

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THAIS SUZANE DOS SANTOS MILESSI

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DE HEMICELULOSE DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO *Saccharomyces
cerevisiae* SELVAGEM E GENETICAMENTE MODIFICADA
IMOBILIZADAS**

São Carlos
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THAIS SUZANE DOS SANTOS MILESSI

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DE HEMICELULOSE DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO *Saccharomyces
cerevisiae* SELVAGEM E GENETICAMENTE MODIFICADA
IMOBILIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de doutora em engenharia química.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Raquel de Lima Camargo Giordano

Co-orientação: Prof.^a Dr.^a Teresa Cristina Zangirolami


São Carlos
2017

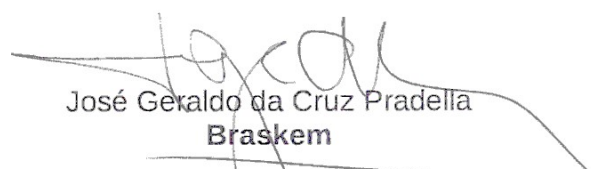
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE THAIS SUZANE DOS SANTOS MILESSI APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE MARÇO DE 2017.

BANCA EXAMINADORA:


Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, UFSCar


Roberto de Campos Giordano
UFSCar


Paulo Waldir Tardioli
UFSCar


José Geraldo da Cruz Pradella
Braskem


Álvaro Baptista-Neto
UNESP

Dedico esta tese à todas as mulheres que diariamente enfrentam suas batalhas individuais por superação e reconhecimento. Em especial, à minha prima Taymara (in memorian) e minha madrinha Sirley (in memorian), as quais já cumpriram sua história corajosamente e partiram durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e à Nossa Senhora Aparecida pela fé e coragem em sempre seguir em frente e não desistir diante dos inúmeros desafios enfrentados.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Raquel de Lima Camargo Giordano, pela dedicação, oportunidade, confiança, paciência e por tantos momentos de aprendizado, não somente de caráter acadêmico.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a. Teresa Cristina Zangirolami, por todo apoio, paciência e compreensão, e por sempre estar disponível para auxiliar, especialmente durante a realização dos ensaios contínuos.

Ao meu marido, Tayrone, com amor, pelo incentivo, apoio e confiança constantes, principalmente durante o doutorado sanduíche. Por toda paciência, carinho e companheirismo, por manter a calma nos momentos de desespero e pela companhia nas inúmeras amostras de madrugada.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim, por nunca me deixarem desistir e pela educação e amor incondicional sem os quais eu não teria chegado até aqui.

À minha família, pela compreensão e apoio para me tornar a primeira doutora da família, apesar da distância e de minha ausência.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Johan M. Thevelein por me receber em seu laboratório e orientar durante meu doutorado sanduíche e à todos os amigos da Bélgica, em especial Raquel, Bruna, Edgard e Gert, sem os quais a experiência de morar fora não teria sido a mesma e os quais carrego para sempre em meu coração, vocês foram minha família belga.

Aos técnicos e funcionários do laboratório, em especial ao Amadeus e Gentil (*in memoriam*) pela disponibilidade e ajuda e aos colegas de laboratório do Lafac, Labenz e do departamento que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos Andreza Longati, Felipe Corradini, Angelina, Murilo, Zé Fuzer, Ramon e Sarah, pela amizade sem igual, pelos momentos de descontração e por tornarem São Carlos minha casa.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho e apesar de não citados jamais serão esquecidos.

Afinal, aquilo que amamos sempre será parte de nós.
(J. K. Rowling)

RESUMO

No processo de produção de etanol a partir da fração hemicelulósica, a utilização de xilooligômeros como substrato reduz o risco de contaminação, favorecendo o emprego da tecnologia em escala industrial. Para isso, um biocatalisador contendo xilanases, xilose isomerase (XI) e levedura co-imobilizadas em gel de alginato de cálcio foi desenvolvido e o processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneos (SHIF) de xilooligômeros foi estudado. Primeiramente, as xilanases presentes no produto Multifect CX XL A03139 (XAS-5) e a xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (XynA) foram selecionadas para compor os *beads* do biocatalisador. XAS-5 apresentou melhor conversão (78,7%) e maior produção de xilose na hidrólise da xilana de faia, enquanto XynA apresentou exclusiva atividade de endoxilanase. Realizou-se a imobilização e estabilização da XynA em quitosana-glutaraldeído, quitosana-glioxil e agarose-glioxil. Apesar da enzima ser eficientemente imobilizada nos três suportes, o derivado agarose-glioxil-XynA se destacou por apresentar uma estabilização notável nas condições testadas (8600 vezes). Estudos do processo SHIF foram realizados com xilana de bétula, observando-se produção de etanol (0,160 g/g e 0,092 g/L.h) e acúmulo de xilose, indicando redução da atividade da XI. Realizou-se então, um estudo para identificar possíveis inibidores da XI (pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} e XOS), constatando-se que Ca^{2+} é um inibidor enquanto Mg^{2+} é um ativador da enzima, sendo suas ações potencializadas em pHs ácidos. Comprovou-se também que XI é inibida por XOS, observando-se queda da atividade de XI (31,6%) na presença de 7,0 g/L de xilobiose. Desta forma, tornou-se interessante avaliar o processo SIF com uma levedura recombinante, capaz de expressar XI. Em ensaios em batelada, a levedura GSE16-T18 (T18), encapsulada em gel de alginato, mostrou-se eficiente na fermentação de xilose, consumindo 40 g/L de xilose em 4 h e produzindo 14,4 g/L de etanol, com rendimento de 0,422 g/g e produtividade de 3,61 g/L.h. O encapsulamento em gel de alginato de cálcio também protegeu a levedura da ação de inibidores, como o ácido acético. A T18 encapsulada foi capaz de realizar 10 ciclos consecutivos em bateladas repetidas (meio contendo extrato de levedura, peptona e 40 g/L de substrato), mantendo mesma produtividade e elevado rendimento, além de fermentar eficientemente hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, contendo 60 g/L de açúcares fermentescíveis e alto teor de inibidores. A levedura GSE16-T18 HAA1, modificada geneticamente para ser mais tolerante ao ácido acético, foi também estudada, com resultados superiores a T18 nas fermentações de hidrolisado. Fermentações em modo contínuo foram realizadas em reator de leito fixo utilizando a levedura T18-HAA1 imobilizada, com diferentes concentrações de xilose na alimentação (40, 60, 80 e 120 g/L). O reator foi operado por até 15 dias, sem ocorrência de contaminação por bactérias, com rendimento 0,45 g/g, produtividade em etanol de 4,8 g/L.h e seletividade de 31 $\frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{\text{g}_{\text{xilitol}}}$ (60 g/L de xilose na alimentação). Para as concentrações superiores a 60 g/L, a conversão diminuiu após 4 dias de operação contínua, indicando perda de viabilidade celular devido à ação do etanol quando presente em concentrações acima de 30 g/L e da limitação de oxigênio e nutrientes no sistema.

Palavras-chave: Bioetanol. Hemicelulose. Imobilização enzimática. Imobilização celular. *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Hidrólise, Isomerização e Fermentação Simultâneas (SHIF).

ABSTRACT

In ethanol production process from hemicellulosic fraction, the use of xylooligomers (XOS) as substrate reduce the contamination risk, favoring its application at industrial scale. Thus, a biocatalyst, containing xylanases, xylose isomerase (XI) and yeast co-immobilized in calcium alginate gel, was developed and XOS simultaneous hydrolysis, isomerization and fermentation (SHIF) process was studied. Firstly, xylanases from Multifect CX XL A03139 (XAS-5), a commercial enzyme preparation, and the recombinant xylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) were selected to compose biocatalyst beads. XAS-5 presented better conversion (78.7%) and higher xylose production in the hydrolysis of beechwood xylan, while XynA showed exclusive endoxylanase activity. The immobilization and stabilization of XynA were performed in chitosan-glutaraldehyde, chitosan-glyoxyl and agarose-glyoxyl. Although the enzyme was efficiently immobilized on all supports, the agarose-glyoxyl-XynA derivative was notable for exhibiting remarkable stabilization under tested conditions (8600 times). Studies of SHIF process were carried out with birchwood xylan, leading to ethanol production (0.160 g/g and 0.092 g/L.h) and xylose accumulation, which indicated XI activity decrease. Further experiments were then performed to identify possible inhibitors of XI (pH, Ca²⁺, Mg²⁺ and xylooligosaccharides). Ca²⁺ was identified as an inhibitor, while Mg²⁺ acts as an activator of the enzyme, and both actions are potentiated at acidic pHs. XI is also inhibited by XOS, with a decrease of 31.6% in XI activity in the presence of 7.0 g/L of xylobiose. For this reason, it was decided to evaluate SHIF process with a recombinant yeast, capable of expressing XI. In batch runs, GSE16-T18 (T18) yeast encapsulated in alginate gel was capable to ferment xylose efficiently, consuming 40 g/L of xylose in 4 h and producing 14.4 g/L of ethanol, with yield of 0.422 g/g and productivity of 3.61 g/L.h. Calcium alginate gel encapsulation also contributed to protect yeast from the action of inhibitors, such as acetic acid. The encapsulated T18 was able to perform 10 consecutive cycles in repeated batch (yeast extract-peptone medium with 40 g/L of xylose), keeping the same productivity and high yields. It also fermented efficiently sugarcane bagasse hydrolysate, containing 60 g/L of fermentable sugars and high grade of inhibitors. The modified yeast to be more tolerant to acetic acid, GSE16-T18 HAA1, was also studied, exhibiting superior performance in comparison to T18 for hydrolysate fermentations. Continuous experiments were conducted in a fixed bed reactor using the T18-HAA1 yeast immobilized, with different xylose concentrations (40, 60, 80 and 120 g/L) in the feed medium. The reactor was operated up to 15 days, without bacterial contamination, with yield of 0.45 g/g, productivity of 4.8 g/L.h and selectivity of 31 g_{ethanol}/g_{xylytol} (60 g/L of xylose in the feed). For the concentrations higher than 60 g/L, the conversion decreased after 4 days of continuous operation, indicating loss of cell viability due to hazardous effect of ethanol when present at 30 g/L or more, as well as limitation of oxygen and nutrients in the system.

Keywords: Bioethanol. Hemicellulose. Enzyme immobilization. Cell immobilization. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Simultaneous Hydrolysis Isomerization and Fermentation (SHIF).

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Rota de produção de etanol para diferentes matérias primas.....	37
Figura 2.2 – Parte da composição estrutural da hemicelulose.....	40
Figura 2.3 – Aplicação industrial dos principais componentes da biomassa lignocelulósica..	41
Figura 2.4 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica.....	43
Figura 2.5 – Fluxograma do pré-tratamento organossolve da biomassa vegetal.....	47
Figura 2.6 – Ação das enzimas necessárias para a hidrólise enzimática total da xilana.....	50
Figura 2.7 – Influência de ramificações na ação das xilanases das famílias 10 (a) e 11 (b).....	51
Figura 2.8 - Esquema da ação do sítio catalítico da β -xilosidase de <i>Selenomonas ruminantium</i>	52
Figura 2.9 - Esquema simplificado do metabolismo de xilose e glicose pela integração das vias glicolítica e pentose fosfato	53
Figura 2.10 – Reação estequiométrica e fator de conversão teórico de xilose em etanol (Yp/s) em condições anaeróbias	54
Figura 2.11 - Estrutura da xilose isomerase de <i>Streptomyces rubiginosus</i>	56
Figura 2.12 – Imobilização e estabilização de enzima por meio de ligação multipontual.....	62
Figura 2.13 – Estrutura principal da quitosana.....	63
Figura 2.14 – Estrutura principal da agarose, onde as unidades de dissacarídeos que se repetem são chamados de agarobiose	63
Figura 2.15 – Parte da rede estrutural do alginato de sódio, onde G – (1-4)- α -L-guluronato e M – (1-4)- β -D-manuronato	66
Figura 2.16 – Esquematização da reação de gelificação do alginato de sódio com cloreto de cálcio	67
Figura 2.17 – Processo de produção de etanol a partir de xilose utilizando isomerização e fermentação em etapas separadas (A) e isomerização e fermentação simultâneas (SIF) da xilose (B).....	68
Figura 3.1 – Etapas realizadas visando o desenvolvimento de tecnologia escalonável de produção de etanol 2G a partir da SHIF da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.....	73
Figura 3.2 – Sistema utilizado na etapa de co-imobilização de enzimas e levedura em gel de alginato de cálcio.....	82

Figura 3.3 – Esquema do processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) por biocatalisador imobilizado contendo xilanase, xilose isomerase e <i>S. cerevisiae</i>	83
Figura 3.4 – Frascos utilizados nos experimentos com levedura geneticamente modificada.....	85
Figura 3.5 – Esquema do bioreator utilizado nos experimentos conduzidos em modo contínuo: (A) detalhes estruturais e (B) carregado com meio e beads de biocatalisador.....	86
Figura 3.6 – Sistema utilizado para a produção contínua de etanol a partir de xilose.....	87
Figura 4.1 – Eletroforese dos preparados enzimáticos avaliados.....	94
Figura 4.2 – Perfis de atividade de xilanases dos preparados enzimáticos avaliados em função do pH (atividade medida com xilana de bétula 1%, 50°C - tampão citrato 50mM (pH 4 e 5), tampão fosfato 50 mM (pH 7 e 6) e tampão bicarbonato de sódio 50mM (pH 8).....	95
Figura 4.3 – Hidrólise enzimática da fração solúvel da xilana de faia (25,4 g/L), 50°C, pH 5,6 (tampão citrato 50 mM) pela ação das xilanases presentes nos preparados enzimáticos testados ($150 \text{ UI/g}_{\text{xilana}} = 3810 \text{ UI/L}$).....	96
Figura 4.4 – Cinética de imobilização de XynA. A) Atividade residual para os suportes ativados com glioxil: (□) sobrenadante da quitosana-glioxil; (○) sobrenadante da agarose-glioxil; (▲) controle. Condições de imobilização: tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,0, 25°C. B) Atividade residual para o suporte quitosana glutaraldeído: (○) sobrenadante; (Δ) controle. Condições de Imobilização: tampão fosfato 100 mM pH 7,0, 25°C.....	99
Figura 4.5 – Estrutura tridimensional da XynA mostrando os resíduos de lisina (azul), aminoácidos do sítio ativo (verde), os grupos N-terminais (laranja) e as regiões de baixa estabilidade na estrutura da proteína.....	100
Figura 4.6 – Inativação de XynA solúvel e imobilizada em diferentes suportes. O processo foi realizado a 56 °C em tampão citrato 50 mM pH 5,6. A) solúvel ($A_0=193\pm 5.9 \text{ UI/mL}$); B) quitosana-glutaraldeído-XynA ($B_0=12.9\pm 0.2 \text{ UI/g}_{\text{gel}}$); C) quitosana-glioxil-XynA ($C_0=42.9\pm 3.3 \text{ UI/g}_{\text{gel}}$); D) agarose-glioxil-XynA ($D_0=44.84\pm 3.7 \text{ UI/g}_{\text{gel}}$).....	103
Figura 4.7 – Hidrólise da xilana de bétula (13 mg/ml, pH 5,5, 50°C) pela ação da XynA solúvel (□) e agarose-glioxil-XynA (■). Quantificados por HPLC - XOS (A – xilana convencional, B – xilana solúvel) e açúcares redutores (C – xilana convencional; D – xilana solúvel).....	105
Figura 4.8 – Ciclos consecutivos de hidrólise da fração solúvel da xilana de bétula (13 mg/mL) utilizando o derivado agarose-glioxil-XynA (1.95 UI/mL) (50°C e pH 5,5).....	108

Figura 4.9 – Acompanhamento dos teores de XOS, xilose e etanol durante a SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm e 32°C.....	115
Figura 4.10 – Acompanhamento do pH e dos teores de xilose, etanol e xilitol durante a SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm e 32°C.....	115
Figura 4.11– Influência do pH na atividade de XI observada em frutose 2M, 60°C.....	118
Figura 4.12 – Influência do pH na interferência dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na atividade de XI medida com frutose 2M a 60°C.....	119
Figura 4.13 – Acompanhamento dos teores de XOS e xilose da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm, 32°C e pH 5,7.....	121
Figura 4.14 – Acompanhamento do pH e dos teores de xilose, etanol e xilitol da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150 rpm, 32°C e pH 5,7.....	121
Figura 4.15 – Consumo de xilose da SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura) 150rpm e 32°C. Controle foi realizado com xilose comercial.....	124
Figura 4.16 – Produção de etanol da SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura) 150 rpm, 32°C e pH 5,7. Controle foi realizado com xilose comercial.....	124
Figura 4.17 – Velocidade de isomerização de frutose à glicose catalisada pela XI na presença de diferentes concentrações de X2 (0; 1,75; 3,5 e 7,0 g/L) – 60°C e pH 7,0.....	125
Figura 4.18 – Fermentação de YPX 40 g/L pela levedura T18 em diferentes concentrações de ácido acético (35°C, 150 rpm e pH 5,2). Os experimentos contendo células livres (A) continham DO 4 inicial e os com células imobilizadas (B) a proporção de 1:1 volume de <i>beads</i> e volume de meio. Ethanol Red foi utilizada como controle negativo.....	128
Figura 4.19 – Fermentação de YPX 40 g/L + 8 g/L de ácido acético pela T18 livre e imobilizada. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se a mesma concentração inicial de células (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	131
Figura 4.20 – Fermentação de YPX 40 g/L com diferentes concentrações de ácido acético pela levedura T18 imobilizada. Os experimentos foram conduzidos em volume de 8mL utilizando-se a proporção 1:1 v de <i>beads</i> e v de meio (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	133
Figura 4.21 – Microfotografia eletrônica de varredura (MEV) dos <i>beads</i> de alginato de cálcio contendo 10% m/m da levedura T18 após fermentação de xilose com 8 g/L de ácido acético ampliados 1000 vezes (A) e ampliados 2000 vezes (B).....	134

Figura 4.22 – Acompanhamento dos ciclos da levedura T18 imobilizada em meio YPX 40 g/L com diferentes concentrações de ácido acético: A- 0 g/L; B-4 g/L; C-8 g/L; D-9g/L; E-10 g/L; F-11 g/L (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	136
Figura 4.23 – Viabilidade da levedura T18 durante os ciclos em meio YPX 40 g/L em diferentes concentrações de ácido acético: A- 0 g/L; B-4 g/L; C-8 g/L; D-9 g/L; E-10 g/L; F- 11g/L (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	137
Figura 4.24 – Produtividade, acúmulo de ácido acético e acúmulo de etanol nos ciclos em meio YPX 40g/L e diferentes concentrações de ácido acético. Os experimentos foram conduzidos em volume de 8mL utilizando-se a proporção 1:1 v de beads e v de meio (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	138
Figura 4.25 – Acompanhamento da conversão de açúcares fermentescíveis (AF) de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela levedura T18 livre e imobilizada (35°C, 150 rpm e pH 5,2). A levedura Ethanol Red foi utilizada como controle negativo....	139
Figura 4.26 – Acompanhamento da conversão dos açúcares fermentescíveis (AF) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) pela levedura T18 imobilizada (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	140
Figura 4.27 – Viabilidade celular da T18 imobilizada ao final dos ciclos realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	141
Figura 4.28 – Perfis dos ciclos da levedura T18 imobilizada utilizando-se hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) com e sem lavagem das células entre os ciclos (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	143
Figura 4.29 – Acompanhamento dos ciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) (35°C, 150 rpm e pH 5,2) pelas leveduras T18 e T18-HAA1 imobilizadas. Onde (A) consumo de açúcares no processo; (B) viabilidade da levedura T18 e (C) viabilidade da levedura T18-HAA1.....	144
Figura 4.30 – Fermentação de YPX 40 g/L com diferentes concentrações de ácido acético pela levedura T18 imobilizada onde (A) corresponde aos <i>beads</i> contendo apenas T18 e (B) apresenta os <i>beads</i> com T18 e XI co-imobilizadas (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	146
Figura 4.31 - Ciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com elevado teor inibidores suplementado com uréia (2 g/L) utilizando <i>beads</i> contendo a levedura T18 pura e co-imobilizada com XI (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	147
Figura 4.32 - Microfotografia eletrônica de varredura (MEV) dos <i>beads</i> de alginato de cálcio contendo a levedura T18 imobilizada (A) e co-imobilizada com a enzima XI.....	148

Figura 4.33 – Detalhe do reator utilizado no processo contínuo de produção de etanol preenchido com os <i>beads</i> na proporção $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$	150
Figura 4.34 – Resultados do experimento contínuo em reator de leito fixo para produção de etanol a partir de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (35°C, pH 5,2, $\tau = 10,9h$, $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$) com concentração inicial de xilose de 116 g/L. (A) Concentrações de xilose e etanol; (B) Seletividade e concentrações de etanol e xilitol; (C) Consumo de xilose e (D) pH.....	152
Figura 4.35 – Acompanhamento dos processos contínuos de produção de etanol pela levedura T18-HAA1 imobilizada a partir de diferentes concentrações de xilose na alimentação (35°C, pH 5,2, $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$).....	155
Figura 4.36 – Acompanhamento das concentrações de xilose e etanol nos processos contínuos de produção de etanol pela levedura T18-HAA1 imobilizada a partir de (A) 40 g/L; (B) 60 g/L; (C) 80 g/L e (D) 120 g/L de xilose (35°C, pH 5,2, $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$).....	156
Figura 4.37 – Acompanhamento do processo contínuo de produção de etanol a partir de 80 g/L de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (35°C, pH 5,2, $\tau = 7,3h$, $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$). (A) Consumo de xilose/glicose; (B) Concentrações de xilose e etanol; (C) Seletividade e concentrações de etanol e xilitol e (D) pH.....	160

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição de diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar	42
Tabela 3.1 – Preparados enzimáticos avaliados	75
Tabela 3.2 – Composição dos meios utilizados na avaliação da influência dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na atividade de XI realizada em frutose 2M, 60°C e variação de pH de 5,0 a 8,0.....	83
Tabela 4.1 – Características dos preparados enzimáticos avaliados	94
Tabela 4.2 – Perfis dos XOS produzidos após 24h de hidrólise enzimática da fração solúvel de xilana de faia (25,4g/L) catalisada pela ação das xilanases estudadas (150 UI/g _{xilana}) – 50°C pH 5,6.....	97
Tabela 4.3 – Influência da carga enzimática oferecida nos parâmetros de imobilização da enzima XynA em agarose-glioxil. Carga enzimática (UI/g _{gel}) = unidades de enzima oferecida para imobilização; RI (%) = rendimento de imobilização, RA = Atividade recuperada (%), At _{gel} (UI/g _{gel}) = atividade do gel após imobilização.....	101
Tabela 4.4 – Produção de xilohexaose (X6); xilopentaose (X5); xilotetraose (X4); xilotriose (X3); xilobiose (X2) e xilose (X1) na hidrólise das xilanas convencional e solúvel (13 mg/mL, pH 5.6, 50°C) catalisada pela XynA solúvel e imobilizada (1.95 UI/mL).....	107
Tabela 4.5 – Composição da fração líquida obtida no pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar (195°C e 10 min – 1:10 sólido/líquido), onde X6= xilohexaose, X5= xilopentaose, X4= xilotetraose, X3= xilotriose e X2= xilobiose.....	111
Tabela 4.6 – Caracterização do substrato SHIF (xilana de bétula 108 g/L) após pré-hidrólise com XynA (150UI/g _{xilana}) – 50°, pH 5,6, 24h.....	114
Tabela 4.7 – Acompanhamento da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm e 32°C.....	114
Tabela 4.8 – Experimento controle realizado com xilose (100 g/L) como substrato, 150 rpm 32°C.....	116
Tabela 4.9 – Influência dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na atividade de XI realizada em frutose 2M, 60°C.....	117
Tabela 4.10 – Acompanhamento da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150 rpm e 32°C e pH 5,7.....	120
Tabela 4.11 – Experimento controle realizado com xilose (26 g/L) como substrato, 150 rpm 32°C.....	122

