1981b1981a.

CHIANG, L. et al. Enzymatic Preparation D-Xylulose Xylose. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 1, p. 66-69, 1981b.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, p. 944-956, 1994.

FAO 2011 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Faostats**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em 11 março 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

GIORDANO, R. L. C. **Estudo da coimobilização de glicoamilase e levedura para a fermentação alcoólica de matéria-prima amilácea**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, SP, 1992.

GIORDANO, R. L. C. et al. Study of a biocatalyst to produce ethanol from starch: COimmobilization of glucoamylase and yeast in gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 643-654, 2000a.

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. A study on intraparticle diffusion effects in enzymatic reactions: glucose-fructose isomerization. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 159-166, 2000b.

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. Analysis of a Taylor-Poiseuille flow reactor - II: reactor modelling and performance assessment using glucose-fructose isomerization as test reaction. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n.18, p. 3611-3626, 2000

GIORDANO, R. L. C.; TROVATI, J.; SCHMIDELL, W. . Continuous production of ethanol from starch using glucoamylase and yeast coimmobilized in pectin gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 47-61, 2008.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, jul. 2010.

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.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GOUVEIA, E. R. et al. Quim. Nova., **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; BERNER, S.; SKOOG, K. Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* using the respiratory inhibitor azide. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 24, p. 287-293, 1986.

HAHN-HAGERDAL., B.; PAMMENT., N. Microbial pentose metabolism. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.13, p.1207-1209, 2004.

HAMACHER, T.; BECKER, J. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783-2788, 2002.

HECTOR, R. E. et al. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 675-684, set. 2008.

HECTOR, R. E. et al. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 84, 2013.

HOCHSTER, R. M.; WATSON, R. W. Enzymatic Isomerization of D -Xylose to D-Xylulose. **Archives of Biochemistry and Biophysics** n. 3105, p. 120-129, 1953.

JANIS, J. et al. Characterization of the pH-dependent dissociation of a multimeric metalloprotein *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase by ESI FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 43, n. April, p. 1376-1380, 2008.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 320-6, jun. 2006.

Jeffries, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, n. 27, p. 1-32, 1983

JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. **FEMS yeast research**, v. 2, p. 277-282, 2002.

JOJIMA, T. et al. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 471-80, jan. 2010.

KATO, H. et al. Improvements in ethanol production from xylose by mating recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1585-92, 2012.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, p. 776-783, 1993.

- KOVALEVSKY, A. et al. Inhibition of D-xylose isomerase by polyols: atomic details by joint X-ray/neutron crystallography. **Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography**, v. 68, p. 1201-1206, set. 2012.
- KUYPER, M. et al. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS yeast research**, v. 4, n. 6, p. 655-64, 2004.
- LADISCH, M. R., EMERY, A., RODWELL, V. W. Economic Implications of Purification of Glucose Isomerase Prior to Immobilization. **Industrial Engineering Chemistry Process Design and Development**, v.16. n. 3, p. 309-313, 1977.
- LASTICK, S. M. et al. Simultaneous fermentation and isomerization of xylose. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 30, p. 574-579, 1989.
- LEANDRO, M. J.; SPENCER-MARTINS, I.; GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1646-55, jun. 2008.
- LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. Fermentation of D -xylose by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 615-618, 1997.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.
- LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of bacteriology**, v. 143, n. 3, p. 1384-94, set. 1980.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.
- LINDBERG, B; SLESSOR, .K.N. Preparative separations of sugars on bisulphite resins **Carbohydrate Research**, v. 5, n. 3, p.286–291, 1967.
- MAIER, A. et al. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. **FEMS yeast research**, n. 2,p. 539–550, 2002.
- MARIS, A. J. A. VAN et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.
- MARIS, A. VAN et al. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 108, p. 179-204, 2007.

MORAES, G. S. **Influência da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da xilose**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

OLIVIER, S. P.; DU TOIT, P. J. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. II. Optimization of the xylose isomerase reaction for isomerization of xylose as well as sugar cane bagasse hydrolyzate to xylulose in laboratory-scale units. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n.5, p.684–699, 1986.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and microbial technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

OLSSON, L.; LINDÉN, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. A rapid chromatographic method for the production of preparative amounts of xylulose. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, p. 388-394, 1994.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues . I: sugarcane bagasse. v. 74, 2000.

PEREIRA JR., N. **Biotecnologia de lignocelulósicos para a produção de etanol e o contexto de biorrefinaria**. Conferência Plenária, I Simpósio de biotecnologia da UFSCar, São Carlos, 2007.

PIŠKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, n. 22, p. 183-186, 2006.

PITKÄNEN, J.-P. et al. Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 827-37, jun. 2005.

PRONK, J. T. et al. Preparation of D-xylulose from D-xylose. **Enzyme and microbial technology**, v. 10, p. 537-542, 1988.

PURDUE RESEARCH FOUNDATION (W. Lafayette, Ind). Cheng Shung Cong. **Production of ethanol by yeast using xylulose**. U.S. n. 4,490,468, 25 dez.

RAO, K. 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.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v.23, n.2, p. 257-261, 2000.

RIZZI, M. et al.. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-xylitol-de- hydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermenttaion and Bioengineering**, v. 67, p.20-24, 1989.

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100–109, 2008.

- RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. 5, p. 1-7, 2010.
- SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, p. 279-291, 2003.
- SALOHEIMO, A. et al. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 1041-52, 2007.
- SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intermediary Metabolite Concentrations in Xylulose- and Glucose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, p. 120-126, jan. 1990.
- SHULER, M.L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering: Basic concept. 2. ed. Prentice Hall, 2002.
- SILVA, C. R. et al. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. 1, p. 35-42, 5 jan. 2012.
- SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir de xilose e hemicelulose de bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- TOIVOLA, A et al. Alcoholic Fermentation of d-Xylose by Yeasts. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221-3, 1984.
- TROVATI, J. ; GIORDANO, R. C. ; GIORDANO, R. L. C. . Improving the Performance of a Continuous Process for the Production of Ethanol from Starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, p. 76-90, 2009.
- VERDUYN, C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 60, n. 3-4, p. 325-53, 1991.
- WALFRIDSSON, M. et al. 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, n. 12, p. 4648-4651, 1996.
- WERNER-WASHBURNE, M. et al. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 383-401, 1993.
- YUAN, D. et al. Bioresource Technology A viable method and configuration for fermenting biomass sugars to ethanol using native *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**, v. 117, p. 92-98, 2012.
- YUAN, D. et al. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3246-3253, 2011.