Tabela 4.12 – SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm, 32°C e pH 5,7. Controle realizado com xilose comercial.....	123
Tabela 4.13 – Parâmetros da SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura) 150 rpm, 32°C e pH 5,7. A - Controle foi realizado com xilose comercial; B- fração líquida hidrotérmica; C – fração líquida hidrotérmica + XAS-5 (150UI/gxos).....	124
Tabela 4.14 – Parâmetros da fermentação da levedura T18 em meio YPX 40 g/L contendo diferentes concentrações de ácido acético. Os experimentos contendo células livres foram inoculados com DO 4 e os experimentos com células imobilizadas com a proporção de 1:1 volume de beads e volume de meio (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	128
Tabela 4.15 – Parâmetros da fermentação da levedura T18 livre e imobilizada em meio YPX 40 g/L e 8,0 g/L de ácido acético. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se a mesma concentração de células (35°C, 150 rpm e pH 5,2).....	131
Tabela 4.16 – Parâmetros dos ciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) pela levedura T18 imobilizada em alginato e cálcio (35°, 150 rpm e pH 5,2).....	141
Tabela 4.17 – Características do processo contínuo de produção de etanol por células imobilizadas de T18-HAA1 a partir de xilose.....	149
Tabela 4.18 – Resultados do experimento contínuo em reator de leito fixo para produção de etanol a partir de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (35°C, pH 5,2, $\tau = 10,9h$, 1Vbeads/1Vmeio) com concentração inicial de xilose de 116 g/L.....	151
Tabela 4.19 – Características dos processos contínuos de produção de etanol por células imobilizadas de T18-HAA1 (Ca-alginato 1% + 10% m/m T18-HAA1) em reator de leito fixo conduzidos sob diferentes concentrações de xilose na alimentação.....	154
Tabela 4.20 – Viabilidade final das células imobilizadas de T18-HAA1 nos ensaios contínuos de produção de etanol a partir de diferentes concentrações de xilose (35°C, pH 5,2, 1Vbeads/1Vmeio).....	156
Tabela 4.21 – Características do processo contínuo de produção de etanol por células imobilizadas de T18-HAA1 a partir de xilose.....	158
Tabela 4.22 – Produção contínua de etanol a partir de 80 g/L de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (condições iniciais: 35°C, pH 5,2, $\tau = 7,3h$, 1V _{beads} /1V _{meio}).....	159
Tabela 4.23 – Comparação da produção contínua de etanol a partir de xilose utilizando levedura geneticamente modificada com a SIF de xilose empregando levedura selvagem e xilose isomerase	164

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	29
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
2.1. Sustentabilidade e Biocombustíveis	35
2.2. Bioetanol.....	36
2.3 Materiais/resíduos lignocelulósicos	38
2.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar	42
2.4 Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos.....	43
2.5 Hidrólise da hemicelulose	44
2.5.1 Pré-tratamento Organossolve	47
2.5.2 Pré-tratamento Hidrotérmico	48
2.6 Hidrólise Enzimática da Xilana	49
2.6.1 Endoxilanasas	50
2.6.2 β -Xilosidasas	51
2.7 Produção de etanol a partir de xilose.....	52
2.7.1 Microrganismos selvagens produtores de etanol.....	54
2.7.2 Xilose Isomerase (XI).....	55
2.7.3 Microrganismos Geneticamente Modificados (OGM).....	56
2.8 Condução de processos utilizando células e enzimas imobilizadas.....	59
2.8.1 Imobilização de enzimas	60
2.8.2 Imobilização de células	64
2.9 Processo integrado de produção de etanol	67
2.10 Biorreatores de leito fixo para células e/ou enzimas imobilizadas.....	70
3. METODOLOGIA.....	73
3.1. Materiais.....	74
3.2. Seleção de xilanases	75
3.2.1. Estabilidade ao pH	75
3.2.2. Eletroforese	76
3.2.3. Hidrólise da xilana de faia	76
3.3. Imobilização de endoxilanase de Bacillus subtilis (XynA).....	76
3.3.1. Preparação de Agarose-glioxil.....	77
3.3.2. Preparação do gel de quitosana.....	77
3.3.3. Ativação do gel de quitosana com glioxil.....	77

3.3.4. Ativação do gel de quitosana com glutaraldeído.....	78
3.3.5. Imobilização de XynA em diferentes suportes	78
3.3.6. Inativação térmica da XynA	79
3.3.7. Hidrólise enzimática da xilana.....	80
3.3.8. Estabilidade Operacional	80
3.4. Pré-Tratamento Hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	80
3.5. Preparação do biocatalisador para o processo SHIF	81
3.5.1 Imobilização de Xilose Isomerase (XI)	81
3.5.2 Co-imobilização dos derivados de Xilanase, XI e <i>S. cerevisiae</i> em gel de alginato de cálcio	81
3.6. Ensaio de Hidrólise, Isomerização e Fermentação Simultâneas (SHIF).....	82
3.7 Estudo da influência do pH e dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a (XI).....	83
3.8 Experimentos utilizando levedura geneticamente modificada	84
3.8.1 Microrganismo e inóculo	84
3.8.2. Ensaio Fermentativo e Reciclos.....	84
3.8.3 Viabilidade celular	85
3.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	85
3.8.5 Experimentos contínuos de produção de etanol.....	86
3.9. Métodos analíticos.....	88
3.9.1. Medida da Atividade de Xilose Isomerase (XI).....	88
3.9.2. Medida da atividade de Xilanase	89
3.9.3. Medida das concentrações de xilooligosacarídeos, açúcares, etanol e xilitol	89
3.9.4. Medida da concentração de células.....	90
3.9.5. Quantificação de xilooligômeros totais.....	90
3.9.6. Quantificação de proteínas totais	90
3.10. Cálculos	90
3.10.1 Cálculo da conversão da hidrólise de xilana em XOS	90
3.10.2 Cálculos dos parâmetros fermentativos	91
4. RESULTADOS.....	93
4.1 Seleção de xilanases para aplicação no processo de SHIF	93
4.1.1 Caracterização das xilanases disponíveis para o <i>pool</i> do processo SHIF	93
4.1.2. Imobilização e estabilização da xilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (XynA)	98
4.2. Obtenção do substrato hemicelulósico rico em xilooligômeros para a SHIF	110

4.3 Estudos do Processo de Hidrólise, Isomerização e Fermentação Simultâneos (SHIF)	113
4.3.1 Estudos preliminares do processo SHIF	113
4.3.2 Estudos da influência do pH e dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a xilose isomerase	117
4.3.3 Ensaio SHIF com controle de pH e excesso de Mg^{2+}	120
4.3.4 Avaliação da influência dos XOS sob a ação catalítica da xilose isomerase (XI)	122
4.4. Experimentos em batelada utilizando <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada ..	126
4.4.1. Perfil de fermentação de xilose pela levedura T18 e efeito do ácido acético.....	127
4.4.2. Reciclos de células imobilizadas de T18 em meio sintético	135
4.4.3. Perfil da levedura T18 em hidrolisado hemicelulósico rico em xilose.....	138
4.4.4. Reciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	140
4.4.5. Ensaio utilizando a levedura T18-HAA1 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.....	143
4.4.6 Ensaio utilizando XI co-imobilizada com a T18	145
4.5. Experimentos contínuos de produção de etanol utilizando <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada.....	149
4.6. Comparação entre a produção contínua de etanol a partir de xilose utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> selvagem e geneticamente modificada	163
5. CONCLUSÕES.....	167
6. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	171
7. REFERÊNCIAS	173

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente, os biocombustíveis recebem destaque no cenário mundial, seja por apresentarem vantagens ambientais e socioeconômicas em relação aos combustíveis fósseis ou por representarem uma alternativa energética para a diminuição da emissão de gases do efeito estufa e atingir as metas estabelecidas na COP 21 (ANTUNES et al., 2014; COP 21, 2015).

Dentre os biocombustíveis, o bioetanol é uma alternativa interessante por ser uma fonte de energia limpa e sustentável (GÍRIO et al., 2010), podendo ser obtido a partir de matérias primas açucaradas, amiláceas e lignocelulósicas. Os materiais lignocelulósicos, por sua vez, apresentam-se como matérias-primas sustentáveis devido à sua constituição (até 70% de celulose e hemicelulose, que são polissacarídeos fermentescíveis), grande disponibilidade, baixo custo e por não competirem com a produção de alimentos (NIGAM; SINGH, 2011). Nesses materiais, a estrutura é preenchida por lignina, um material altamente hidrofóbico, que está ligada aos outros dois componentes.

No Brasil, o subproduto lignocelulósico mais abundante é o bagaço de cana-de-açúcar. A safra de cana-de-açúcar 2016/2017 está estimada pela CONAB em mais de 600 milhões de toneladas, resultando na geração de mais de 90 milhões de toneladas de bagaço, os quais, mesmo tendo uma parcela destinada à geração de energia, ainda representam um valioso recurso para a produção de etanol.

Sendo assim, o aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração se mostra uma alternativa de grande potencial, pois além de contribuir com a redução de gases do efeito estufa pode aumentar significativamente a produção de bioetanol sem a necessidade de aumentar a área cultivada.

A utilização de bagaço de cana, como ocorrerá com qualquer biomassa lignocelulósica, irá requerer uma etapa de pré-tratamento para ruptura da matriz do material fibroso e liberação dos açúcares fermentescíveis (MUSSATO et al., 2010). Os métodos de pré-tratamentos utilizados atualmente envolvem o emprego de ácidos, vapor, solventes orgânicos e agentes alcalinos (GIRIO et al., 2010). Nesta etapa, pode ocorrer a formação de compostos inibidores do metabolismo microbiano (como furfural e hidroximetil furfural) devido à degradação dos componentes da biomassa, podendo ser necessária uma etapa de destoxificação do hidrolisado (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

A viabilidade econômica da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos pede a utilização tanto das hexoses quanto das pentoses, as quais são provenientes, respectivamente, das frações celulósica e hemicelulósica da biomassa vegetal (SILVA et al, 2012). Desta maneira, o microrganismo ideal seria aquele capaz de utilizar todos os açúcares gerados na etapa de pré-tratamento, dos quais xilose e glicose representam a principal parcela (CANILHA et al, 2012; SILVA et al., 2012). A fração hemicelulósica, rica em xilose, é atualmente subutilizada, representando um grande desperdício de matéria prima rica em carbono. Assim sendo, o aproveitamento das pentoses provenientes da hemicelulose, embora crucial (SILVA, 2013), permanece como um grande desafio.

O conhecimento sobre espécies que fermentam pentoses ainda é limitado (HAHN-HARGERDAL et al., 1994). Microrganismos naturalmente fermentadores de pentoses, como as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Pachysolen tannophilus*, apresentam baixa tolerância a etanol, taxa de fermentação lenta e são altamente inibidos por compostos gerados durante o processo de pré-tratamento da biomassa (SILVA et al., 2012).

Atualmente, o organismo mais utilizado para produção de etanol a partir de hexoses é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua robustez, tolerância a altas concentrações de açúcar e seu elevado rendimento em etanol (ZHANG et al., 2010). Entretanto um obstáculo é que sua forma selvagem não possui o sistema enzimático necessário para o metabolismo de pentoses (FERREIRA et al., 2011).

S. cerevisiae, contudo, apesar de não metabolizar xilose, é capaz de fermentar xilulose a etanol. Assim sendo, uma alternativa para o aproveitamento da fração hemicelulósica seria a isomerização de xilose à xilulose seguida pela fermentação por *S. cerevisiae* (SILVA et al., 2012). A enzima glicose/xilose isomerase é amplamente utilizada na indústria para a produção de xarope de frutose a partir de amido de milho e catalisa também a isomerização reversível de xilose à xilulose (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000), a qual possui uma relação de equilíbrio xilose:xilulose de 5:1. Visando consumo total da xilose para viabilizar sua aplicação industrial, essa relação de equilíbrio deve ser contornada. Uma solução é a isomerização e fermentação simultâneas (SIF) da xilose, na qual a xilulose produzida pela enzima é continuamente removida pela levedura.

Adicionalmente, a utilização de enzimas e células imobilizadas permite também incorporarem-se outras vantagens ao processo como a facilidade de separação e recuperação do biocatalisador e a utilização de elevadas densidades celulares (SILVA et al., 2007). A imobilização pode, ainda, amenizar a inibição causada por compostos gerados no pré-

tratamento devido à formação de um microambiente nos *beads* (RAZMOVSKI; VUČUROVIĆ, 2012).

Silva (2013), buscando associar as vantagens dos biocatalisadores imobilizados com a estratégia de isomerização seguida de fermentação, desenvolveu um biocatalisador contendo xilose isomerase (XI) e *S. cerevisiae* co-imobilizadas em gel de alginato de cálcio. O gel de alginato de cálcio foi escolhido uma vez que este polímero natural é um suporte extensamente estudado e de grande aplicabilidade na imobilização de células viáveis (HERNÁNDEZ et al., 2010). Com essa proposta, obteve-se um rendimento de 0,34 g_{etanol}/g_{xilose} e produtividade de 1,8 g/L.h de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico ácido de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado. Contudo, a baixa velocidade de fermentação de pentoses por *S.cerevisiae* e a alta concentração de xilose no meio mostrou que o sistema era passível de contaminação por microrganismos consumidores de xilose.

Para contornar esse problema, foi proposto utilizar-se um meio de difícil assimilação por microrganismos contaminantes, os xilooligômeros obtidos pela solubilização de hemicelulose em condições brandas. Os heteropolissacarídeos que constituem a hemicelulose, dos quais xilana é o principal, são polímeros com cerca de 100 unidades de monômeros e sua solubilidade depende do número de unidades presente na cadeia (GRAY et al., 2007). Assim, a extração de xilana na forma de grandes oligômeros deve ser feita em condições que permitam a quebra de um número suficiente de ligações glicosídicas, reduzindo o peso molecular do polímero e assim solubilizando-o.

Na produção de etanol a partir de xilose, o uso de xilooligômeros como substrato irá requerer então mais uma etapa de hidrólise. A incorporação de um complexo de xilanasas e enzimas desramificantes no sistema catalítico que vinha sendo usado por Silva et al. (2012) originou a patente “Sistema catalítico e processo de obtenção de bioetanol 2G a partir de xilana/oligômeros de xilose”, depositada em 19/09/2014 sob o registro BR 10 2014 023395 4 (GIORDANO et al., 2014). Essa patente prevê também a possibilidade de utilização de *S. cerevisiae* geneticamente modificada para atuar simultaneamente com o sistema. Na presença da levedura geneticamente modificada, a isomerização de xilose a xilulose acontece “*in vivo*”, evitando eventual limitação na produção de etanol pela velocidade de isomerização “*in vitro*” catalisada por xilose isomerase imobilizada, também presente no sistema.

O presente trabalho aborda diferentes aspectos relativos ao processo de produção de etanol a partir de xilooligômeros extraídos de bagaço de cana de açúcar, com enzimas previamente imobilizadas e co-imobilizadas com levedura selvagem ou geneticamente

modificada em gel de alginato de cálcio. Nesse processo, aqui chamado SHIF, estarão ocorrendo simultaneamente a hidrólise dos xilooligômeros alimentados catalisada por xilanases e enzimas desramificantes, visando produção de xilose; isomerização da xilose a xilulose pela xilose isomerase, e fermentação da xilulose a etanol. O sistema catalítico constituído de enzimas e levedura co-imobilizados irá permitir operação de reator contínuo.

Os primeiros resultados, obtidos em batelada, e que foram objeto do pedido de patente depositado, mostraram a viabilidade da produção de etanol usando o sistema catalítico contendo complexo de xilanases e xilose isomerase imobilizadas covalentemente em quitosana e co-imobilizadas com levedura de panificação em gel de alginato de cálcio. Contudo, havia ainda um grande número de variáveis a serem investigadas para melhorar o desempenho do processo, tais como: 1) busca do complexo xilanolítico mais eficiente para a hidrólise dos xilooligômeros a xilose; 2) estudo específico da imobilização e da cinética reacional de cada uma das enzimas envolvidas; 3) diferentemente do que era observado com a alimentação direta de xilose, nos resultados iniciais (submetidos para patente) não se obteve conversão total de xilooligômeros a xilose, com o sistema sendo limitado pela isomerização, sendo necessário assim o entendimento desse fenômeno e a busca de soluções para evitar a limitação pela isomerização; 4) estudo do processo descontínuo e contínuo usando levedura selvagem; 5) estudo do processo descontínuo e contínuo usando levedura geneticamente modificada. As leveduras GSE16-T18 e GSE16-T18 HAA1, obtidas pelo grupo do Prof. Johan M. Thevelein, foram utilizadas neste trabalho.

Este trabalho focou, assim, em alguns dos pontos que requeriam trabalho específico para o desenvolvimento de um processo SHIF viável. Discriminam-se a seguir os objetivos deste trabalho:

- **Geral**

- Estudo do processo de produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas.

- **Específicos**

- Seleção de xilanases adequadas ao processo visando elevada conversão de xilana;
- Obtenção de um derivado de xilanase com elevada atividade catalítica e estabilidade para a aplicação na hidrólise da xilana;

- Estudo do processo cujos resultados iniciais geraram a patente BR 10 2014 023395 4 (GIORDANO et al., 2014) de produção de etanol 2G por hidrólise, isomerização e fermentação (SHIF) de oligômeros utilizando *S. cerevisiae* selvagem co-imobilizada com xilanase e xilose isomerase como biocatalisador;
- Entendimento da(s) causa(s) da redução da atividade catalítica de xilose isomerase quando se utiliza como substrato inicial xilooligômeros e busca de possíveis soluções
- Análise da estabilidade e do desempenho da levedura geneticamente modificada para consumo de xilose;
- Estudo da produção de etanol em modo contínuo utilizando *S. cerevisiae* recombinante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sustentabilidade e Biocombustíveis

A demanda global por energia aumentou significativamente nos últimos anos devido ao crescimento contínuo da população mundial e ao desenvolvimento exponencial de países como China e Índia (HARUN et al., 2010). Os combustíveis fósseis representam cerca de 80% da energia consumida mundialmente (NIGAM; SINGH, 2011) e estão associados a uma série de desvantagens como o esgotamento das reservas de petróleo, a emissão de gases causadores do efeito estufa e consequências ambientais atribuídas às emissões de dióxido de carbono, como as mudanças climáticas (MUSSATTO et al., 2010; TSIGIE et al., 2011).

As mudanças climáticas são um fenômeno mundialmente reconhecido e considerado um problema urgente e potencialmente irreversível pelos maiores líderes mundiais, por exemplo, países de primeiro mundo como França e Estados Unidos. Desta maneira, em 2015 foi realizada em Paris a COP 21 (Conference of the Parties) na qual se estabeleceu parâmetros importantes visando frear as emissões de gases do efeito estufa (como o CO₂) e lidar com as mudanças climáticas. No acordo global estabelecido na COP 21, os 195 países participantes se comprometeram a tomar medidas para evitar que a temperatura do planeta suba em 2°C até 2020. Para isso, uma ampla cooperação de todos os países é necessária para que ocorra uma significativa redução das emissões globais e consequentemente reversão desta situação (COP 21, 2015).

O setor de transportes contribui com 19% do CO₂ emitido mundialmente, o que corresponde a aproximadamente 8kg de CO₂ por galão de petróleo, e por mais de 70% do monóxido de carbono emitido (ADITIYA et al., 2016). Neste contexto, os biocombustíveis representam uma alternativa de energia limpa e sustentável com grande potencial como substituintes dos combustíveis fósseis, os quais além de aumentar a renda agrícola de países em desenvolvimento, podem contornar as desvantagens ligadas aos combustíveis fósseis e consequentemente reduzir as emissões de gases do efeito estufa (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005, ADITIYA et al., 2016).

Biocombustíveis referem-se à combustíveis produzidos a partir de biomassa vegetal, como por exemplo etanol e biodiesel. Dentre as diversas vantagens associadas aos biocombustíveis podemos citar o fato de serem facilmente obtidos a partir de biomassa vegetal abundante e de baixo custo e serem biodegradáveis (BALAT; BALAT, 2009).

Dentre os biocombustíveis, o bioetanol exerce um papel significativo na matriz energética mundial, uma vez que é utilizado principalmente na geração de energia, seja misturado com a gasolina ou em sua forma desidratada, recebendo destaque no Brasil devido à grande disponibilidade de matéria prima e ao histórico de pioneirismo do país neste combustível (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

2.2. Bioetanol

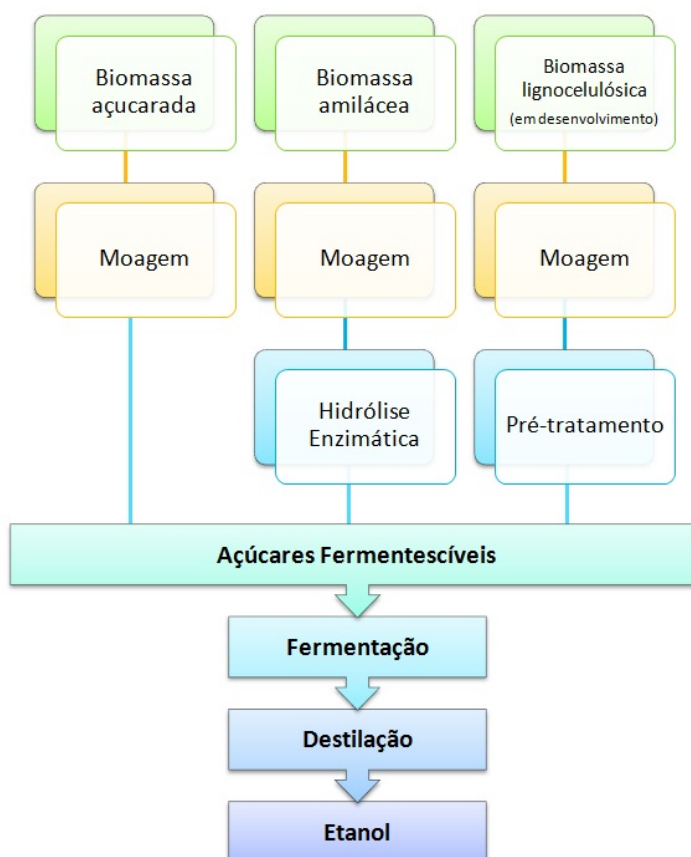
Bioetanol é o álcool etílico (C_2H_5OH), uma substância incolor, volátil, inflamável e totalmente solúvel em água (SILVA, 2009). Possui um elevado índice de octano (108) e apresenta um elevado teor de oxigênio (35% m/m), sendo assim um excelente aditivo para a gasolina, possibilitando uma combustão mais limpa uma vez que aumenta o teor de oxigênio do combustível (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008; GÍRIO et al., 2010).

Álcool combustível é produzido no Brasil desde 1927, entretanto devido ao alto custo de produção quando comparado aos combustíveis derivados de petróleo, apenas após a crise do petróleo nos anos 70 e com a consequente criação do Programa Nacional do Álcool (PróAlcool) que a produção de etanol ganhou importância no país (CERQUEIRA-LEITE et al., 2009; MUSSATTO et al., 2010). O Brasil é o produtor de bioetanol com a maior capacidade competitiva do mundo, possuindo um mercado interno estimulado pela produção de veículos flex (CANILHA et al., 2011).

A produção de etanol é realizada em três etapas: obtenção dos açúcares fermentescíveis; fermentação dos açúcares por microrganismos e separação e purificação do etanol, realizada geralmente por destilação, retificação e desidratação (MUSSATTO et al., 2010). As matérias primas utilizadas podem ser divididas em 3 grandes grupos, matérias primas açucaradas (cana-de-açúcar e beterraba), amiláceas (milho, trigo e arroz) e lignocelulósicas (madeira e palha) (JOHN, et al., 2011).

A principal diferença entre a produção de etanol a partir de biomassas açucaradas, amiláceas e lignocelulósicas está na etapa de obtenção dos açúcares fermentescíveis (Figura 2.1). Enquanto biomassas açucaradas necessitam somente de uma etapa de extração dos açúcares, a produção de etanol a partir de amiláceos necessita de uma etapa de hidrólise das cadeias de carboidratos para obtenção de um xarope de açúcares (MUSSATTO et al., 2010). Já a utilização da biomassa lignocelulósica necessita ainda de uma etapa de pré-tratamento para liberar os carboidratos fermentescíveis (NIGAM; SINGH, 2011).

Figura 2.1 – Rota de produção de etanol para diferentes matérias primas (MILESSI, 2012).



De acordo com a matéria prima e o processo de produção utilizados, o bioetanol pode ser de primeira ou segunda geração. O etanol de primeira geração é produzido em larga escala a partir de alimentos e culturas oleaginosas, como beterraba, cana-de-açúcar e milho e possui um processo bem estabelecido e com níveis econômicos viáveis (BRENNAN; OWENDE, 2010).

O etanol de segunda geração, por sua vez, é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, como por exemplo resíduos agrícolas e florestais (ADITIYA et al., 2016). Sua aplicação em larga escala encontra-se em desenvolvimento, possuindo ainda muitos gargalos para sua viabilidade econômica. Entretanto, apesar dos desafios ainda encontrados, a produção de bioetanol a partir desta matéria prima é uma alternativa sustentável promissora, uma vez que a biomassa lignocelulósica possui grande disponibilidade, baixo custo e não compete por terras cultiváveis com a produção de alimentos (NIGAM; SINGH, 2011; CHANDEL et al., 2012). Além disso, a produção de etanol 2G utilizando resíduos agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar, aumentaria a produtividade de etanol por hectare de

biomassa plantada, contribuindo para a redução da área cultivada para produção de etanol (PEREIRA et al., 2015).

Atualmente, tecnologias para produção de etanol de segunda geração são alvos de interesse de diversas empresas dos setores público e privado, como Novozymes, Oxiteno, Petrobrás e Granbio, os quais vêm investindo largamente em pesquisas para a viabilidade econômica e técnica deste biocombustível (MARQUES, 2011; SIMS et al., 2010). O grau de complexidade deste processo é mais elevado, pois envolve etapas não existentes na fermentação de matérias primas açucarada e amilácea, em especial o pré-tratamento da matéria prima para disponibilização dos polissacarídeos celulose e hemicelulose para hidrólise, além de possível etapa de destoxificação do hidrolisado obtido e produção de enzimas. Essas operações precisam ser totalmente otimizadas para atingir-se um nível de processo eficiente e competitivo (NAIK et al., 2010; NIGAM; SINGH, 2011). Finalmente, o uso da água durante o processo ainda é outro fator crucial a ser considerado na busca por um processo sustentável (LIMAYEM; RICKE, 2012).

O estabelecimento de uma produção integrada entre etanol de primeira e segunda geração com co-produtos de valor agregado é uma alternativa para aumentar a rentabilidade e melhorar o desempenho financeiro da planta (NAIK et al., 2010), surgindo assim o conceito de biorrefinaria. De acordo com Martin (2011) a biorrefinaria é uma usina na qual a produção de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa são integrados, permitindo o uso eficiente de todo o potencial das matérias primas juntamente com geração de energia e fabricação de uma ampla gama de produtos de valor agregado. Os benefícios de uma biorrefinaria integrada são numerosos devido à diversificação de matérias-primas e produtos. Assim, quanto maior for o grau de integração da biorrefinaria, mais econômico, ambientalmente viável e sustentável será o processo (DEMIRBAS, 2009).

2.3 Materiais/resíduos lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos correspondem à maior fonte de compostos orgânicos da biosfera. São abundantes e possuem baixo custo, apresentando assim grande potencial como matéria prima em processos industriais para a produção de alimentos, biocombustíveis, insumos químicos e enzimas (CANILHA et al., 2010; ZHAO; XIA, 2010). De acordo com Zabed et al. (2016). Os resíduos lignocelulósicos disponíveis mundialmente são provenientes principalmente do processamento de milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar, a partir dos quais poderiam ser produzidos aproximadamente 400 bilhões de litros de bioetanol anualmente.

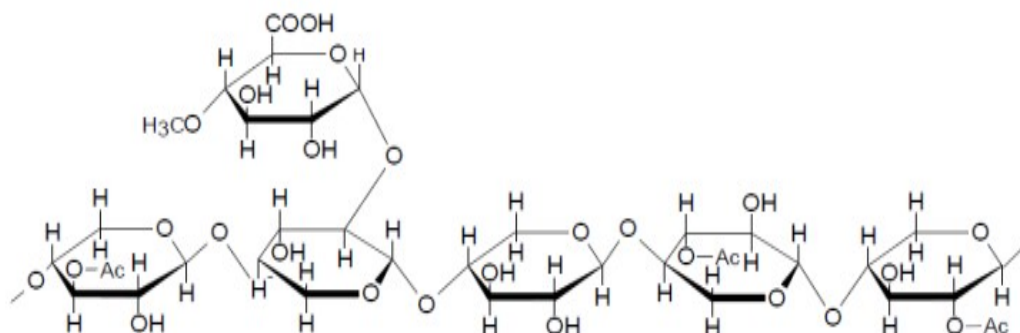
O potencial dos materiais lignocelulósicos como matéria prima sustentável está diretamente relacionado com sua constituição. Os principais componentes da biomassa são celulose, hemicelulose e lignina (BALAT; BALAT, 2009), sendo que celulose e hemicelulose juntas (holocelulose) representam em torno de 70% da constituição da biomassa total e são compostos formados por polímeros de monômeros de açúcares fermentescíveis (LIMAYEM; RICKE, 2012).

A celulose é o componente mais abundante na natureza, correspondendo a até 50% da massa seca total da biomassa. Trata-se de um polímero linear, que possui porções amorfas e cristalinas, formado por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β -(1,4) (GOLDSTEIN, 1981). Apresenta uma estrutura química relativamente simples, mas não é um biopolímero facilmente degradável. Essa característica deve-se ao fato de seus filamentos se encontrarem unidos formando microfibrilas cristalinas, estabilizadas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares que formam estruturas altamente insolúveis (FENGEL; WEGENER, 1983).

A lignina é uma macromolécula aromática amorfa tridimensional de estrutura rígida e complexa, a qual é formada a partir da polimerização de unidades de álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1983). Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose, conferindo rigidez e baixa reatividade às fibras vegetais (GOLDSTEIN, 1981).

A hemicelulose é o segundo componente em maior abundância, podendo variar entre 20 e 25% do material lignocelulósico (SJÖSTRÖM, 1993). É um heteropolímero representado pela fórmula geral $(C_5H_8O_4)_n$ no qual o grau de polimerização pode variar entre 80 e 200 (Figura 2.2) (PENG et al., 2009). Possui função de reserva e sustentação e é composto por monossacarídeos de hexoses (glicose, manose) e pentoses (xilose, arabinose), assim como por pequenas quantidades de ácidos urônicos (CARVALHO et al., 2013).

Figura 2.2 – Parte da composição estrutural da hemicelulose (FERRAZ, 2010)



A hemicelulose apresenta baixa massa molecular, é bastante hidrofílica e contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, possuindo uma natureza altamente amorfa, diferentemente da celulose, sendo mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas (ROWELL, 2005). Sua composição irá variar de acordo com a procedência do material. Madeiras moles apresentam altas proporções de manose e um número mais elevado de unidades de galactose, enquanto madeiras duras possuem grande quantidade de xilose (FENGEL; WEGENER, 1983). Na natureza, podemos encontrar diferentes tipos de hemicelulose, as quais serão constituídas por diferentes polímeros, como por exemplo xiloglicanas, xilanas e mananas, das quais xilana é a mais abundante (DODD; CANN, 2009).

Xilanas são heteropolímeros compostos por uma cadeia principal de β -D-xilopiranosil (xilose) unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), podendo conter em suas ramificações arabinose, ácido glucurônico ou 4-O-metil éter e ácidos acético, ferrúlico e p-cumárico (CARVALHO et al., 2013). Desta maneira, de acordo com a ramificação, as xilanas podem ser classificadas em homoxilanas, arabinoxilanas, glucuronoxilanas e arabinoglucuronoxilanas (DODD; CANN, 2009). Arabinoglucuronoxilana (arabino-4-O-metilglucuronoxilana) são os principais componentes de materiais e resíduos agrícolas, tais como bagaço de cana-de-açúcar.

Industrialmente, a xilana é utilizada como matéria prima na produção de xilose, xilitol e furfural. Atualmente, aplicações da xilana na produção de xilooligosacarídeos (XOS) e biocombustíveis vêm sendo estudadas dentro do contexto da biorrefinaria.

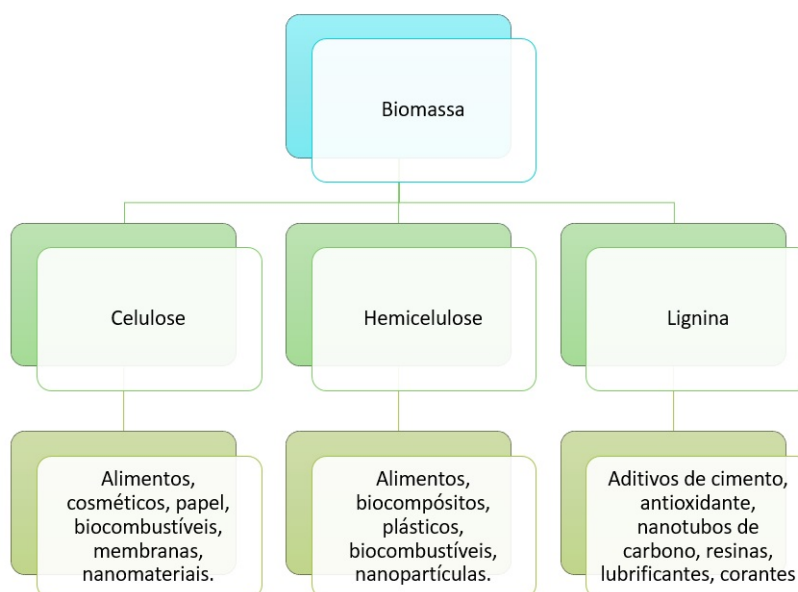
Os xilooligosacarídeos (XOS) são oligômeros pequenos de xilose (2-7 unidades) que podem ser obtidos a partir da hidrólise controlada de grandes xilooligômeros solubilizados através de uma hidrólise branda da hemicelulose (WANG; LU, 2013). São compostos com

propriedades prebióticas, ou seja, são resistentes à digestão e estimulam seletivamente o crescimento da microflora gastrointestinal (GOLDMAN, 2009; CARVALHO et al., 2013), sendo assim possuem alto valor agregado e são de grande interesse para as indústrias farmacêutica e alimentícia. Entretanto, são compostos de difícil separação e purificação devido a similaridade estrutural, representando um custo elevado de produção (VÁZQUEZ et al., 2000).

Uma vez que a hidrólise total da xilana gera xilose como principal produto, este açúcar atualmente subutilizado poderia ser destinado para a produção de bioetanol, uma vez que as demandas de XOS e xilitol não seriam suficientes para atender a hemicelulose disponível nos resíduos agroindustriais.

Desta maneira, a composição química assim como as propriedades mecânicas da biomassa a tornam não somente uma rica fonte de compostos químicos e açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustíveis, como também uma excelente fonte de biopolímeros com uma série de aplicações industriais (GUERRIERO et al., 2016), conforme pode-se observar na Figura 2.3.

Figura 2.3 – Aplicação industrial dos principais componentes da biomassa lignocelulósica (Adaptado de GUERRIERO et al., 2016).



2.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

No Brasil, o subproduto lignocelulósico mais abundante é o bagaço de cana-de-açúcar, o qual é um subproduto fibroso gerado após a extração do caldo da cana para a produção de açúcar e etanol (CHANDEL et al., 2011).

A safra de cana-de-açúcar de 2016/2017 está estimada em 694,5 milhões de toneladas (CONAB, 2016/2017). Sabendo-se que no processamento da cana-de-açúcar são gerados cerca de 140 kg de bagaço seco por tonelada de matéria-prima (CANILHA et al., 2010), em torno de 97,2 milhões de toneladas de bagaço serão gerados.

De acordo com Cerqueira-Leite et al. (2009), atualmente no Brasil o bagaço destinado à geração de energia pode corresponder a até 92% do bagaço gerado, resultando ainda numa estimativa de bagaço excedente de 7,8 milhões de toneladas, o qual poderia ser convertido a 2,8 milhões de toneladas de etanol (3,5 bilhões de litros), se considerarmos que celulose e hemicelulose juntas constituem em torno de 70%.

De acordo com Hernández-Salas et al. (2009), o bagaço é composto por 40-50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Entretanto esta composição varia de acordo com as condições climáticas de cultivo, tipo do bagaço, condições do solo e uso de fertilizantes (Tabela 2.1) (CHANDEL et al., 2011). A xilana presente no bagaço de cana-de-açúcar é principalmente arabinoglucuronoxilana (MANRICH, 2012), a qual é composta por uma cadeia principal de xilose contendo ramificações de arabinose e ácido glucurônico.

Tabela 2.1 – Composição de diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar

Componente	Rodrigues et al. (2010)	Silva et al. (2011)	Rocha et al. (2012)	Pereira et al. (2015)	Oliveira et al. (2016)
Celulose	45,4%	42,8%	43,1%	36,6%	45,0%
Hemicelulose	24,1%	25,9%	25,2%	28,5%	29,9%
Lignina	23,4%	22,1%	22,9%	13,8%	21,2%
Cinzas	2,3%	1,4%	2,8%	0,8%	0,4%
Extrativos	n/d	6,1%	4,3%	n/d	0,8%

*n/d – não determinado

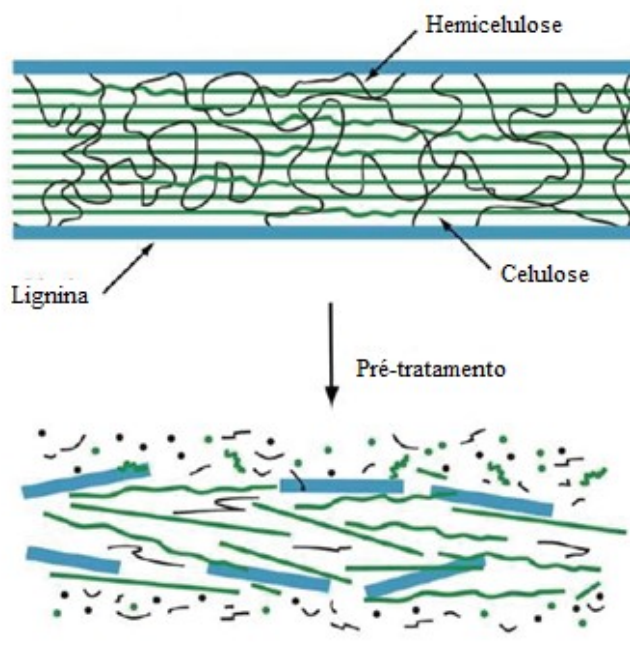
A utilização do bagaço como matéria-prima para produção etanol de segunda geração pode potencializar a produtividade do etanol obtido a partir do caldo da cana, sendo que uma

parcela de bagaço deve continuar gerando energia elétrica e térmica para o funcionamento das usinas, atendendo assim a modelos sustentáveis de produção (TUBINO; ZAMORA, 2009).

2.4 Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

A estrutura da parede celular da biomassa vegetal é caracterizada por uma malha de polissacarídeos, proteínas estruturais e compostos fenólicos que formam uma barreira protetora contra agentes externos e fornece suporte estrutural e mecânico para os demais tecidos vegetais (GUERRIERO et al., 2016), a qual possui uma natureza extremamente recalcitrante, dificultando o acesso aos açúcares fermentescíveis e representando a maior barreira para a viabilização da produção de etanol 2G (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Por meio de uma etapa de pré-tratamento, a estrutura lignocelulósica pode ser rompida e a fração hemicelulósica pode ser solubilizada, tornando os açúcares fermentescíveis mais acessíveis (PANDEY et al., 2000; MOSIER et al., 2005), como pode ser observado na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica
(Adaptado de MOSIER et al., 2005)



A redução da recalcitrância pode ser atribuída a uma série de fatores como mudanças nas interações entre celulose, hemicelulose e lignina; aumento na acessibilidade da celulose;

remoção de lignina; e possíveis reduções na cristalinidade da celulose (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

De acordo com Lynd (1996), um processo de pré-tratamento ideal deve produzir fibras reativas, elevados rendimentos em açúcares não degradados, não liberar quantidades significativas de inibidores do metabolismo microbiano, exigir nenhuma ou mínima redução de tamanho, ser operado em reatores de tamanho moderado e de custo viável, não produzir elevados níveis de resíduos e ser simples.

Os métodos de pré-tratamentos utilizados atualmente podem ser divididos em 4 grandes grupos: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos ou ainda uma combinação destes (SARKAR et al., 2012). As metodologias mais estudadas envolvem o emprego de ácidos, vapor, solventes orgânicos e agentes alcalinos (GIRIO et al., 2010).

O método de pré-tratamento empregado irá depender do tipo de matéria prima utilizado assim como do produto de interesse. A escolha do método adequado para o pré-tratamento é de grande importância uma vez que esta etapa representa um acréscimo de até \$0,30 por galão no preço final do bioetanol (MOSIER et al., 2005).

2.5 Hidrólise da hemicelulose

A hemicelulose é mais susceptível à ação hidrolítica quando comparada com a celulose, devido à sua baixa cristalinidade e ao menor grau de polimerização, sendo assim mais facilmente solubilizada para a liberação de açúcares fermentescíveis (ROWELL, 2005). Diversos métodos de pré-tratamento podem ser utilizados para a extração da hemicelulose, em geral a liberação ocorre pela quebra das ligações éster e consequente solubilização da hemicelulose da matriz lignocelulósica (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

Dentre os inúmeros métodos de pré-tratamento disponíveis, a hidrólise ácida tem sido bastante estudada e se destacou como um método eficiente para a liberação de açúcares fermentescíveis, sendo a mais empregada para a decomposição da estrutura lignocelulósica e geração de pentoses fermentescíveis (LAOPAIBOON et al., 2010). Esse método visa não apenas obtenção de alto rendimento na extração de hemicelulose, mas também hidrólise total do heteropolímero para obtenção dos monômeros fermentescíveis, glicose e xilose. Entretanto, este pré-tratamento está relacionado com uma série de desvantagens. É um método de pré-tratamento com elevado custo agregado uma vez que são necessárias etapas de neutralização e recuperação do ácido utilizado como catalisador, assim como o uso de

equipamentos resistentes à corrosão. Além disso, as elevadas temperaturas e pressões do processo também significam um gasto energético significativo (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002). A formação de compostos inibidores ao metabolismo microbiano decorrente da degradação dos componentes da biomassa, como furfural e hidroximetil furfural, é outra desvantagem relacionada ao pré-tratamento ácido da biomassa, já que a necessidade de maior severidade no tratamento para obter alto rendimento de extração (acesso a frações mais internas de hemicelulose) implica a degradação dos monômeros que foram solubilizados antes (CANILHA et al., 2012). Podemos citar ainda como desvantagem, a toxidez dos resíduos liberados após a hidrólise, os quais devem ser devidamente tratados por constituírem fontes altamente poluidoras (DOMÍNGUEZ; CHENG; TSAO, 1996).

A utilização de uma etapa de destoxificação para remoção dos compostos inibidores do hidrolisado é uma alternativa para viabilizar a hidrólise ácida. Uma grande variedade de métodos vem sendo estudados para a eficiente destoxificação do hidrolisado lignocelulósico, entre eles podemos citar evaporação, uso de membranas, uso de resina de troca iônica, adsorção por carvão ativo, extração com solvente, alteração de pH e ainda métodos biológicos (CHANDEL et al., 2007; GRZENIA; SCHELL; WICKRAMASINGHE, 2008; CANILHA et al., 2012). Entretanto, a realização de uma etapa de destoxificação durante o processo representa um aumento significativo nos gastos da planta e custo final do processo.

Desta maneira, as alternativas que vêm ganhando destaque são pré-tratamentos que apresentem menor produção de inibidores, nos quais primeiramente ocorre uma solubilização branda dos componentes da biomassa seguido por uma etapa de hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares fermentescíveis (WOLF, 2011).

A escolha do método de pré-tratamento deve levar em conta o produto final desejado. Hemicelulose é fração altamente suscetível a ataque químico e calor, pela presença de diferentes radicais. Ela pode, assim, ser hidrolisada apenas com água a altas temperaturas, já que nessa condição ocorre formação de ácido acético, num tratamento conhecido como auto-hidrólise (ou hidrotérmico). Empregando-se condições amenas de processo, pode-se evitar ao máximo a geração de monômeros, mas não há extração completa da hemicelulose.

No processo organossolve, há separação dos três componentes principais da lignocelulose, sendo a recuperação delas possível como lignina seca, hemicelulose com alto grau de polimerização e uma fração celulósica relativamente pura (ZHAO; CHENG; LIU, 2009). A presença do co-solvente deve diminuir a formação do íon hidroxônio e, portanto, do grau de hidrólise de carboidratos.

A combinação de processos tradicionais com ondas de ultra-som também vem sendo descrita para aumentar a eficiência na extração de xilana sem causar mudanças estruturais e propriedades moleculares. Xilooligosacarídeos de alto valor e boas propriedades biológicas foram obtidos através da aplicação dessa tecnologia (HROMÁDKOVÁ, 1999).

Um resumo das conclusões mostradas nesses trabalhos indica que o pré-tratamento hidrotérmico, hidrólise alcalina e processo organossolve possuem grande potencial de utilização em plantas de biorefinarias integradas (ARATO et.al., 2005). Na presença de solvente, diferentes variáveis afetam as eficiências de extração da hemicelulose e da lignina e a formação de sub-produtos, sendo os principais: temperatura (T), tempo de residência (t), acidez e mistura do solvente. O aumento do grau de severidade do pré-tratamento deve levar a aumento da eficiência da extração de hemicelulose, mas também à maior fração de xilose. Dessa forma, a primeira etapa no processo de utilização de pentoses de lignocelulósicos é a definição das condições operacionais adequadas para a extração da hemicelulose, dependendo do produto desejado. Se xilooligômeros são os produtos visados, deve-se buscar condições de extração da hemicelulose mais suaves, mesmo que isso resulte em menores rendimentos de extração. Se etanol é a aplicação visada, deve-se buscar máxima eficiência de extração do carboidrato, já na forma do monômero xilose, o que pode ser obtido com pré-tratamentos ácidos ou adição de catalisador durante o pré-tratamento organossolve.

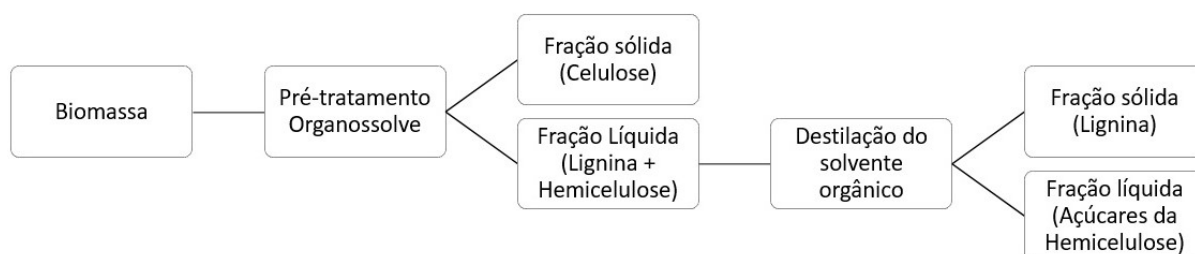
Obtidos os oligômeros de xilanas, o próximo passo é a hidrólise controlada desses para geração de XOS (2-7 unidade de xilose), ou total para obtenção de xilose, seja por hidrólise ácida branda ou por catálise enzimática com endoxilanasas, exoxilanasas, β -xilosidase e enzimas desramificantes.

Rodrigues-Zúñiga et al. (2014) estudaram o efeito de diferentes pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar e observaram elevada solubilização da fração hemicelulósica utilizando-se os pré-tratamentos organossolve e hidrotérmico. No tratamento hidrotérmico, os autores observaram uma redução de hemicelulose na fibra de 29,4 para 5,9% m/m, enquanto celulose e lignina não foram degradadas (38,0 para 54,3% m/m e 21,7 para 24,8% m/m, respectivamente). Já no pré-tratamento organossolve, a solubilização de hemicelulose foi ainda mais significativa, passando de 29,4 para 0,2% m/m, também sem degradação de celulose, porém com solubilização de lignina.

2.5.1 Pré-tratamento Organossolve

O pré-tratamento organossolve baseia-se na utilização de solventes orgânicos, como etanol, metanol e acetona, para a quebra das ligações lignina-lignina e carboidrato-lignina, provocando remoção da lignina e consequente desconstrução da estrutura lignocelulósica (ZHAO; CHENG; LIU, 2009, CANILHA et al., 2012), conforme esquematizado na Figura 2.5. Este pré-tratamento é considerado por alguns autores como um dos mais promissores, principalmente para a utilização em plantas de biorrefinarias integradas por utilizar o etanol como solvente (MANRICH, 2012). O uso da mistura solvente orgânico-água a altas temperaturas permite que o solvente orgânico dissolva a lignina, enquanto a fase aquosa opera como tratamento hidrotérmico, realizando-se assim simultânea pré-hidrólise e deslignificação da biomassa (MANRICH, 2012; ZABED et al., 2016). Com a remoção da lignina e solubilização da hemicelulose, a área superficial da fibra sólida celulítica resultante aumenta consideravelmente, facilitando o acesso das enzimas hidrolíticas e aumentando a eficiência na liberação de açúcares fermentescíveis. (CANILHA et al., 2012).

Figura 2.5 – Fluxograma do pré-tratamento organossolve da biomassa vegetal



A hemicelulose presente na fração líquida obtida encontra-se na forma oligomérica, assim sendo, ela pode ser hidrolisada a monômeros de xilose ou a xilooligômeros (WOLF, 2011). A adição de ácido diluído para aumentar a remoção das cadeias de hemicelulose poderá aumentar o rendimento da extração de hemicelulose, mas conforme já discutido, poderá acarretar a formação de inibidores (MANRICH, 2012).

A separação das frações lignocelulósicas com pureza relativamente alta é uma vantagem do processo organossolve, para a qual surge a necessidade da utilização de todos os componentes da biomassa (WOLF, 2011). É um método conveniente devido à sua fácil recuperação, por ser livre de enxofre e apresentar baixa degradação de açúcares. Entretanto

possui alto custo e necessita de uma etapa para recuperação do solvente (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; ZABED et al., 2016).

2.5.2 Pré-tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico utiliza água em contato com a biomassa a alta pressão durante intervalos de tempo entre 1 e 15 minutos e temperaturas entre 170 a 230°C (SILVA, 2011). Por utilizar apenas água pura, sem a adição de solventes, é um pré-tratamento que vem ganhando destaque, pois não necessita de etapas como neutralização e recuperação do ácido ou solvente ou de reatores resistentes a corrosão, o que reduz os custos do processo (CANILHA et al., 2012). Possui também a vantagem de solubilizar a hemicelulose e manter a celulose na fibra, facilitando a posterior utilização dos açúcares C5 e hidrólise enzimática dos C6.

De acordo com Silva (2015) este processo trata-se de uma auto-hidrólise das ligações em presença do íon hidroxônio [H_3O^+], pois baseia-se no princípio de que a constante dielétrica da água permite a dissolução dos compostos orgânicos, enquanto a elevada constante de ionização proporciona um meio ácido, resultando na hidrólise da biomassa pela quebra das ligações éster e éter. Além disso, conta-se ainda com a ação catalisadora do ácido acético liberado a partir da desacetilação das cadeias laterais da hemicelulose.

O pré-tratamento hidrotérmico é considerado ambientalmente adequado e possui diversas vantagens como a baixa concentração de inibidores produzida, ausência de catalisador químico, aumento da superfície de contato da fibra resultante, solubilização da hemicelulose e baixo custo. Sua desvantagem é o elevado volume de água e energia necessários (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; ZABED et al., 2016)

Após o pré-tratamento, podemos distinguir duas fases: uma fração sólida rica em celulose e uma fase líquida solúvel rica em hemicelulose. A celulose obtida pode ser submetida a uma etapa de hidrólise para a liberação de glicose e então direcionada para a produção de etanol, enquanto a hemicelulose pode ser utilizada para a geração de produtos de alto valor agregado como xilooligossacarídeos ou ainda hidrolisada à xilose e destinada à produção de etanol (CARVALHO et al., 2013).

Este processo pode ser utilizado como um primeiro passo para o fracionamento dos materiais lignocelulósicos, uma vez que xilooligômeros são os principais produtos obtidos a partir da hemicelulose. Para a obtenção de XOS de alto valor agregado (2-6 unidades) ou de xilose para aplicação em processos fermentativos, uma etapa de hidrólise dos xilooligômeros

obtidos é necessária, a qual pode ser ácida ou enzimática (CARVALHO et al., 2013). Entretanto, de acordo com Sun et al. (2004), a hidrólise ácida com este objetivo não é indicada devido à grande geração de compostos inibidores assim como às demais desvantagens relacionadas a este processo.

2.6 Hidrólise Enzimática da Xilana

A hemicelulose é um heteropolímero complexo e estável composto principalmente por xilana, a qual apresenta um tempo de meia vida estimado em 20 milhões de anos em temperatura ambiente (DODD; CANN, 2009), necessitando assim de fatores externos, como a ação de enzimas, para que o rompimento das ligações β -(1,4) ocorra.

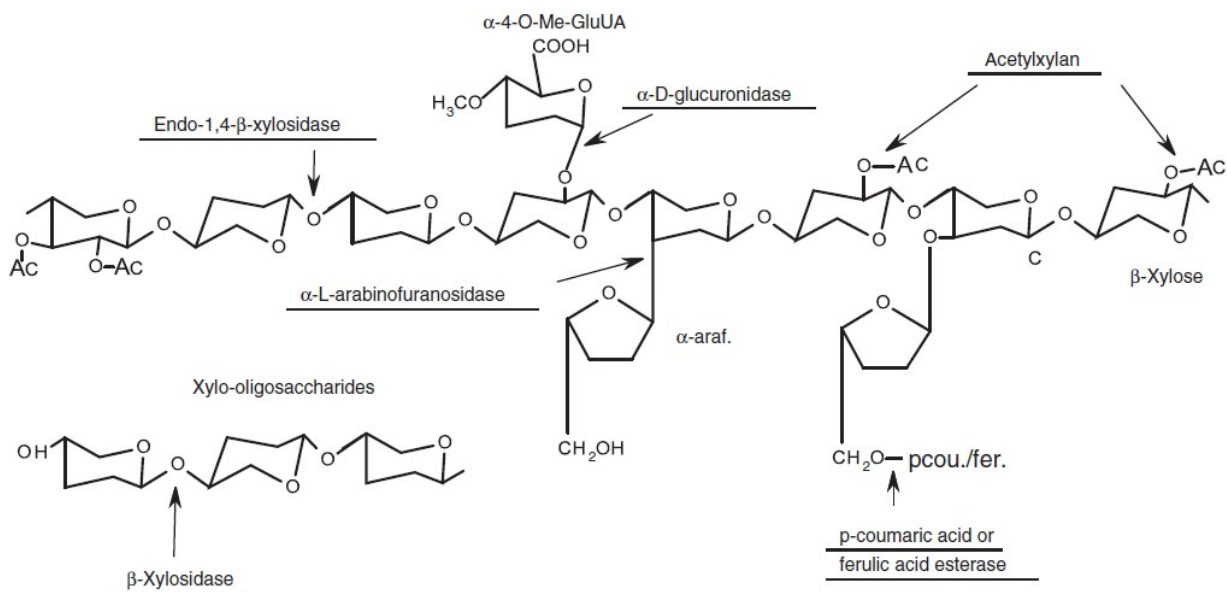
Enzimas são proteínas com função catalítica, as quais possuem grande potencial industrial uma vez que processos enzimáticos são conduzidos em meio aquoso e sob condições amenas. Além disso, por possuírem alta especificidade pelo substrato, não ocorre formação de inibidores e não há produção de subprodutos tóxicos (LAVARACK et al, 2002; MANRICH, 2012).

A xilana consiste em uma cadeia principal de xilose com cadeias laterais substituídas por diferentes compostos, como arabinose e ácido glucurônico. Assim sendo, para sua total ruptura estrutural (hidrólise total) um conjunto de enzimas com diferentes especificidades se faz necessário (DODD; CANN, 2009). Na Figura 2.6 podemos observar a variedade de enzimas, necessárias para a total hidrólise da xilana, como endo- β -(1,4)-xilanases, β -D-xilosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -D-glucuronidases e uma série de esterases responsáveis por remover das cadeias laterais, unidades de ácido glucurônico, álcool cumarílico, etc.

Os complexos xilanolíticos produzidos pelos microrganismos geralmente já contêm esse conjunto diversificado de enzimas, sendo que a combinação de enzimas presentes depende do microrganismo e das condições de cultivo.

As xilanases são as principais enzimas necessárias para a hidrólise enzimática da xilana. São enzimas que catalisam a hidrólise das ligações β -(1,4) entre as unidades de xilose da xilana. Atualmente, estas enzimas são utilizadas principalmente nas indústrias de papel e como aditivos em ração animal (MILESSI et al., 2015). Os dois principais grupos de xilanases que catalisam a hidrólise da xilana são as endoxilanases e as β -xilosidases.

Figura 2.6 – Ação das enzimas necessárias para a hidrólise enzimática total da xilana
(CARVALHO et al., 2013)

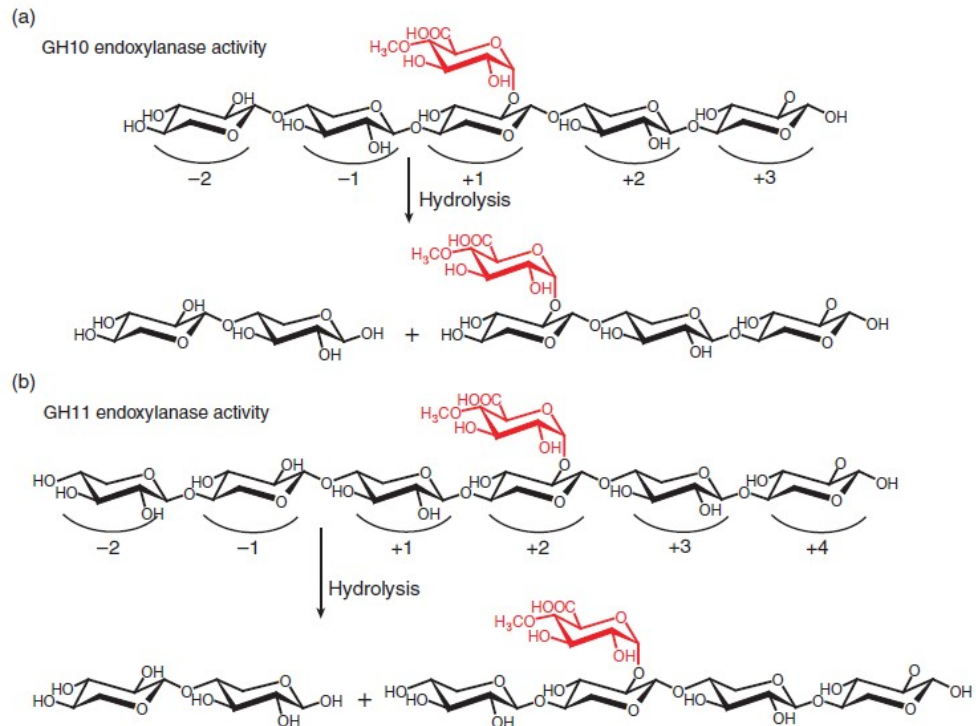


2.6.1 Endoxilanases

As Endo-β-(1,4)-xilanases (EC 3.2.1.8) são enzimas que agem diretamente na cadeia principal de xilose da xilana, clivando aleatoriamente as ligações glicosídicas entre as unidades de xilose. São produzidas por uma variedade de microrganismos como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Clostridium* e *Bacillus* (CARVALHO et al., 2013). Estas enzimas podem ser classificadas em dois principais grupos: família 10 e família 11, as quais diferem entre si em suas características físico-químicas, sequência de aminoácidos, mecanismos de ação e especificidade. Xilanases da família 10 produzem XOS menores enquanto as xilanases da família 11 geralmente possuem maior especificidade pelo substrato. Quanto ao tamanho, é interessante ressaltar que a massa molecular de xilanases da família 10 é ≥ 30 kDa, enquanto a família 11 é ≥ 20 kDa (MANRICH, 2012).

As famílias 10 e 11 diferem ainda em seu modo de ação. Enquanto xilanases da família 10 clivam a xilana na xilose onde se encontra o grupo lateral, a família 11 age no monômero de xilose imediatamente anterior à ramificação, conforme pode ser visto na Figura 2.7, fato que ajuda a explicar porque os xilooligômeros gerados pela ação da família 10 são menores (DODD; CANN, 2009).

Figura 2.7 – Influência de ramificações na ação das xilanases das famílias 10 (a) e 11 (b)
(DODD; CANN, 2009)



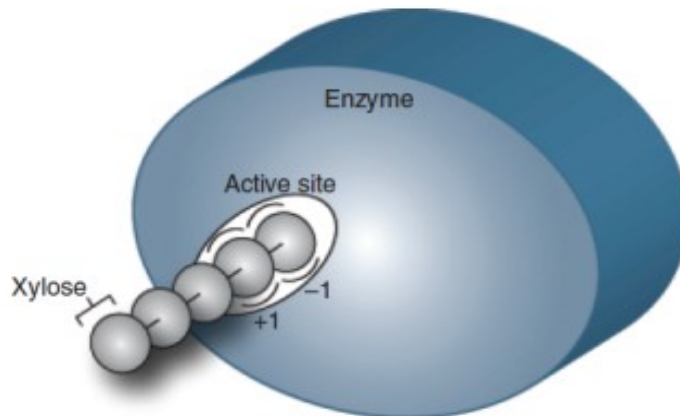
Desta maneira, o grau de substituição das cadeias laterais assim como a natureza do substrato e as características da enzima utilizada irão influenciar diretamente na ação das xilanases e, conseqüentemente, no perfil de produtos obtidos no processo.

2.6.2 β -Xilosidases

As beta-xilosidases (EC 3.2.1.37) são enzimas que liberam monômeros de xilose a partir da extremidade não redutora de xilooligômeros (DODD; CANN, 2009). Conforme descrito anteriormente, na hidrólise enzimática da xilana as endoxilanases quebram a xilana em xilooligômeros menores, aumentando a concentração de extremidades não redutoras, e as β -xilosidases atuam nestes compostos, liberando xilose. Estas enzimas possuem sítios para a ligação de 2 monômeros de xilose, assim sendo, quando hidrolisam xilooligômeros maiores que duas unidades, os açúcares excedentes permanecem na solução (conforme Figura 2.8) (DODD; CANN, 2009). Desta maneira, devido ao sitio ativo pequeno, as ramificações atrapalham a ação da β -xilosidase uma vez que barram o encaixe dos monômeros de xilose no

sítio ativo da enzima, evidenciando a importância da sua remoção na etapa de pré-tratamento. Essa enzima hidrolisa também xilobiase (duas unidades de xilose).

Figura 2.8 - Esquema da ação do sítio catalítico da β -xilosidase de *Selenomonas ruminantium* (DODD; CANN, 2009)



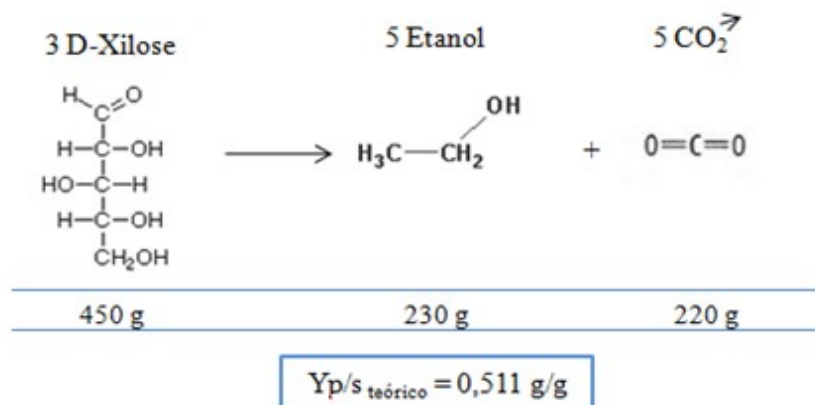
2.7 Produção de etanol a partir de xilose

Para a viabilidade econômica do processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, todos os constituintes da biomassa que possuam potencial de substrato devem ser assimilados. Assim sendo, a fermentação de xilose à etanol é essencial (HARUN et al., 2010).

A Figura 2.9 mostra um esquema simplificado da principal via metabólica de xilose à etanol proposto por Hector et al. (2011), no qual se observa a integração das vias glicolíticas e pentose fosfato.

A xilose é metabolizada pela via das Pentoses Fosfato (PPP), a qual inicia-se pela isomerização de xilose a xilulose. Esta conversão da xilose pode ser realizada por duas maneiras: através de sua isomerização intermediada pela enzima xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5), a qual é mais comumente encontrada em bactérias, ou pela ação conjunta das enzimas xilose redutase (XR, E.C. 1.1.1.21) e xilitol desidrogenase (XDH, E.C. 1.1.1.9). A primeira converte xilose a xilitol na presença de NADH e/ou NADPH, dependendo do microrganismo. Em seguida, o xilitol é oxidado a xilulose pela enzima XDH. Este complexo enzimático (XR+XDH) é encontrado em leveduras e fungos. Após a conversão de xilose a

Figura 2.10 – Reação estequiométrica e fator de conversão teórico de xilose em etanol (Yp/s) em condições anaeróbias (SLININGER et al., 1990)



Desta maneira, a presença de uma destas enzimas (XI ou XR+XDR) é crucial para que a assimilação de xilose aconteça. Assim sendo, um fator importante para a produção microbológica de etanol a partir de xilose é a espécie de microrganismo empregado e os níveis de atividade enzimática responsáveis pela eficiente assimilação e pelo metabolismo de xilose no mesmo.

2.7.1 Microrganismos selvagens produtores de etanol

O desenvolvimento de processos eficientes, de baixo custo e ambientalmente viáveis para a produção de etanol 2G requer a seleção de microrganismos adequados que contribuam para alcançar tais objetivos (CARDONA; SANCHÉZ; GUTIÉRREZ, 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais explorado industrialmente pelo homem, sendo atualmente o microrganismo mais utilizado para a produção de etanol (SOARES, 2011). É uma levedura robusta, capaz de superar condições de estresse celular, possui elevada eficiência na conversão do substrato em produto, alta tolerância a etanol e altas concentrações de açúcar, não exige condições de processo complexas e não é patogênica (REIS et al., 2013; DEMEKE et al., 2013). Diante da falta de nutrientes, essas leveduras cessam seu crescimento e param de se reproduzir, entrando em fase estacionária, na qual se destacam por manter sua viabilidade por longos período de tempo, retornando a serem capazes de se reproduzir quando os nutrientes são disponibilizados novamente (AQUINO, 2013). Contudo, no caso da produção de etanol 2G esta levedura

apresenta uma menor versatilidade, uma vez que sua forma selvagem não é capaz de metabolizar xilose (FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

S. cerevisiae possui os genes necessários para metabolizar xilose, porém apresentam baixíssimas atividades de XR e XDH (TOÍVARI et al., 2004; MONTAÑO, 2013). Além disso, de acordo com Apel et al. (2016), a captação de pentoses por essa levedura é mediada pelos mesmos transportadores das hexoses (HXTs e GAL 2) ou seja, a levedura não possui transportadores específicos para xilose e, conseqüentemente, o transporte é feito de forma lenta e não eficiente, tornando-o um fator limitante e impedindo que a levedura cresça em xilose.

O conhecimento sobre espécies que fermentam pentoses naturalmente ainda é limitado, de forma que a busca de novos microrganismos fermentadores de pentoses a etanol ainda é um desafio para a viabilização eficiente da produção de bioetanol. Alguns microrganismos como as leveduras *Scheffersomyces shehatae*, e *Scheffersomyces stiptis* e o fungo *Fusarium oxysporum*, têm sido avaliados na fermentação de xilose a etanol (HAHN-HAGERDAL et al., 1994; MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004; BETANCUR, 2005). Porém, apesar de serem capazes de produzir etanol a partir de xilose, sua aplicação em escala industrial é limitada por sua baixa tolerância a altas concentrações de etanol, baixa velocidade de fermentação e por terem grande sensibilidade aos inibidores (SILVA et al., 2012).

Apesar de não ser capaz de metabolizar xilose, *Saccharomyces cerevisiae* consegue fermentar seu isômero, a xilulose. Assim sendo, uma alternativa para o emprego desta levedura na produção de etanol 2G seria a isomerização *ex situ* de xilose a xilulose, reação essa catalisada pela enzima xilose isomerase (ou glicose isomerase).

2.7.2 Xilose Isomerase (XI)

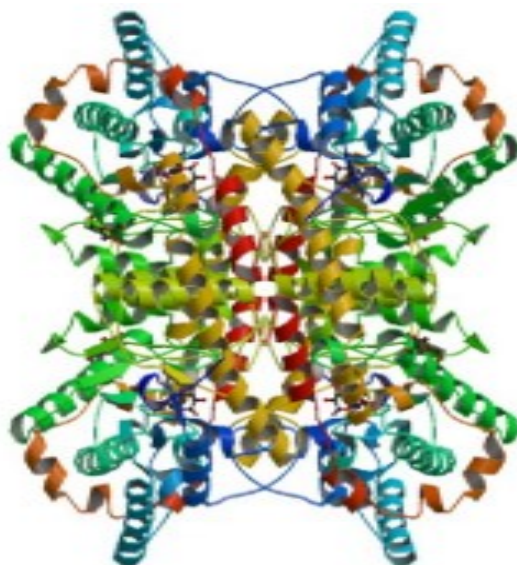
A enzima xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5), também conhecida como glicose isomerase, catalisa as reações reversíveis de isomerização de xilose em xilulose e glicose em frutose, sendo extensivamente utilizada na indústria para a produção de xarope de glicose rico em frutose (GIORDANO; GIORDANO; COONEY, 2000). É uma enzima tetramérica de 173 kDa formada por 4 subunidades idênticas de 43 kDa (JANIS et al., 2008) encontrada comercialmente na forma imobilizada.

A isomerização de xilose pela XI se destaca em relação ao complexo XR+XDH uma vez que é uma reação independente de cofatores, pois a regeneração dos cofatores é um gargalo do processo pela via PPP (MARIS et al., 2007).

Em geral, a XI possui temperatura ótima entre 60-80°, pH ótimo entre 7,0 e 9.0 e necessita de um cátion divalente como Mg^{2+} , Co^{2+} ou Mn^{2+} para manter sua atividade e estabilidade. Por outro lado, Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , xilitol e arabitol atuam como inibidores desta enzima (MARIS et al., 2007). Tanto cobalto quanto magnésio são essenciais para a atividade catalítica da enzima, enquanto o Mg^{2+} é um ativador superior e o Co^{2+} é responsável por estabilizar a estrutura quaternária da enzima (SILVA, 2013). De acordo com Kasumi et al. (1982) a reação de isomerização é guiada obrigatoriamente pela presença de um complexo binário enzima-cátion divalente, já que o substrato irá se ligar apenas ao sítio ativo que o complexo possui.

Figura 2.11 - Estrutura da xilose isomerase de *Streptomyces rubiginosus*

(Fonte: Protein Data Bank)



2.7.3 Microrganismos Geneticamente Modificados (OGM)

A utilização de microrganismos recombinantes é uma estratégia para a fermentação de pentoses a etanol (ELIASSON et al., 2000; JIN; LAPLAZA; JEFFRIES, 2004; DAVIS et al., 2005). As características positivas da *S. cerevisiae* relacionadas com a fermentação alcoólica impulsionaram a aplicação da engenharia metabólica para melhorar sua assimilação de xilose,

sendo encontrados na literatura inúmeros trabalhos relatando o desenvolvimento de *S. cerevisiae* recombinantes (HECTOR et al., 2011; LIU et al., 2012; DEMEKE et al., 2013a; DEMEKE et al., 2013b; PARK et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014; JO et al., 2016; KO et al., 2016; MEIJNEN et al., 2016). Dentre as abordagens estudadas, destacam-se a inserção dos genes para expressão das enzimas XR+XDH ou da enzima XI. De acordo com Maris et al. (2007), a expressão de xilose isomerase heteróloga independente de cofatores é a solução para o problema do balanço redox no metabolismo que envolve XR/XDH. Entretanto requer uma atividade de XI similar às enzimas glicolíticas chaves como hexoquinases e fosfofrutoquinases (entre 0,5 e 1,0 UI/mg).

Sarthy et al. (1987) clonaram em *S. cerevisiae* o gene *xilA* de Proteobacteria e observaram que, apesar de expressar o gene com sucesso, a atividade específica da XI era três vezes menor do que quando expressada em *E. coli*. De acordo com Martis et al. (2007), um dos desafios da expressão de XI em *S. cerevisiae* eficientemente deve-se ao fato da enzima ser proveniente de um organismo procarioto, assim sendo o microambiente intracelular apresentado pela levedura eucarionte é diferente ao do microrganismo original, dificultando a ação da enzima.

A primeira linhagem recombinante de *S. cerevisiae* com altas atividades enzimáticas de XI a 30°C foi obtida após a descoberta de uma XI produzida por um fungo anaeróbico *Piromyces sp.* Mas, apesar de expressar com sucesso a enzima, a levedura não foi capaz de apresentar resultados promissores na fermentação de xilose, apresentando baixíssimas taxas de crescimento e fermentação (KUYPER et al. 2003; MOYSÉS et al., 2016). Segundo Martis et al., 2007, tal fato deve-se ao metabolismo de xilose provavelmente ser controlado não apenas pela expressão da enzima XI, mas também pelo transporte da pentose para o interior da célula ou ainda por reações seguintes à formação da xilulose.

Nos anos posteriores à primeira clonagem de XI em levedura, realizada em 1987, muitos avanços ocorreram na área de Biologia Molecular em busca de uma *S. cerevisiae* fermentadora de xilose. Porém, este ainda é um gargalo a ser resolvido. Brat, Boles e Wiedeman (2009) obtiveram uma *S. cerevisiae* recombinante capaz de crescer e fermentar xilose a etanol pela expressão de XI de *Clostridium phytofermentans*. Entretanto, a velocidade de fermentação era muito baixa e a levedura não foi capaz de consumir integralmente 30 g/L de xilose após 150h de processo. Park et al. (2013) construíram uma *S. cerevisiae* contendo gene de XI isolado de *Clostridium phytofermentans* e, apesar da expressão do gene não afetar

o transporte e a assimilação de glicose, a levedura não foi capaz de consumir xilose pura, apenas misturas de outros açúcares, como galactose com xilose.

Nos últimos anos, alguns grupos de pesquisa obtiveram resultados promissores. Porém, embora a eficiência desses microrganismos seja notável, sua utilização em processos industriais é comprometida, uma vez que são microrganismos ainda pouco conhecidos e não possuem condições de fermentação otimizadas.

Zhang e Geng (2012), utilizando técnicas de DNA *shuffling*, recombinaram todo o genoma de *P. stipitis* com *S. cerevisiae* e obtiveram uma cepa capaz de fermentar xilose mais rapidamente que a levedura naturalmente fermentadora de C5. Entretanto, o tempo necessário para se assimilar 120 g/L de xilose foi superior a 100h. Ko et al. (2016), utilizando *S. cerevisiae* recombinante após expressão dos genes de XI e adaptação evolutiva, observaram um rendimento de 0,43 g/g em etanol utilizando 70 g/L de glicose e 40 g/L de xilose em 72h, 30°C, pH 5,0, 200 rpm e 10 g/L de células iniciais.

Demeke et al. (2013a) inseriu genes de XI de *Clostridium phytofermentans* na levedura Ethanol Red (uma cepa de *S. cerevisiae* utilizada industrialmente na produção de etanol 1G) e por meio de técnicas de análise poligênica e adaptação evolutiva, desenvolveram a levedura GSE16, a qual foi capaz de fermentar xilose rapidamente.

Uma das desvantagens do emprego de microrganismos geneticamente modificados é a possibilidade de perda de características importantes após a modificação genética para a expressão do gene de interesse. No caso particular da levedura GSE16, por exemplo, as modificações genéticas necessárias para a expressão da enzima xilose isomerase prejudicaram a robustez da levedura parental, a qual passou a ser menos tolerante à inibidores do metabolismo microbiano, como o etanol e o ácido acético (DEMEKE et al., 2013b).

Desta maneira, a levedura GSE16 foi submetida a mais etapas de adaptação evolutiva em parceria com a Praj Industries (Índia) e chegou-se então à levedura GSE16-T18, a qual apresenta rápida fermentação de xilose em etanol e tolerância melhorada a inibidores. Meijnen et al. (2016), utilizando análise poligênica, identificaram o gene HAA1 como responsável pela tolerância ao ácido acético e inseriram duas cópias deste gene na levedura GSE16-T18, criando assim a GSE16-T18 HAA1. Esses trabalhos foram realizados pelo grupo do Prof. Johan M. Thevelein nos laboratórios da KU Leuven/VIB (Leuven/Bélgica).

2.8 Condução de processos utilizando células e enzimas imobilizadas

A imobilização de células e enzimas pode ser definida como o confinamento em um suporte de forma a exibir características diferentes daquela do meio ao seu redor e mantendo suas atividades catalíticas (COELHO, 2007; CUNHA, 2006; COVIZZI et al., 2007).

A principal vantagem desta técnica é a facilidade de separação e recuperação do biocatalisador, o que auxilia na viabilidade econômica do processo (SARROUH, 2009; ZHAO; XIA, 2010). Além disso, pode resultar em maiores produtividades e rendimentos; possibilita a operação em processos contínuos sem que ocorra “washout” do biocatalisador; possibilita reutilização do biocatalisador; permite o aumento da estabilidade térmica enzimática; facilita o controle das propriedades do meio e a manutenção dos biorreatores e permite a utilização de elevadas concentrações de biocatalisador (DERVAKOS; WEBB, 1991; PARK; CHANG, 2000; SILVA et al., 2007; KUMAR; GAYEN, 2011). A imobilização celular pode ainda amenizar a inibição causada por compostos inibidores e altas concentrações de substrato e produtos presentes no meio (RAZMOVSKI; VUČUROVIĆ, 2012).

A principal desvantagem desta técnica está relacionada a possíveis limitações no transporte de substratos e produtos e na transferência de oxigênio. Além disso, alterações no metabolismo do microrganismo devido ao microambiente dentro do suporte, custo do suporte e perda de atividade catalítica durante o processo de imobilização também podem ocorrer (SILVA, 2012).

Em relação à fermentação de xilose por *S. cerevisiae* recombinante, na qual a taxa de fermentação é lenta, assim como em processos de SIF de xilose utilizando xilose isomerase *ex vivo* e *S. cerevisiae* selvagem, onde a velocidade de consumo de xilulose é baixa, a utilização de células imobilizadas ou células e enzimas co-imobilizadas pode representar uma melhoria significativa no processo. Apesar da transferência de oxigênio ser um fator importante em processos aeróbios, a disponibilidade de oxigênio durante o processo de fermentação da xilose e xilulose influencia diretamente na seletividade dos produtos finais (etanol/xilitol) devido ao balanço redox celular (MONTAÑO, 2013). Além disso, considerando que a expressão de genes podem sobrecarregar a via metabólica na levedura (SILVA; SRIKRISHNAN, 2012), no caso de experimentos utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, uma microaeração do sistema pode auxiliar no metabolismo celular devido a sobrecarga metabólica causada pela expressão de XI. Assim sendo, as limitações da técnica de

imobilização podem ser compensadas pelas vantagens que o método proporciona (COVIZZI et al., 2007).

2.8.1 Imobilização de enzimas

Enzimas são biocatalisadores potentes e de alta especificidade com grande importância no desenvolvimento de tecnologia para a produção de etanol 2G. Entretanto, são compostos de alto custo, frágeis e solúveis. De acordo com Liu, Zhang e Bao (2016), as enzimas envolvidas na produção de bioetanol representam até 48% do custo final do produto.

Desta maneira, a imobilização enzimática é uma técnica que viabiliza o uso de catalisadores relativamente caros como as enzimas, uma vez que possibilita sua recuperação e reutilização em inúmeros ciclos do processo e pode conferir estabilidade térmica e garantir a operação em tempos prolongados, aumentando o tempo de meia vida da enzima (MATEO et al., 2007). De um ponto de vista industrial, simplicidade e baixo custo são os pontos chave necessários para uma técnica de imobilização. Entretanto, para se reutilizar inúmeras vezes a enzima, a preparação de um derivado estável e altamente reativo se faz necessária (GUISAN, 2006).

A imobilização de enzimas em suportes porosos pode exercer efeito protetor para a enzima, diminuindo efeito inibitório de substâncias presentes no meio reacional ou ainda amenizando a inibição de altas concentrações de substrato e produtos (RODRIGUES et al., 2013).

A imobilização de enzimas é relatada desde o início do século XIX. Entretanto, a base para as tecnologias existentes atualmente foi desenvolvida nos anos 60 (BRENA; BATISTA-VIEIRA, 2006). Atualmente, podemos dividir os métodos de imobilização tradicionais em três grandes grupos: ligação em um suporte, encapsulação e entrecruzamento, as quais diferem entre si pela forma com que a enzima interage com o suporte (SHELDON, 2007).

A ligação a um suporte pode ser de natureza física, iônica ou covalente. A ligação física é um método que preserva as características da enzima por ser realizado em condições amenas, porém é geralmente muito fraca e não resiste às condições de operação industrial. No caso da adsorção física, a enzima se liga ao suporte através de pontes de *van der Waals*, pontes de hidrogênio, ou ainda interações hidrofóbicas. Já a interação iônica entre a enzima e o suporte é realizada por ligações de sais. Esse processo de imobilização pode ser revertido pela mudança nas condições que influenciam as interações, como pH, força iônica e temperatura (BRENA; BATISTA-VIEIRA, 2006)

A ligação da enzima ao suporte por meio de ligações covalentes garante que a enzima não escape do suporte devido à sua natureza irreversível, porém tanto enzima quanto suporte não podem ser recuperados em sua forma original. Esta técnica ainda pode levar a perdas consideráveis de atividade enzimática (SHELDON, 2007). Nesta técnica, geralmente realiza-se a ativação da matriz do suporte com a adição de um grupo reativo ao polímero, geralmente para a geração de um grupo eletrofílico, o qual reage com os grupos nucleofílicos dos aminoácidos residuais das proteínas. Dentre os mais utilizados, estão os grupos amina (NH_2), terminal e o da lisina, grupo carboxila (CO_2H), terminal e os do ácido aspártico e ácido glutâmico, hidroxila (OH) da serina e treonina e o grupo (SH) da cisteína (SILVA, 2012). Para garantir uma atividade catalítica eficiente, o resíduo de aminoácido necessário para as funções catalíticas da enzima não pode estar envolvido nas ligações de imobilização (BRENA; BATISTA-VIEIRA, 2006).

O encapsulamento de enzimas consiste no aprisionamento físico da enzima em uma matriz polimérica, na qual geralmente se realiza uma ligação covalente para fortalecer a interação enzima-suporte (SHELDON, 2007). É importante que substratos e produtos sejam capazes de difundir livremente pela matriz do gel, evitando problemas difusionais. Já as enzimas não devem ser capazes de passar pela matriz do gel para que não ocorra escape e perda catalítica (BRENA; BATISTA-VIEIRA, 2006).

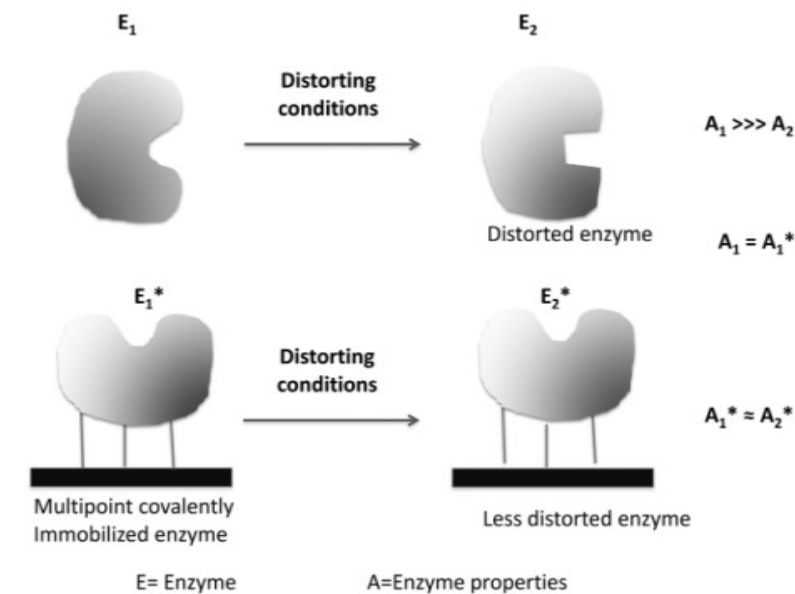
Entrecruzamento (crosslinking) é a preparação de agregados ou cristais de enzimas, formando macropartículas a partir da adição de um agente bifuncional, sem a necessidade de um suporte. Possui vantagens como a elevada atividade catalítica, estabilidade e baixo custo devido à ausência de suporte. Dentre as técnicas utilizadas podemos citar os CLECs (crosslinked enzyme crystals) e os CLEAs (crosslinked enzyme aggregates) (SHELDON, 2007).

A imobilização multipontual, na qual diversos grupos de uma mesma molécula de enzima se ligam a grupos reativos do suporte de imobilização, vem sendo utilizada com grande sucesso no aumento da estabilidade da enzimas (ADRIANO et al., 2008; MANRICH et al., 2010; MILESSI et al., 2015). Esse método foi proposto por Guisan (1988), no qual os grupos amino presentes nas lisinas da enzima se ligam aos grupos aldeído introduzidos na superfície do suporte (ex. agarose ativada com epícloridrina). As ligações multipontuais entre grupos reativos da mesma molécula da enzima e os introduzidos no suporte conferem rigidez à enzima, evitando a perda de atividade causada pela alteração conformacional da estrutura tridimensional da mesma, decorrente de exposição a calor e solventes (Figura 2.12). Nos

casos de enzimas que possuem poucas lisinas, uma etapa de aaminação pode ser utilizada para viabilizar o processo.

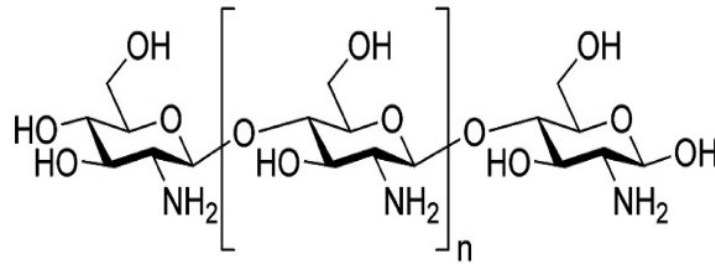
Dentre os suportes mais utilizados para a imobilização enzimática podemos destacar polímeros naturais como agarose, celulose, quitosana e alginato e polímeros sintéticos como sílica e poliestireno. A escolha do suporte deve levar em conta suas propriedades físicas e químicas, além de sua estabilidade, a qual pode influenciar no armazenamento e regeneração do biocatalizador e, conseqüentemente, no seu custo (SILVA, 2012).

Figura 2.12 – Imobilização e estabilização de enzima por meio de ligação multipontual (RODRIGUES et al., 2013)



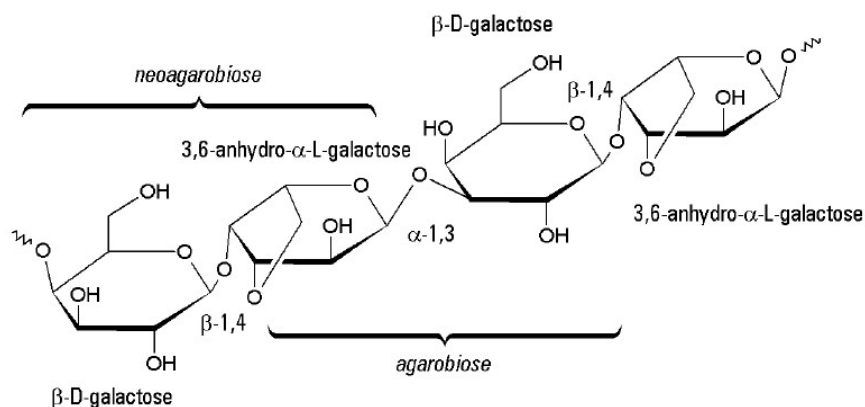
A quitosana é um polissacarídeo de baixo custo produzida por desacetilação da quitina, polímero natural presente na parede celular de fungos e conchas de moluscos (MAHAPATRO; SINGH, 2011). É um suporte catiônico, que possui grupos amino dispostos em sua estrutura. É solúvel em pH ácido, enquanto em pH básico assume a forma de gel pois os grupos amino estão descarregados (pK_a 6,5). Os grupos amino presentes na quitosana podem ser ativados com um agente ativador (ex. glutaraldeído) produzindo grupos aldeídos extremamente reativos, os quais se ligam ao grupo amino da enzima (SILVA, 2012).

Figura 2.13 – Estrutura principal da quitosana (MAHAPATRO; SINGH, 2011)



A agarose é um polímero de galactose obtido pela purificação do ágar de algas vermelhas, o qual é biocompatível e forma hidrogéis através de agregações intermoleculares por mudanças térmicas. É formado por unidades de agarobiose (duas moléculas de galactose) unidas por ligações glicosídicas α e β . Além de apresentar elevada porosidade, possui caráter hidrofílico e é de fácil derivatização. Sua principal desvantagem é seu custo elevado. Os polímeros de agarose formam uma malha apertada na qual o tamanho do diâmetro depende da porcentagem de agarose. Uma maior interação enzima/suporte ocorrerá utilizando agarose com maior porcentagem, entretanto, quanto maior a porcentagem de agarose, menor o diâmetro dos poros, sendo necessária otimização desta relação para sua aplicação em um processo (SILVA, 2012; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SAJUST, 2016).

Figura 2.14 – Estrutura principal da agarose, onde as unidades de dissacarídeos que se repetem são chamados de agarobiose (ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SAJUST, 2016)



A escolha do binômio suporte + método de imobilização deve ser feita cuidadosamente, considerando as características químicas e físicas do sistema e muitas vezes

de forma empírica, uma vez que a escolha do método errado pode resultar na inativação da enzima.

2.8.2 Imobilização de células

A imobilização celular se originou nos anos setenta e foi desenvolvida a partir de conhecimentos adquiridos anteriormente na imobilização de enzimas. O objetivo principal era simplificar as biorreações catalisadas por múltiplas enzimas intracelulares, uma vez que estas reações, além de complexas, envolviam cofatores e coenzimas de custo elevado. Sendo assim, a utilização direta de células imobilizadas se tornava economicamente mais viável que a separação e purificação das enzimas para imobilização (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999; BAI et al., 2008). A partir da década de 1980, as tecnologias empregando células imobilizadas foram ganhando importância, podendo atualmente ser encontradas milhares de publicações referentes a imobilização celular (JUNTER; JOUENNE, 2004; CUNHA, 2006).

Os métodos utilizados para imobilização celular podem ser agrupados em quatro grandes grupos: ligação a superfícies, auto-agregação, contenção por barreiras e aprisionamento em matrizes porosas (KOURKOUTAS et al., 2004).

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies é um método simples e barato, com a desvantagem da vulnerabilidade e perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional (SILVA et al., 2007). Este método envolve a adesão celular a suportes através de ligações iônicas ou covalentes entre as células e os grupos reativos do suporte (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). Materiais celulósicos, como a serragem, e materiais inorgânicos, como vidro poroso e porcelana porosa, são exemplos de superfícies utilizadas para imobilização celular (KOURKOUTAS et al., 2004).

A técnica de imobilização por auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzida, de modo que os biocatalisadores fiquem ligados entre si sem que seja necessária a presença de um suporte (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA E SILVA, 2006). O tamanho relativamente grande dos agregados celulares permite a sua utilização em biorreatores projetados para trabalhos com células imobilizadas, porém devido à ausência de um suporte de imobilização, sua principal desvantagem é instabilidade e baixa resistência a tensão de cisalhamento (KOURKOUTAS et al., 2004).

A contenção por barreiras, também conhecida como contenção em membranas, baseia-se na formação de uma membrana em torno das células, seja esta pré-formada ou formada *in*

situ (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). Este método possui potencial na substituição do aprisionamento em matrizes porosas pois apresenta menores limitações de transferência de massa uma vez que não possui um núcleo gelificado (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA E SILVA, 2006). Porém, sua desvantagem é a ocorrência de bioincrustação na membrana devido ao crescimento celular (KOURKOUTAS et al., 2004).

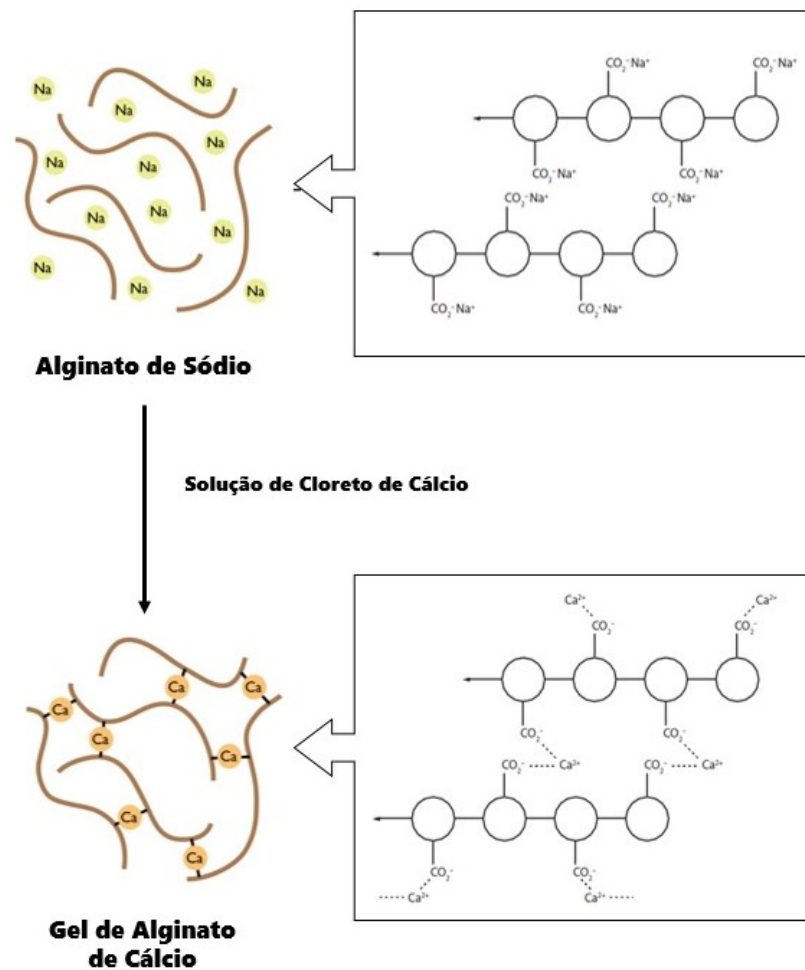
O aprisionamento em matrizes porosas consiste na difusão celular em uma matriz porosa, a qual pode ser pré-formada ou sintetizada *in situ*. Este método é muito utilizado para imobilização de células viáveis pois permite preservar a integridade celular pelo emprego de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização (CARVALHO, 2000; SILVA et al., 2007). Outra vantagem deste método é a formação de esferas, as quais contornam limitações de transferência de massa pois possuem grande superfície de contato (COVIZZI et al., 2007).

De acordo com Silva et al. (2007), o método de imobilização celular deve ser de fácil aplicação e ampliação de escala, econômico e preservar as propriedades catalíticas desejadas. O suporte utilizado não deve ser tóxico para as células, deve ter alta capacidade de retenção, pouca sensibilidade às condições mecânicas (tensão de cisalhamento), deve ser ambientalmente seguro ou reciclável e possuir alta difusividade de substratos e produtos (PRADELLA, 2001). Deve ainda não reagir com os componentes do meio e ser insolúvel sob as condições de processo (SILVA et al., 2007). Dentre os suportes utilizados para imobilização celular podemos citar polímeros naturais como alginato, K-carragenana e pectina; polímeros sintéticos como poliacrilamida e poliuretano; e ainda materiais inorgânicos como sílica, zircônia e vidro (PRADELLA, 2001).

Não existe um método de imobilização ou um suporte universal, as condições de imobilização utilizadas em um processo dependerão das características do microrganismo e das condições de condução do processo. Dentre os métodos apresentados, a imobilização celular por aprisionamento em polímeros naturais se destaca por se tratar de um método simples e que permite uma retenção celular eficiente sem perda de atividade catalítica (CARVALHO, 2000; SARROUH, 2009)

O alginato de sódio é o polímero natural mais estudado para imobilização de células viáveis devido à sua biocompatibilidade (HERNÁNDEZ et al., 2010). É um polissacarídeo linear presente em algas marrons constituído de unidades de ácido manurônico ligadas por ligações glicosídicas β -(1,4) e também por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo α -(1,4) (GUO et al., 2006; GUIDONI et al., 2008), conforme Figura 2.15.

Figura 2.16 – Esquemática da reação de gelificação do alginato de sódio com cloreto de cálcio (Adaptado de Royal Society of Chemistry).

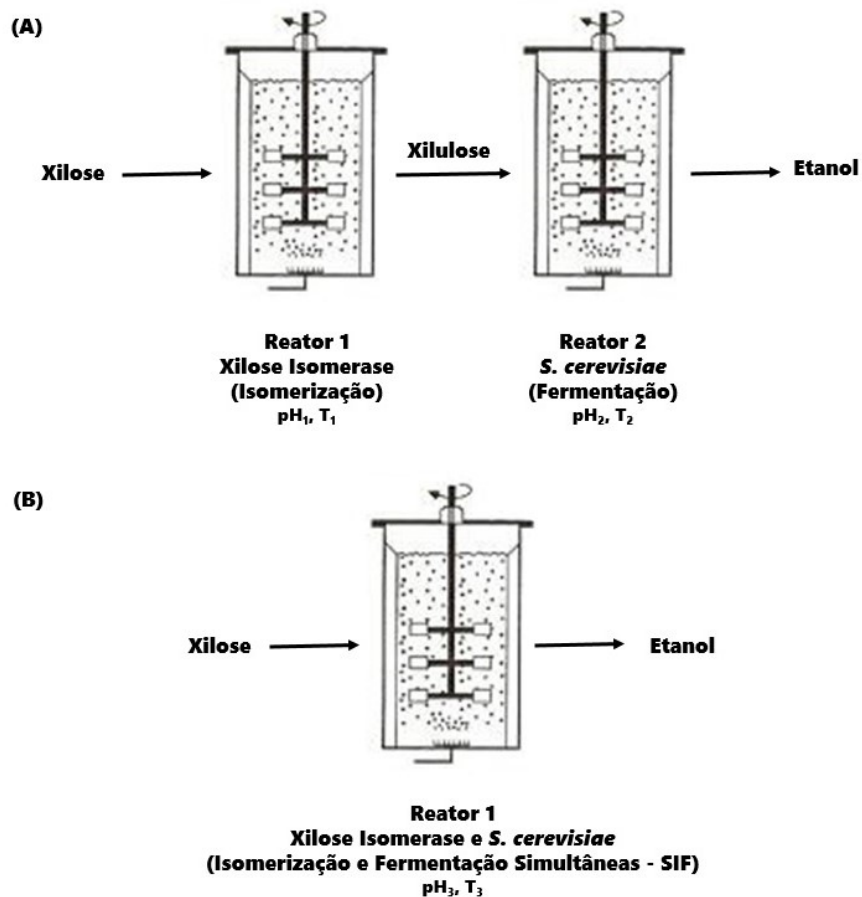


2.9 Processo integrado de produção de etanol

A produção de etanol a partir de xilose, como demonstrado anteriormente, requer como etapa inicial a isomerização desta pentose. Como a levedura *S. cerevisiae* não assimila xilose naturalmente, esta etapa pode ser realizada de duas formas, conforme Figura 2.17 (MONTAÑO, 2013).

A realização da isomerização e fermentação da xilose em etapas separadas permite operar ambos os processos em suas condições ótimas e, conseqüentemente, em alta taxa de reação. Porém, possui a limitação da reversibilidade da reação de isomerização de xilose a xilulose, na qual a relação de equilíbrio xilose:xilulose é da ordem de 5:1 (SILVA et al., 2012).

Figura 2.17 – Processo de produção de etanol a partir de xilose utilizando isomerização e fermentação em etapas separadas (A) e isomerização e fermentação simultâneas (SIF) da xilose (B).



A isomerização e fermentação simultâneas (SIF), por sua vez, permite contornar a questão do equilíbrio químico uma vez que a xilulose é consumida pela levedura, deslocando o equilíbrio da reação para a formação de xilulose. Este processo, porém, possui a limitação de que as condições ótimas de operação são diferentes para a enzima e a levedura (NAKATA; MIYAFUJI; SAKA, 2009). A XI apresenta pH ótimo entre 7,0-8,0 e temperatura ótima entre 70 e 80°C enquanto a levedura possui pH ótimo entre 4,0-5,0 e temperatura entre 30 e 35°C, dependendo da linhagem (MONTAÑO, 2013).

Diversos estudos vêm tentando realizar a SIF de xilose eficientemente apesar da diferença entre as condições ótimas das enzimas e das leveduras. Lastick et al. (1989) estudaram a produção de etanol a partir da isomerização e fermentação simultâneas de xilose utilizando xilose isomerase e a levedura *Saccharomyces pombe* e obtiveram elevada produção

de xilitol como subproduto e baixo rendimento, com uma produção de 16,5 g/L de etanol a partir de 60 g/L de xilose a 35°C em 48 horas. Liu e Wu (2012) expressaram xilose isomerase de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 em *Escherichia coli* BL21 e utilizaram esta bactéria recombinante para realizar a etapa de isomerização em SIF de xilose com *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar da produção de etanol obtida ter sido superior à observada com *Pichia stipitis*, a produtividade do sistema era muito baixa 0,04 g/L.h.

A grande maioria dos estudos sobre SIF de xilose utilizam xilose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* em sua forma livre. A utilização destes biocatalizadores em sua forma imobilizada é pouco explorada. Para a produção de etanol 2G a utilização de microrganismos imobilizados se mostra uma alternativa interessante para contornar a baixa velocidade de fermentação de xilulose, pois permite o emprego de elevadas concentrações celulares no reator. Silva (2013), buscando associar as vantagens dos biocatalisadores imobilizados com a estratégia SIF, desenvolveu um biocatalisador contendo XI e *S. cerevisiae* coimobilizadas em alginato de cálcio. Com esta proposta, um rendimento de 0,34 g/g e produtividade de 1,8 g/L.h de etanol foram observados a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar não destoxificado. Contudo, a baixa velocidade de fermentação de xilulose e a alta concentração de xilose presente no meio mostrou que o sistema era passível de contaminação por microrganismos consumidores de xilose.

Montaño (2013), dando continuidade aos estudos desenvolvidos por Silva (2013), utilizaram o biocatalisador contendo xilose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizados em gel de alginato de cálcio para a produção contínua de etanol em reator de leito fixo (32,5 g/L de xilose, 32°C, pH 5,6 e $\tau = 15$ h de tempo de residência). Os autores obtiveram um rendimento de 0,37 g/g com uma produtividade de 0,57 g/L.h. Entretanto, devido a ocorrência de contaminação o processo foi interrompido após 18 dias.

Para contornar este problema, foi proposta a patente depositada em 19/09/2014 sob o número BR 10 2014 023395 4 (GIORDANO et al., 2014), que utilizaria como substrato um meio de difícil assimilação por microrganismos contaminantes, os xilooligômeros. Essa patente, “Sistema catalítico e processo de obtenção de bioetanol 2G a partir de xilana/oligômeros de xilose”, prevê também a possibilidade de utilização de levedura *S. cerevisiae* geneticamente modificada para atuar simultaneamente com as enzimas imobilizadas.

A hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) de hemicelulose é pouco relatada na literatura. Nakata, Miyafuji e Saka (2009) estudaram a produção de etanol a partir

de madeira de faia japonesa utilizando a integração de hidrólise da xilana com β -xilosidase, seguida pela isomerização da xilose formada pela enzima xilose isomerase e fermentação da xilulose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com os autores, a integração das etapas de isomerização e fermentação ou hidrólise e isomerização, separadamente, apresentaram os melhores resultados. Na realização das três etapas simultâneas os autores obtiveram uma produção de etanol de 0,62 g/L (13 % do rendimento teórico) em pH 5 e 30°C. A realização de processos SHIF utilizando células e enzimas imobilizadas, por sua vez, não foi relatada na literatura até o presente momento.

2.10 Biorreatores de leito fixo para células e/ou enzimas imobilizadas

A otimização de um processo utilizando células e/ou enzimas imobilizadas será possível somente a partir da escolha do biorreator adequado ao sistema. Embora atualmente exista uma grande variedade de tipos de biorreatores disponíveis, esta escolha dependerá de fatores como facilidade de operação, características de mistura e homogeneização, transferência de oxigênio, distribuição de células viáveis, atrito com o biocatalisador, facilidade de scale-up, cinética de reação, necessidade de controle do processo e custo do biorreator (SANTOS, 2005; COVIZZI, 2007; MILESSI, 2012).

A maioria dos biorreatores utilizando células e/ou enzimas imobilizadas é composta por três fases distintas: sólida (biocatalisador imobilizado), líquida (substratos e produtos) e gasosa (ar ou gás alimentado ou produzido no reator). Na literatura relata-se a utilização de biorreatores de diferentes configurações para a realização de processos com enzimas e/ou microrganismos imobilizados, porém o mais utilizado é o reator de leito fixo, pois apresenta baixo custo de produção e operação e facilidade de controle do processo (RIVALDI; SARROUH; SILVA, 2008; MONTAÑO, 2013).

Biorreatores de leito fixo consistem em biorreatores nos quais as células imobilizadas são empacotadas em um leito pelo qual o meio de fermentação é escoado (CANILHA; CARVALHO, ALMEIDA E SILVA, 2006). Estes biorreatores promovem a fácil separação entre as fases e permitem vazões elevadas (GALACTION et al., 2011). Dentre suas desvantagens, podemos citar a possível formação indesejável de caminhos preferenciais de escoamento no interior do leito, induzindo um desvio do fluxo e uma conversão ineficiente de substrato (CASCAVAL; GALACTION; ROTARU, 2011). Entretanto, sua utilização em

sistemas operados de modo contínuo com elevados rendimentos e produtividades tem sido relatada na literatura.

Num sistema conduzido de modo contínuo, o estado estacionário é atingido e o substrato é constantemente alimentado para o reator enquanto o caldo fermentado é descarregado com a mesma vazão, mantendo-se o volume do reator constante. A produtividade do sistema é um dos parâmetros mais importantes do processo e depende de fatores como a concentração de substrato, a concentração de células e a taxa de diluição do sistema (inverso do tempo de residência). Assim sendo, a escolha do tempo de residência no processo deve ser feita objetivando máxima conversão do substrato para atingir-se maiores produtividades (SILVA, 2013).

Giordano, Trovati e Schimidell (2008) avaliaram a produção contínua de etanol a partir de amido utilizando a enzima glicoamilase co-imobilizada em gel de pectina com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores utilizaram um sistema composto por três reatores de leito fixo em série e alimentaram o sistema com xarope de farinha de mandioca (163,0 g/L de açúcares totais) obtendo um rendimento de 83% e uma produtividade de 5,8 g/L.h, com uma conversão de 94% do substrato inicial.

Bangrak, Limtong e Phisalaphong (2011) utilizaram células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio reforçado com esponja natural para a produção de etanol. O sistema era alimentado com 220 g/L de glicose com uma taxa de diluição de 0,2 h⁻¹. Os autores obtiveram uma produção de etanol de 57,4 g/L (11.5 g/L.h). De acordo com os autores, a produtividade obtida em modo contínuo foi de 6 a 8 vezes maior do que a observada em bateladas simples.

Nigam, Mandal e Singh (2015) obtiveram rendimento em etanol de 0,462 g/g (90,6% do teórico) com uma produtividade de 3,10 g/L.h na produção de etanol a partir de xilose por *Clavispora opuntiae* imobilizadas em gel de alginato. Os autores foram capazes de operar o reator por 45 dias sem queda de conversão no processo. Roohina, Mohammadi e Najafpour (2016) estudaram a produção contínua de etanol a partir de soro de queijo utilizando *Kluyveromyces marxianus* imobilizadas em carboximetil celulose (CMC) e obtiveram um rendimento em etanol de 0,49 g_{etanol}/g_{lactose}, 91,1% do teórico.

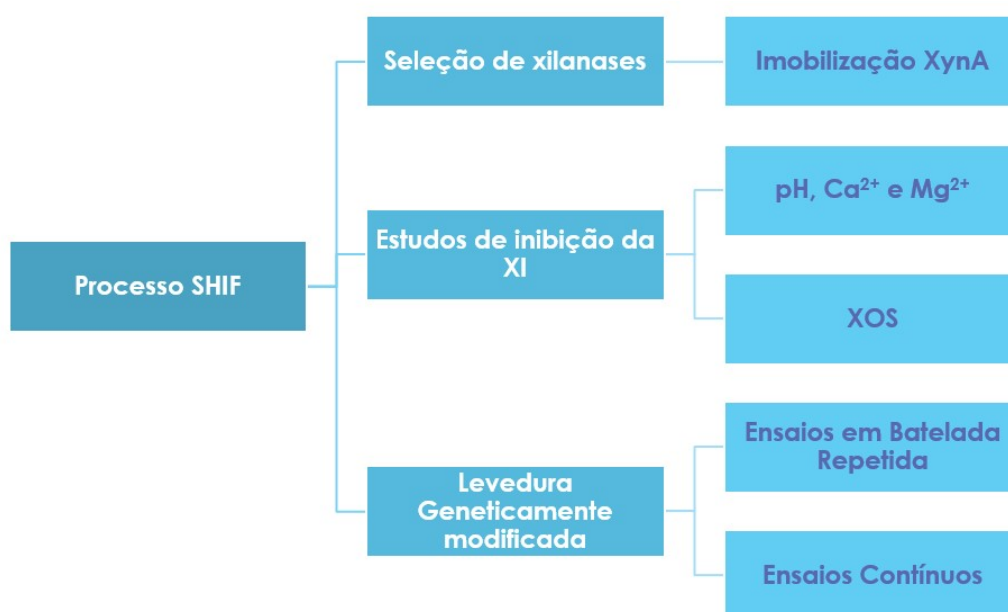
Apesar dos excelentes resultados relatados utilizando-se reator de leito fixo em processos com células imobilizadas, até o presente momento não foi verificado na literatura estudos utilizando este modo de operação para hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) de hemicelulose utilizando xilanases, xilose isomerase e levedura co-imobilizadas. Uma

vez que o aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa é crucial para a viabilidade econômica do etanol 2G, estudos envolvendo a SHIF de hemicelulose são de importância acadêmica e industrial e podem ajudar a estabelecer um processo integrado de produção de etanol 2G no conceito de biorrefinaria.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho envolveu a realização de estudos para alcançar o objetivo principal de desenvolvimento de uma tecnologia escalonável para a produção de etanol 2G a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar (Figura 3.1). Visando o processo SHIF de hemicelulose, primeiramente realizou-se a seleção de xilanases para compor o *pool* de enzimas do biocatalisador. Estudos de imobilização e estabilização da xilanase selecionada foram realizados para viabilizar sua incorporação no biocatalisador da SHIF. Em seguida, ensaios SHIF foram realizados, os quais levaram à necessidade de estudar os efeitos do pH e dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a atividade da enzima xilose isomerase. Por fim, o processo SIF utilizando levedura geneticamente modificada foi avaliado. Para isso, foram realizados ensaios preliminares em batelada repetida para avaliação de estabilidade operacional das células recombinantes em presença de inibidores, como o ácido acético. Posteriormente, foram conduzidos experimentos contínuos em reator de leito fixo para a produção de etanol a partir de xilose utilizando a levedura recombinante imobilizada em gel de alginato de cálcio.

Figura 3.1 – Etapas realizadas visando o desenvolvimento de tecnologia escalonável de produção de etanol 2G a partir da SHIF da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.



3.1. Materiais

Suportes e ativadores de imobilização: foram utilizados como suporte quitosana com 85% de desacetilação (Polymar S.A./Ceará, Brasil), agarose 6BCL (Amersham Pharmacia Biotech AB/ Uppsala, Suécia) e alginato de sódio (Sigma-Aldrich/St Louis, EUA). Utilizou-se na etapa de ativação dos suportes glutaraldeído 25% (Vetec/São Paulo, Brasil), glicidol (Sigma-Aldrich/St Louis, EUA), epícloridrina (Acros Organics/Geel, Bélgica) e borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich/St Louis, EUA).

Enzimas: os preparados de xilanases utilizados encontram-se detalhados na Tabela 3.1. A enzima xilose isomerase solúvel (E.C. 5.3.1.5) utilizada foi gentilmente doada pela Genencor International (Califórnia, EUA) e está disponível comercialmente como GENSWEET SGI, produzida por *Streptomyces rubiginosus* com atividade de 3400 UI/mL (60°C e pH 7).

Microrganismos: Nos experimentos realizados com levedura selvagem utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* (Itaiquara®, Brasil). Já nos experimentos realizados utilizando-se levedura geneticamente modificada utilizou-se as linhagens de *S. cerevisiae* GSE16-T18 e GSE16-T18-HAA1, gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Johan M. Thevelein (Leuven, Bélgica).

Substratos: Utilizou-se como substrato para atividade de xilose isomerase frutose (Synth/São Paulo, Brasil). Já para os ensaios de atividade de xilanases e hidrólise enzimática de xilana comercial, utilizou-se xilana de bétula (Sigma-Aldrich/St. Louis, EUA) ou xilana de faia (Sigma-Aldrich/St. Louis, EUA), uma vez que a xilana de bétula foi descontinuada pelo fornecedor durante a realização deste trabalho. Porém, ambos os substratos possuíam características semelhantes e mais de 90% de monômeros de xilose em sua composição.

Para os ensaios fermentativos em meio sintético utilizou-se xilose comercial (Sigma-Aldrich/St. Louis, EUA), peptona (Neogen/Michigan, EUA), extrato de levedura (Himedia/Mumba, Índia) e licor rico em XOS obtido pelo tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar.

O bagaço de cana-de-açúcar (teor de umidade de aproximadamente 50%) foi gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC/Piracicabe, Brasil).

Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

3.2. Seleção de xilanases

Considerando que o mecanismo de ação e o perfil de produtos obtidos na hidrólise de xilana empregando diferentes xilanases irá depender das características das enzimas e do substrato utilizados, realizou-se uma etapa de seleção de enzimas a serem utilizadas incorporadas no biocatalizador para a SHIF da hemicelulose. Para isso, 8 preparados de xilanases foram testados (1 recombinante e 7 comerciais), de acordo com a Tabela 3.1. As enzimas foram caracterizadas por eletroforese e sua atividade catalítica analisada em relação a variação de pH e na hidrólise de xilana de faia comercial.

Tabela 3.1 – Características dos preparados enzimáticos avaliados

Código	Enzima	Fornecedor	Atividade específica (UI/mg)
XAS-1	Recombinante de <i>Bacillus subtilis</i> (<i>XynA</i>)	Vedartis (Brasil)	54,6
XAS-2	Multifect CX 12L A03227	DuPont – Genencor (EUA)	1282,2
XAS-3	β -Glicosidase + Xilanase NS22002	Novozymes (Dinamarca)	57,2
XAS-4	Xilanase NS50030	Novozymes (Dinamarca)	121,9
XAS-5	Multifect CX XL A03139	DuPont – Genencor (EUA)	22,7
XAS-6	Acellerase XC A03302	DuPont – Genencor (EUA)	114,7
XAS-7	Acellerase XY A03304	DuPont – Genencor (EUA)	375,4
XAS-8	Xilanase Novo NS22036	Novozymes (Dinamarca)	173,3

3.2.1. Estabilidade ao pH

Para avaliar-se a viabilidade das xilanases no pH utilizado no processo SHIF (5,6), realizou-se a quantificação da atividade das xilanases em xilana de faia (10 g/L) em 50°C, variando-se o pH (de 3,0 a 8,0). Para o ajuste correto do pH, a xilana foi preparada nos seguintes tampões: tampão citrato 50mM (pH 3, 4 e 5), tampão fosfato 50 mM (pH 6 e 7) e tampão bicarbonato de sódio 50mM (pH 8). A metodologia para determinação de atividade em xilanase é descrita no Item 3.9.2.

3.2.2. Eletroforese

As soluções contendo xilanases foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE (gel poliacrilamida 10%) seguindo as condições desnaturantes descritas por Laemmli (1970) em sistema MiniProtean (Bio-Rad). A corrida do gel foi realizada por 90 minutos a uma tensão de 160 V em cuba de eletroforese vertical, conectada a uma fonte de alimentação (Power PAC 1.000, BIORAD-USA) contendo tampão de corrida (Tris base 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% m/v, pH 8,3). As massas moleculares das enzimas foram determinadas utilizando marcador molecular Coomassie Blue Brilliant. Após as corridas das amostras, o gel foi corado por 30 minutos em uma solução contendo 0,25% de Coomassie Blue Brilliant G-250 (m/v), 5% etanol e 1% de ácido acético (v/v); e descorado com uma solução de 30% etanol e 10% ácido acético (v/v) por 1h.

3.2.3. Hidrólise da xilana de faia

Os ensaios de hidrólise enzimática da xilana de faia foram realizados utilizando-se a fração solúvel da xilana de faia como substrato (25,4 g/L), a qual foi preparada em tampão citrato 50 mM (pH 5,6 e 50°C por 1h) e centrifugada durante 20 minutos a 9500xg e 4°C. Ofereceu-se 150 UI/g_{xilana} de enzima (livre ou imobilizada). A reação foi conduzida em volume de 5mL a 50°C sob agitação mecânica durante 24 h. Amostras foram retiradas e os XOS produzidos foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito no Item 3.9.3, enquanto os açúcares redutores totais foram analisados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

3.3. Imobilização de endoxilanase de *Bacillus subtilis* (XynA)

Estudos de imobilização e estabilização da endoxilanase de *B. subtilis* (XynA) foram realizados para viabilizar sua utilização incorporada ao biocatalisador no processo SHIF e assim utilizar-se das vantagens da técnica de imobilização de enzimas. Ensaio de imobilização foram realizados em 3 suportes: quitosana-glutaraldeído; quitosana-glioxil e agarose-glioxil, e os derivados obtidos foram submetidos a avaliação de estabilidade térmica e operacional.

3.3.1. Preparação de Agarose-glioxil

O gel de agarose 6% foi suspenso em água (30 mL/105g de agarose) e mantido em banho de gelo. Solução de NaOH (1,7 N), preparada a frio e contendo 28,5 mg/ml de borohidreto de sódio foi adicionada à suspensão de agarose (50 mL de solução de NaOH/105g de agarose). Posteriormente, adicionou-se glicidol gota a gota (36 mL/105g de agarose). A suspensão foi suavemente agitada a 25°C durante 16 h. O gel de agarose-gliceril foi suspenso em água (895 mL/105g de agarose-gliceril) e periodato de sódio foi adicionado (3,21g/105g de agarose-gliceril) (GUISAN, 1988). A suspensão foi mantida sob agitação suave durante 2h a fim de maximizar o número de grupos de glioxil formados. A quantificação de grupos de glioxil foi feita por iodometria (GUISAN, 1988). O gel de agarose-glioxil foi lavado e armazenado a 4°C.

3.3.2. Preparação do gel de quitosana

O gel de quitosana foi preparado de acordo com metodologia modificada de Budriene et al., (2005). Quitosana 2 ou 4% (m/m) (para imobilização de xilanase e XI, respectivamente) foi solubilizada em ácido acético 2% (v/v) e homogeneizada por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução homogênea foi então aquecida e mantida a 50°C. KOH 0,5M foi adicionado na proporção 3:2 (v/v) (volume de KOH/volume de solução) e a solução foi mantida sob agitação por 30 minutos. Ao final, o gel obtido foi lavado com água destilada e recuperado por filtração.

3.3.3. Ativação do gel de quitosana com glioxil

Quitosana-glioxil foi preparada misturando o gel obtido no Item 3.3.2, sob agitação, com uma solução aquosa contendo NaOH 2M e 0,12M NaBH₄, em banho de gelo na proporção 1:10 ($\frac{g_{\text{seca}}}{\text{suporte}} : V_{\text{total}}$) (BEPPU et al., 2004). Em seguida, epicloridrina (1mL/g_{gel}) foi adicionada e mantida sob agitação mecânica durante 18h. A seguir, os grupos epoxi formados na superfície da quitosana foram hidrolisados a grupos gliceril por incubação em 0,5M de ácido sulfúrico (1h e 25°C). No passo seguinte, o gel de quitosana reagiu com NaIO₄ 0,1M (1ml de solução por grama de gel) durante 2 h à temperatura ambiente. Por fim, o gel

foi lavado com excesso de água destilada até à neutralização. O número de grupos de glioxil formados na superfície do material foi quantificado por iodometria (GUISÁN, 1988). Após o procedimento, o gel de quitosana-glioxil foi armazenado até a sua utilização.

3.3.4. Ativação do gel de quitosana com glutaraldeído

Quitosana foi ativada com glutaraldeído seguindo uma metodologia adaptada de Budriene et al. (2005). O processo foi realizado pela adição de glutaraldeído a 10 g de gel de quitosana (tampão fosfato 100 mM pH 7,0) de forma que a solução final tivesse 10g de gel para 100 mL de solução contendo 5% (v/v) de glutaraldeído. A solução foi mantida sob agitação por 60 minutos e temperatura ambiente. O gel obtido foi lavado com água Milli-Q e, em seguida, utilizado para imobilização de enzimas.

3.3.5. Imobilização de XynA em diferentes suportes

No momento da realização desta etapa do trabalho, a XynA apresentava $193,0 \pm 5,9$ UI/mL de atividade (20,9 UI/mg), devido a perdas de atividade com o tempo nas condições de armazenamento, uma vez que se trata de um extrato enzimático produzido *indoor* e não um preparado comercial, sendo menos estável em sua forma solúvel. Desta forma, os procedimentos de imobilização de xilanase foram inicialmente realizados para uma carga enzimática de 105,0 UI/g de suporte ($5 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$), para os três suportes preparados. Para o suporte agarose-glioxil, visando avaliar problemas de transferência de massa, a imobilização também foi realizada para as cargas de enzimas: 3,93; 39,3 e 393,0 UI/g de suporte. Para todos os procedimentos de imobilização, o suporte foi suspenso em uma solução enzimática na relação 1:10 ($V_{\text{gel}}/V_{\text{solução}}$). As imobilizações de agarose-glioxil e quitosana-glioxil foram realizadas a pH 10,0 (tampão bicarbonato de sódio 100 mM). A suspensão foi mantida a 25 °C sob agitação constante. As amostras do sobrenadante foram retiradas em intervalos periódicos e a atividade enzimática da xilanase foi medida de acordo com o Item 3.9.2. Ao final, os grupos aldeído remanescentes foram reduzidos utilizando-se boro-hidreto de sódio (1,0 mg/ml, 4 °C, 30 min) e as bases de Schiff foram convertidas em ligações amina secundárias muito estáveis (BLANCO; GUISÁN, 1989).

A imobilização em quitosana-glutaraldeído foi realizada a pH 7,0 em tampão fosfato 100 mM, a 25°C, sob agitação constante. As amostras foram retiradas em intervalos periódicos e a atividade enzimática foi medida. Após os procedimentos de imobilização, os

derivados foram extensivamente lavados com 50 mM de tampão citrato pH 4,8 e armazenado até à sua utilização.

Os parâmetros de imobilização, rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR), foram calculados de acordo com Adriano et al. (2008) (Equações 1 e 2). RI é a razão entre as unidades de enzima imobilizada (unidades de enzima que desapareceram no sobrenadante, teoricamente imobilizada) e as unidades de enzima oferecidas na imobilização. AR é a razão entre a atividade aparente da enzima imobilizada medida ($A_{t_{app}}$) e a atividade teoricamente imobilizada ($A_{t_{teo}}$). Um ensaio em branco sempre foi realizado para tomar em conta uma eventual inativação da enzima em condições de imobilização. A porcentagem de imobilização foi calculada medindo as atividades enzimáticas da solução em branco e no sobrenadante.

$$RI = \left(1 - \frac{A_{t_{sobf}}}{A_{t_{Bf}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

RI: rendimento de imobilização (%);

$A_{t_{sobf}}$: atividade no sobrenadante no tempo final da imobilização (UI/mL);

$A_{t_{Bf}}$: atividade no branco (controle) no tempo final da imobilização (UI/mL).

$$AR = \frac{A_{t_{app}}}{A_{t_{teo}}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

AR: atividade recuperada (%);

$A_{t_{app}}$: atividade aparente do gel (UI/g_{gel});

$A_{t_{teo}}$: atividade teoricamente imobilizada (UI/g_{gel}).

3.3.6. Inativação térmica da XynA

Os ensaios de inativação foram realizados a 56°C. Enzima solúvel e derivados imobilizados foram incubados em tampão citrato 50 mM pH 5,5. Alíquotas foram retiradas periodicamente para quantificação da atividade enzimática residual e o tempo de meia-vida foi estimado.

3.3.7. Hidrólise enzimática da xilana

Nesta etapa, foi estudada a hidrólise da xilana de bétula comercial pela XynA solúvel e imobilizada em agarose-glioxil utilizando a fração solúvel da xilana ou a xilana comercial convencional (composta pelas frações solúvel e insolúvel). A fração solúvel foi obtida pela adição de 4 g de xilana de bétula comercial em 100 mL de tampão citrato 50 mM, pH 5,5 a 50°C. Após 1 hora sob agitação, a solução foi centrifugada durante 20 minutos a 9500xg e 4°C. O sobrenadante foi então recuperado para uso posterior. A massa de xilana não solúvel foi então calculada em peso seco, a qual era 67% da massa inicial. Por conseguinte, a fração solúvel de xilana foi de 1,3 g (13 g/L).

Para os ensaios de hidrólise, soluções ou suspensões de xilana de bétula solúvel ou convencional foram preparadas em tampão citrato 50 mM pH 5,5, a uma concentração de 13 g/L. O substrato de xilana convencional correspondia a 8,7 g/L de insolúveis e 4,3 g/L de xilana solúvel. Ofereceu-se 1,95 UI/mL (enzima livre ou imobilizada). A reação foi conduzida em 5 mL a 50°C sob agitação mecânica durante 24 h. Amostras foram retiradas e os XOS produzidos foram quantificados por CLAE, enquanto que os açúcares redutores foram analisados pelo método de DNS.

3.3.8. Estabilidade Operacional

Ensaio de reciclo foram realizados com 5 ml de xilana de bétula solúvel (13 g/L) em tampão citrato 50 mM (pH 5,5) a 50°C sob agitação constante. O derivado de agarose-glioxil foi oferecido em uma proporção de 150 UI/g de xilana e cada ciclo durou 3h. O derivado foi facilmente recuperado e separado dos produtos por filtração. Entre cada ciclo da reação, o derivado recuperado foi lavado duas vezes com tampão citrato 50 mM (pH 5,5) a 25°C, e, em seguida, um substrato fresco foi adicionado para um novo ciclo. Este procedimento foi realizado sucessivamente por 10 vezes.

3.4. Pré-Tratamento Hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em reator de alta pressão Parr modelo 4848 com capacidade de 2L, munido de controle de agitação mecânica e aquecimento.

O pré-tratamento foi realizado de acordo com condições pré-estabelecidas por Silva (2015), 195°C por 10 min e relação sólido:líquido de 1:10 (m/v). Ao final do processo, o bagaço foi filtrado ainda quente para evitar a precipitação da lignina solubilizada. A fração líquida obtida foi então caracterizada em relação aos teores de açúcares e inibidores.

3.5. Preparação do biocatalisador para o processo SHIF

3.5.1 Imobilização de Xilose Isomerase (XI)

A imobilização da XI foi realizada em quitosana-glutaraldeído de acordo com Silva (2013). A utilização de glioxil foi verificada pelo autor, entretanto foi descartada uma vez que era necessária uma etapa de aminação da enzima, durante a qual perdia-se 40% da atividade catalítica, optando-se assim pela quitosana-glutaraldeído. Assim sendo, para a imobilização da enzima, foi preparada uma solução enzimática a pH 7, 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). Uma alíquota (0,5 mL) foi retirada para controle e o restante da solução foi adicionada ao suporte na razão suporte:suspensão final 1:10 (v/v). Foram oferecidas 50 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}$ de suporte, a suspensão foi homogeneizada e mantida sob agitação mecânica suave à temperatura ambiente por 20 horas. Ao final do processo, o derivado foi reduzido com borohidreto de sódio (1 mg/mL de suspensão) durante 30 min em banho de gelo. O derivado final foi lavado com tampão tris-maleato 200 mM (pH 7), água destilada e tampão tris-maleato 50mM (pH 7) para remoção de enzima residual e do borohidreto de sódio, obtendo-se um derivado em pH neutro.

3.5.2 Co-imobilização dos derivados de Xilanase, XI e *S. cerevisiae* em gel de alginato de cálcio

O processo de co-imobilização foi realizado pelo encapsulamento em gel de alginato de cálcio. Uma solução foi preparada contendo alginato de sódio 1% (m/m) em tampão fosfato 5 mM (pH 8), levedura (10% m/m), as enzimas xilanase e XI imobilizadas (20% m/m, sendo 5% de xilanase e 15% de XI) e 0,5% CaCO_3 . Esta solução era então bombeada com o auxílio de uma bomba peristáltica e *beads* de gel de alginato de cálcio foram formados pelo gotejamento desta solução em uma solução de coagulação contendo cloreto de cálcio e cloreto de magnésio (0,25M), de acordo com procedimento descrito por Silva (2013). O diâmetro

pequeno dos *beads* (entre 1-3 mm) era obtido por uma corrente de ar comprimido posicionada perpendicularmente à saída da mangueira por onde a solução de alginato era bombeada (Figura 3.2). O procedimento foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar e as soluções de alginato e de coagulação foram previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 min. Após a imobilização, os *beads* eram recuperados por filtração, ressuspensos em uma solução de cura (MgSO_4 (4g/L), KH_2PO_4 (10 g/L), uréia (3 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4g/L),) e armazenados a 4°C por 12h antes de serem utilizados nos processos fermentativos.

Figura 3.2 – Sistema utilizado na etapa de co-imobilização de enzimas e levedura em gel de alginato de cálcio



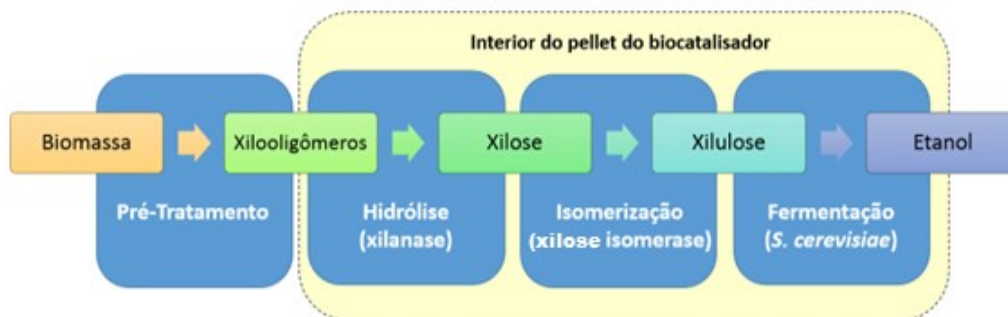
Fonte: Arquivo Pessoal

3.6. Ensaio de Hidrólise, Isomerização e Fermentação Simultâneas (SHIF)

Os ensaios SHIF (Figura 3.3) foram realizados com xilana de bétula comercial ou com a fração líquida hidrotérmica de bagaço de cana-de-açúcar, em frascos de 15 mL contendo 2,4 mL de volume reacional e *beads* de biocatalisador na proporção 1:1 (g de *beads*/mL de meio) e mantidos a 32°C e 150 rpm. Os meios foram suplementados com MgSO_4 (4g/L), KH_2PO_4 (10 g/L), uréia (3 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4g/L), o pH ajustado com HCl ou NaOH 1M e esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm . Como os *beads* de biocatalisador apresentavam elevada quantidade de água (próxima a 90%), um efeito de diluição era observado ao adicionar-se o meio, reduzindo a concentração de sais pela metade no início do processo (SILVA, 2013). Amostras eram retiradas periodicamente para quantificação de substratos e produtos.

Figura 3.3 – Esquema do processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) por biocatalisador imobilizado contendo xilanase, xilose isomerase e *S. cerevisiae*.

Fonte: arquivo pessoal



3.7 Estudo da influência do pH e dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a (XI)

Para investigação da influência dos íons cálcio e magnésio na atividade catalítica da enzima xilose isomerase, quantificou-se a atividade desta enzima de acordo com protocolo do Item 3.9.1 em diferentes pHs (5,0 a 8,0) variando-se as concentrações dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} conforme Tabela 3.2. Foram testadas 9 composições de meio em todos os pHs estudados. O meio considerado padrão era constituído por frutose 2M em tampão Tris-maleato 50 mM (pH 8,0), MgSO_4 50mM e CoCl_2 2,5mM. A partir deste meio padrão, Mg^{2+} e Ca^{2+} foram adicionados em concentrações variadas e o pH foi alterado.

Tabela 3.2 – Composição dos meios utilizados na avaliação da influência dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na atividade de XI realizada em frutose 2M, 60°C e variação de pH de 5,0 a 8,0.

Meio	Descrição	MgSO_4 (mM)	CaCl_2 (g/L)
1	Padrão	50	0
2	2xMg	100	0
3	5xMg	250	0
4	padrão+Ca	50	4
5	2xCa	50	8
6	5xCa	50	20
7	padrão+Ca	50	4
8	2xMg	100	4
9	5xMg	250	4

3.8 Experimentos utilizando levedura geneticamente modificada

3.8.1 Microrganismo e inóculo

Foram utilizadas as leveduras GSE16-T18 e GSE16-T18 HAA1 desenvolvidas no laboratório do Prof. Johan M. Thevelein da KU Leuven, Bélgica. Para os experimentos, um pré-inóculo era realizado pela adição de uma alçada da cultura estoque em 3mL de YPXD 2% e 1mg/mL de ampicilina e deixado em incubadora rotatória por 12h, 200 rpm e 30°C. O inóculo era preparado em frascos de 1L nos quais o pré-inóculo era transferido para 250 mL de YPXD 2% e 1mg/mL de ampicilina e os frascos mantidos a 30°C e 200 rpm por 24h. As células eram recuperadas por centrifugação (4500 rpm por 30 min) e utilizadas nos ensaios fermentativos em sua forma livre ou imobilizada em alginato de cálcio.

3.8.2. Ensaios Fermentativos e Reciclos

Os ensaios foram realizados em frascos com 8 mL de volume reacional (Figura 3.4), contendo células livres ou imobilizadas. Os experimentos utilizando meio sintético foram realizados em meio YPX 40 g/L contendo diferentes concentrações de ácido acético. Já nos experimentos com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado hidrolisado bruto, sem destoxificação, doado pelas Indústrias Praj (Índia), suplementado com 2g/L de uréia. As condições de processo foram 150 rpm, 35° e pH 5,2. Utilizou-se temperatura mais elevada e pH mais baixo do que nos ensaios utilizando levedura selvagem uma vez que a levedura geneticamente modificada apresenta bom desempenho nestas condições, as quais dificultam a contaminação do meio.

Para a realização dos experimentos de reciclo celular em meio sintético ou hidrolisado, ao final de cada ciclo fermentativo, o meio fermentado era retirado por filtração e um novo meio era adicionado.

Figura 3.4 – Frascos utilizados nos experimentos com levedura geneticamente modificada.

Fonte: arquivo pessoal



3.8.3 Viabilidade celular

A viabilidade da levedura foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer. Para a análise da viabilidade de células imobilizadas, antes da coloração com azul de metileno, os *beads* foram dissolvidos em citrato de sódio 8% (m/v), na proporção 100 mg de *beads* por mL de solução sob agitação magnética e temperatura ambiente. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas num espaço definido da câmara de contagem (SILVA, 2013).

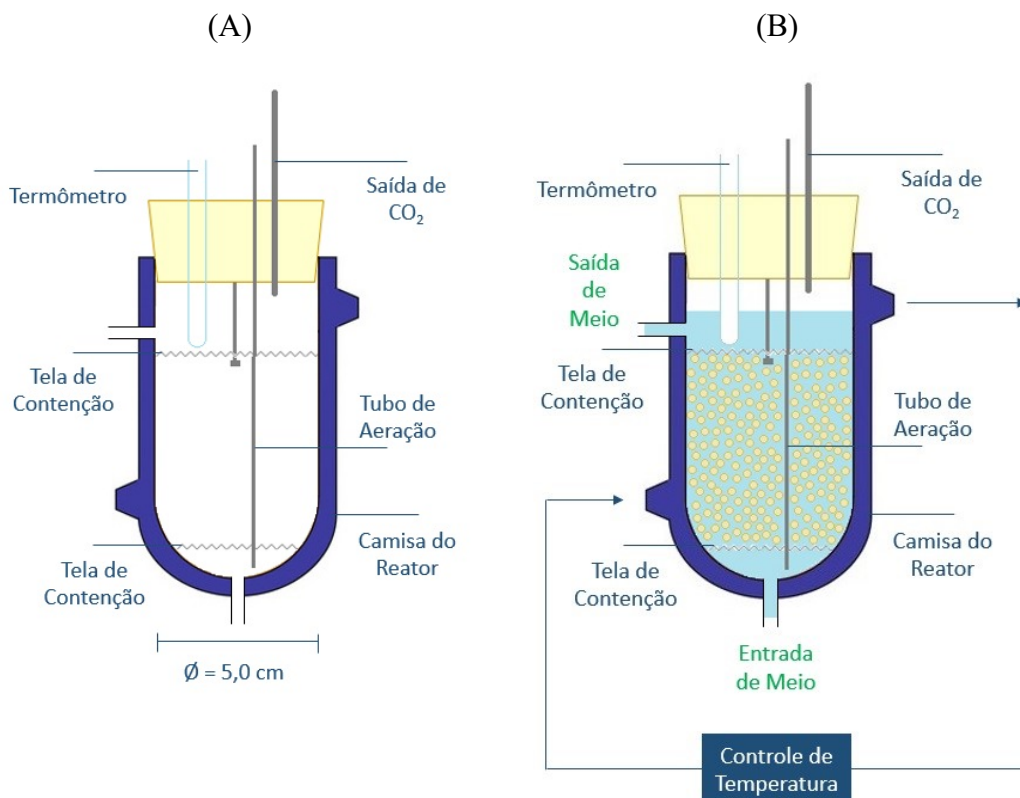
3.8.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV, XL30-FEG, FEI) dos *beads*, as amostras foram preparadas por secagem congelada (freeze drying) em speedvac por 10 minutos. As amostras completamente secas foram cobertas por uma camada de Au-Pd utilizando um dispositivo de pulverização catódica (Edwards S150) a fim de se produzir uma película condutora fina na superfície. O MEV foi operado em condições padrões de vácuo utilizando 10mm de distância de trabalho e voltagem de 10,0 kV.

3.8.5 Experimentos contínuos de produção de etanol

Os estudos da produção contínua de etanol a partir de xilose foram realizados em reator de leito fixo encamizado, com volume útil de 100 mL, no qual os *beads* de alginato ficavam confinados entre duas telas de aço inox (Figura 3.5). Os *beads* (50 g) eram adicionados no reator em câmara de fluxo laminar e o reator era preenchido com meio visando otimizar a disposição dos *beads* no leito, evitando assim espaços vazios. A altura do leito era de 5 cm, com 65 mL de volume de vazios e porosidade 0,63. A tampa do reator possuía 2 orifícios um para permitir a saída de CO₂ produzido e um para entrada de ar, caso fosse necessário aerar o sistema. A tampa também possuía um poço, ocupado pelo termômetro.

Figura 3.5 – Esquema do bioreator utilizado nos experimentos conduzidos em modo contínuo: (A) detalhes estruturais e (B) carregado com meio e *beads* de biocatalisador.

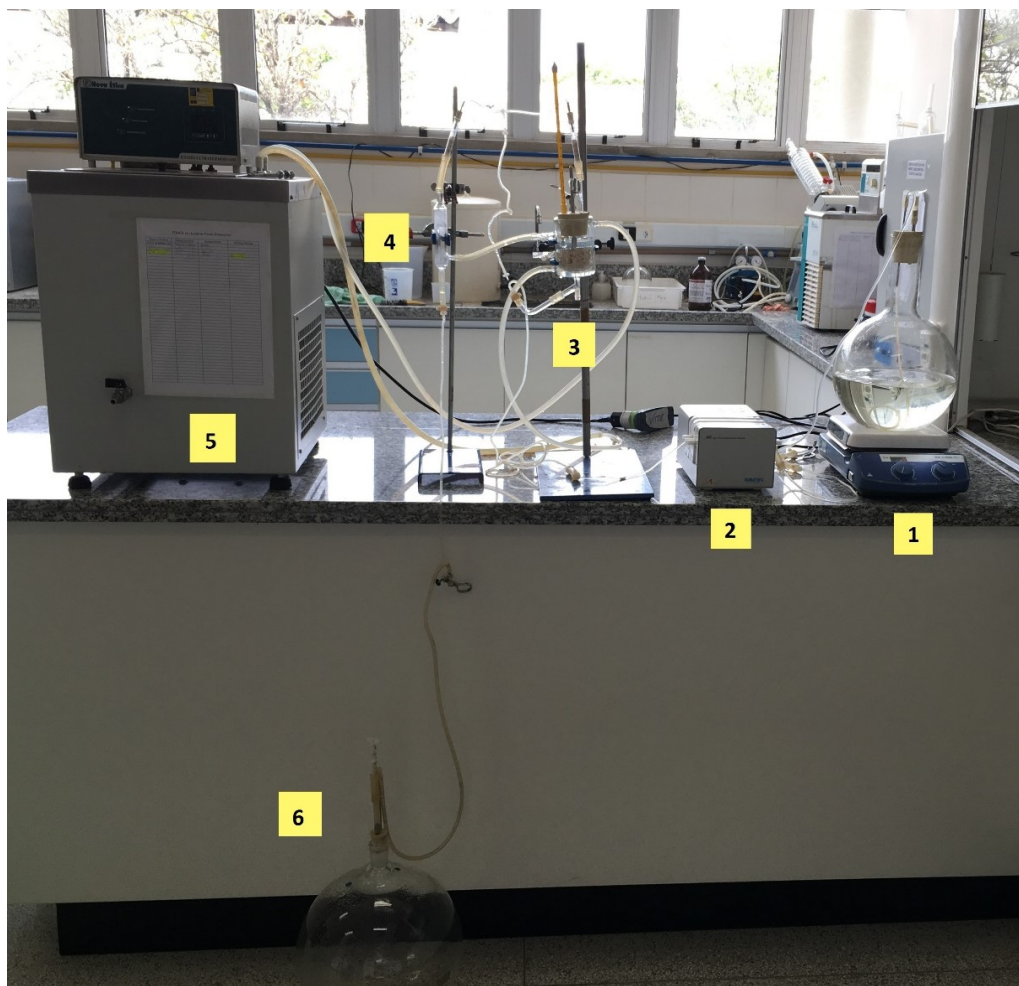


No sistema, a alimentação de meio era realizada pela parte inferior do reator, enquanto o efluente escoava por uma abertura lateral na parte superior. O sistema era equipado com um tubo em L antecedendo o reator, no qual se depositavam sedimentos provenientes do reator,

evitando assim o entupimento das mangueiras e conectores de alimentação. O efluente era descartado em um recipiente devidamente fechado porém com saída para eliminação de CO₂ (Figura 3.6).

O tubo coletor de vidro conectado à saída do reator funcionava como um reservatório para acúmulo de meio na saída do sistema, facilitando a amostragem. A alimentação era realizada por meio de uma bomba peristáltica multicanal capaz de manter a vazão das correntes de entrada e saída do reator constantes. A temperatura dos ensaios foi 35°C, e o tempo de residência variou de acordo com a concentração de xilose utilizada na alimentação, o qual foi estimado baseado em experimentos prévios nos quais se determinou μ_{\max} da levedura.

Figura 3.6 – Sistema utilizado para a produção contínua de etanol a partir de xilose



NOTA: 1.Meio de alimentação; 2. Bomba peristáltica; 3. Reator; 4. Tubo coletor de meio; 5. Banho Termostático; 6. Ambiente de descarte. Fonte: arquivo pessoal.

Foram realizados ensaios contínuos em diferentes concentrações de xilose (40 a 120 g/L) para se determinar a melhor condição de processo considerando a influencia do etanol formado na viabilidade celular. O meio foi suplementado com KH_2PO_4 (5 g/L), MgSO_4 (2 g/L), CaCl_2 (2 g/L) e Ureia (1,5 g/L), de acordo com Silva (2013).

A viabilidade celular da levedura imobilizada era medida no início e no final do processo a partir da dissolução dos *beads* em citrato de sódio 8%.

O desempenho do sistema foi acompanhado pelo monitoramento do pH e concentração de xilose no efluente do reator, a partir da qual era possível estimar-se a conversão do sistema. Amostras eram retiradas a cada tempo de residência até atingir-se o estado estacionário e, após este momento, a cada 12h ou 24h, dependendo da estabilidade do sistema. Os produtos eram quantificados por CLAE. Realizou-se ainda a verificação das amostras por microscopia óptica para identificar possível despreendimento de células, queda de viabilidade celular e presença de contaminantes.

Ao longo dos ensaios realizados, as limitações encontradas foram identificadas e discutidas e soluções foram propostas. As alterações testadas incluíam: adição de ergosterol no meio de alimentação, aeração do sistema, adição de pequena concentração de glicose na alimentação e lavagem do reator.

3.9. Métodos analíticos

3.9.1. Medida da Atividade de Xilose Isomerase (XI)

A atividade de XI foi determinada medindo-se a velocidade inicial de conversão de frutose à glicose (LADISCH et al., 1977). Frutose 2 M foi preparada em tampão tris-maleato 50 mM (pH 7), contendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 mM) e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,5 mM). A reação foi iniciada pela adição da enzima, convenientemente diluída, a 5 mL de solução de frutose a 60°C. Como o substrato da reação era homogêneo, os ensaios utilizando-se enzima imobilizada eram realização sob agitação mecânica (150 rpm), enquanto os ensaios utilizando enzima solúvel eram estáticos. Em intervalos regulares de reação (5, 10 e 15 minutos), foram retirados 100 μL amostras do meio reacional, os quais foram adicionados a 100 μL de HCl 20% (v/v) para inativação da enzima (LIM; SAVILLE, 2007). A concentração de glicose foi determinada colorimetricamente utilizando o kit enzimático comercial contendo glicose oxidase e peroxidase. Uma unidade (UI) foi definida como a velocidade de formação de 1

μmol de glicose por minuto sob as condições de ensaio descritas. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 3:

$$\textit{Atividade (UI. mL}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\frac{\Delta P}{\Delta t}\right) \cdot V_R}{MM_{\text{glic}} \cdot V_E} \cdot D \quad (3)$$

Onde: $\Delta P/\Delta t$ – Coeficiente angular da reta do produto versus tempo de reação [mg/mL.min]; V_R – Volume reacional [mL]; V_E – Volume da solução/suspensão enzimática [mL]; MM_{glic} – Massa molar da glicose [0,180 mg/μmol]; D – diluição da solução/suspensão enzimática.

3.9.2. Medida da atividade de Xilanase

A atividade da xilanase foi medida de acordo com metodologia utilizada por Manrich (2012) na qual a liberação de açúcares redutores ao longo do tempo de hidrólise de xilana de bétula (1% m/v), catalisada pela enzima, foi quantificada. Xilana de bétula (5 mL) diluída em tampão citrato 50mM (pH 5,5) foi incubada a 50°C e 150 rpm com adição de soluções enzimáticas diluídas por 10 min. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 2 minutos e os açúcares redutores foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1μmol de xilose em 1 min nas condições de ensaio.

3.9.3. Medida das concentrações de xilooligossacarídeos, açúcares, etanol e xilitol

XOS, xilose e etanol foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Waters e2695 equipado com detectores de índice de refração e UV-visível. Foram utilizadas a coluna Sugar-PakTMI (300×6,5 mm) e água ultra pura como fase móvel num fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 80 °C. Antes das análises, as amostras foram devidamente filtradas em membranas de 0,2 μm ou em filtros Sep-Pak® C-18 (Waters) para remoção de derivados da lignina e outros produtos de degradação.

3.9.4. Medida da concentração de células

A concentração de células livres a ser imobilizada foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g/L) através de uma curva de calibração correspondente. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas, após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células em água destilada.

3.9.5. Quantificação de xilooligômeros totais

Para quantificação total dos xilooligômeros presentes na fração líquida pré-tratada, um volume de 5 mL de amostra foi submetido à hidrólise ácida total para a conversão dos oligômeros a monômeros a partir da reação com 174 μL de H_2SO_4 72% em tubos de ensaio com tampa, colocados em banho seco a 121°C por 1 h (MANRICH, 2012). Após hidrólise ácida, as amostras foram resfriadas e, em seguida quantificadas por HPLC. O cálculo para determinar a quantidade total de xilooligômeros presentes na fração líquida foi feito pela diferença entre a massa de xilose total obtida após hidrólise dos oligômeros em monômeros na hidrólise ácida e a massa de xilose obtida antes a hidrólise ácida.

3.9.6. Quantificação de proteínas totais

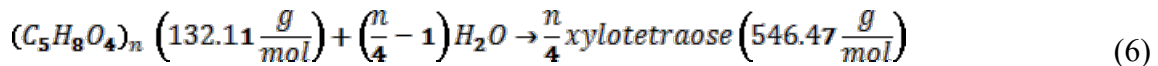
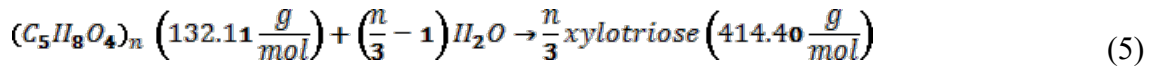
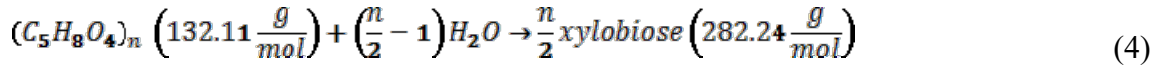
A quantificação de proteínas totais presente nos ensaios de imobilização foi realizada pelo método de Bradford (1976), o qual se baseia na ligação do corante Comassie Blue Brilliant G-250 à proteína, resultando na mudança da coloração da solução de castanho para azul, que é medida por espectrofotometria. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão na curva de calibração.

3.10. Cálculos

3.10.1 Cálculo da conversão da hidrólise de xilana em XOS

Após a quantificação de XOS obtida nos processos de hidrólise de xilana, a concentração de xilana consumida para a produção de duas, três ou quatro unidades

monoméricas foi calculada a partir de fatores estequiométricos (f_{x2} , f_{x3} e f_{x4}) determinados de acordo com as Equações 4, 5 e 6.



$$f_{x_2} = \frac{132.11 \times 2}{282.24} = 0.936, \quad f_{x_3} = \frac{132.11 \times 3}{414.40} = 0.956 \quad \text{and} \quad f_{x_4} = \frac{132.11 \times 4}{546.47} = 0.966$$

Assim sendo:

$$\text{Conversão da xilana} = \frac{f_{x_2} \cdot C_{x_2} + f_{x_3} \cdot C_{x_3} + f_{x_4} \cdot C_{x_4}}{C_{xilana}^{inicial}}$$

onde : C = concentração (mg/mL)

3.10.2 Cálculos dos parâmetros fermentativos

Para avaliação dos ensaios fermentativos, utilizou-se de parâmetros como conversão de substrato (%), rendimento (getanol/gxilose) e produtividade volumétrica (getanol/L.h), os quais as equações para cálculo encontram-se descritas abaixo (SHULER; KARGI, 2002):

3.10.2.1 Conversão do substrato/ xilose consumida - X [%]

$$X = \frac{C_{Si} - C_{S(t)}}{C_{Si}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

C_{Si} : concentração de açúcares totais no tempo inicial (processo descontínuo) ou na alimentação (processo contínuo) (g/L);

$C_{S(t)}$: concentração de açúcares totais no caldo fermentado (g/L).

3.10.2.2 Fator de rendimento - $Y_{P/S}$ [g_{etanol}/g_S]

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_P}{-\Delta C_S} = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{C_{Si} - C_{Sf}} \quad (8)$$

Onde:

C_{Pf} : concentração de produto formado no tempo t (g/L);

C_{Pi} : concentração de produto no início do processo (g/L);

C_{Sf} : concentração de substrato no tempo t (g/L);

C_{Si} : concentração de substrato no início do processo (g/L).

3.10.2.3 Produtividade volumétrica do processo descontínuo - Q_P [g/L.h]

$$Q_P = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{\Delta t_f} \quad (9)$$

Onde

C_{Pf} : concentração de produto no tempo t (g/L);

C_{Pi} : concentração de produto no início do processo (g/L);

Δt_f : tempo de processo (h).

3.10.2.4 Produtividade volumétrica do processo contínuo - Q_P [g/L.h]

$$Q_P = C_{Pf} \times D = \frac{C_{Pf}}{\tau} \quad (10)$$

Onde

C_{Pf} : concentração de produto no tempo t (g/L);

D: taxa de diluição (h⁻¹)

τ : tempo de residência (h).

3.10.2.5 Seletividade em etanol- S [g_{etanol}/g_{xilitol}]

$$S = \frac{C_{etanol}}{C_{xilitol}} \quad (11)$$

Onde:

C_{etanol} : concentração de etanol (g/L);

$C_{xilitol}$: concentração de xilitol (g/L).

4. RESULTADOS

4.1 Seleção de xilanases para aplicação no processo de SHIF

Atualmente, diferentes xilanases estão disponíveis para estudos, podendo ser endoxilanases, β -xilosidases, ou ainda uma mistura das duas. Além disso, a família à qual a enzima pertence está relacionada intimamente com o perfil de produtos gerados no processo (DODD et al., 2009). Para que o processo de SHIF ocorra eficientemente, é necessária a seleção de uma xilanase capaz de converter uma maior fração da xilana em xilose. De acordo com Carvalho et al. (2013), a completa despolimerização da xilana pode ser obtida pela utilização de um conjunto de enzimas composto por endoxilanases, β -xilosidases e enzimas auxiliares que removam ramificações.

Uma vez que a hidrólise branda da xilana gera principalmente xilooligômeros grandes (maiores que 7 unidades de xilose), iniciou-se a busca por um *pool* de enzimas com perfis diferentes para serem utilizadas co-imobilizadas com XI e *S. cerevisiae* no processo de SHIF, aumentando assim a conversão de XOS em xilose.

4.1.1 Caracterização das xilanases disponíveis para o *pool* do processo SHIF

A caracterização de xilanases foi realizada visando selecionar uma ou mais xilanases eficientes na conversão de xilana a xilose para serem empregadas no processo SHIF juntamente com XI e *S. cerevisiae* nos *beads* de alginato de cálcio. Para isso, 8 preparados de xilanases foram testados (1 recombinante e 7 comerciais), os quais encontram-se caracterizados na Tabela 4.1 e na eletroforese apresentada na Figura 4.1.

Os preparados de xilanases estudados apresentam diferentes propriedades, dentre eles, observa-se a partir da eletroforese, que alguns são constituídas por um *pool* de enzimas (XAS-2, XAS-3, XAS-5, XAS-6 e XAS-7), enquanto outros apresentam maior pureza em xilanases (XAS-1, XAS-4 e XAS-8). Algumas enzimas apresentam características de família 11 (≥ 20 kDa) e outras de família 10 (até ≥ 30 kDa) (MANRICH, 2012). Observa-se ainda que algumas xilanases provavelmente possuem β -xilosidases em sua composição, uma vez que de acordo com a literatura estas enzimas possuem entre 80 e 180 kDa (LAMA et al, 2004; PINPHANICHAKARN et al., 2004; SEMENOVA, et al., 2009). A grande diversidade

observada entre as enzimas é um fator positivo, uma vez que uma maior conversão da xilana em xilose é favorecida pelo emprego de um *pool* de enzimas.

Tabela 4.1 – Características dos preparados enzimáticos avaliados

Código	Enzima	Atividade (UI/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (UI/mg)
XAS-1	Endoxilanase XynA	501,9±33,4	9,2±0,01	54,6
XAS-2	Multifect CX 12L A03227	12302,7±141,3	9,6±0,8	1282,2
XAS-3	β-Glicosidase + Xilanase NS22002	828,6±28,3	14,5±0,1	57,2
XAS-4	Xilanase NS50030	1475,4±4,7	12,1±0,3	121,9
XAS-5	Multifect CX XL A03139	784,7±7,4	34,6±0,0	22,7
XAS-6	Acellerase XC A03302	1423,8±77,7	12,4±0,2	114,7
XAS-7	Acellerase XY A03304	3670,2±141,3	9,8±0,7	375,4
XAS-8	Xilanase Novo NS22036	3656,8±56,5	21,1±0,7	173,3

Figura 4.1 – Eletroforese dos preparados enzimáticos avaliados

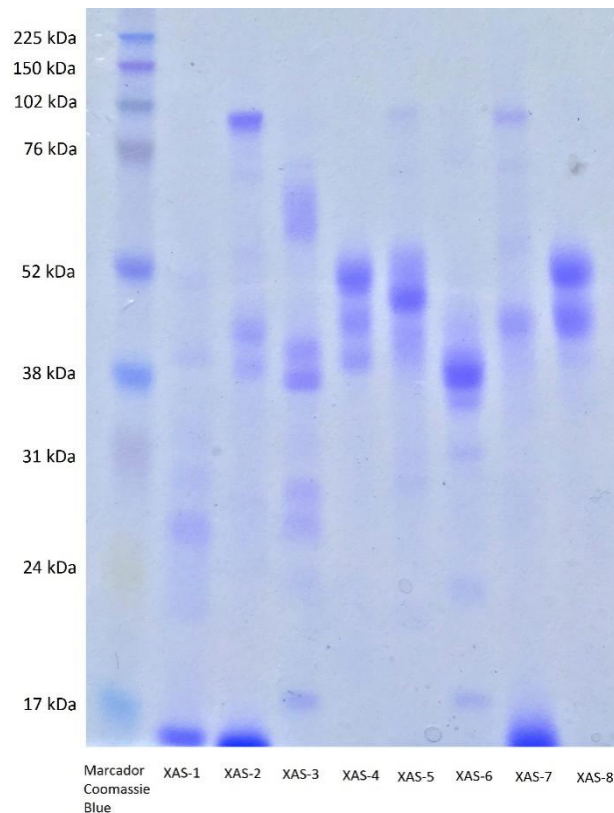
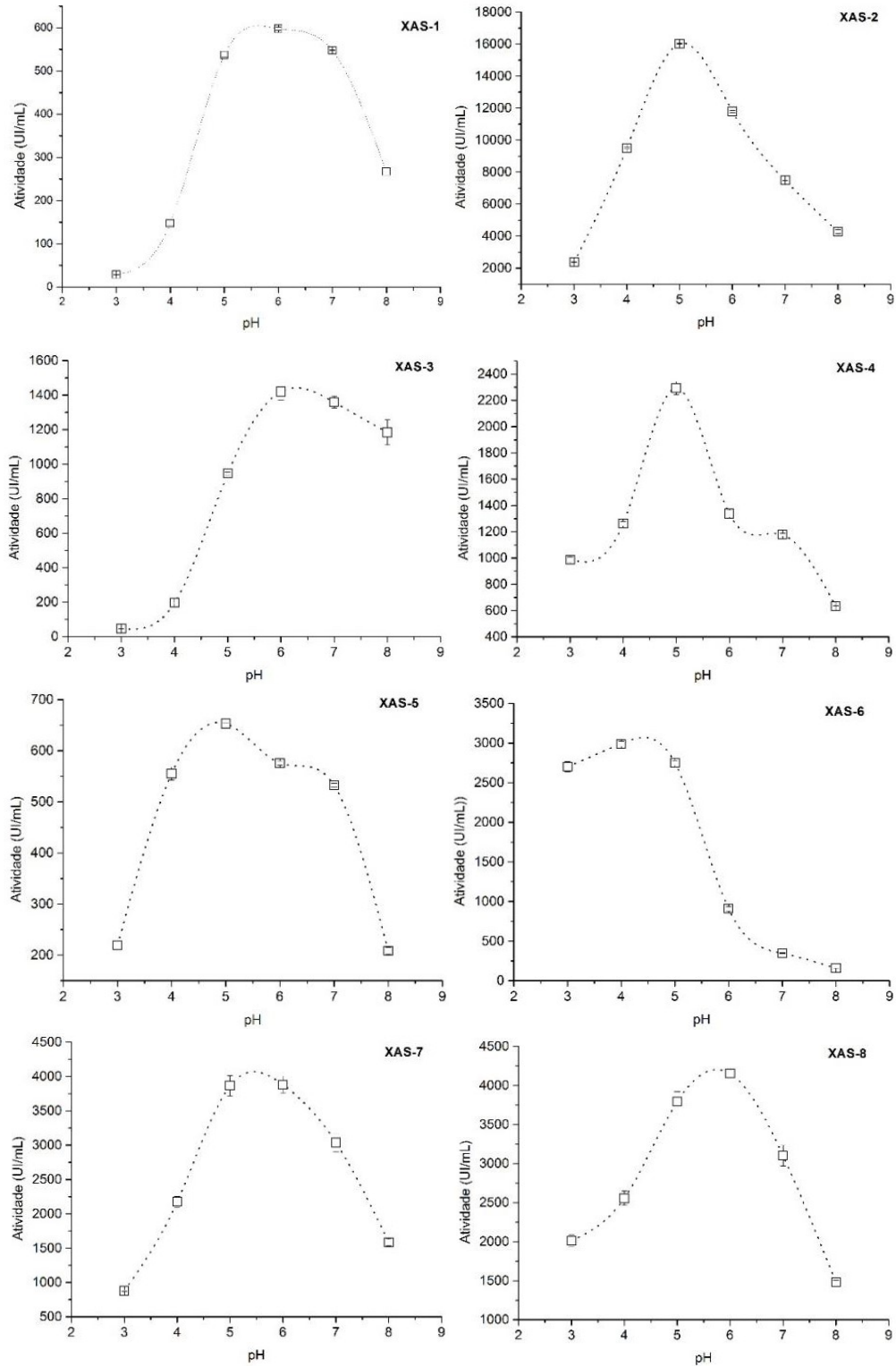


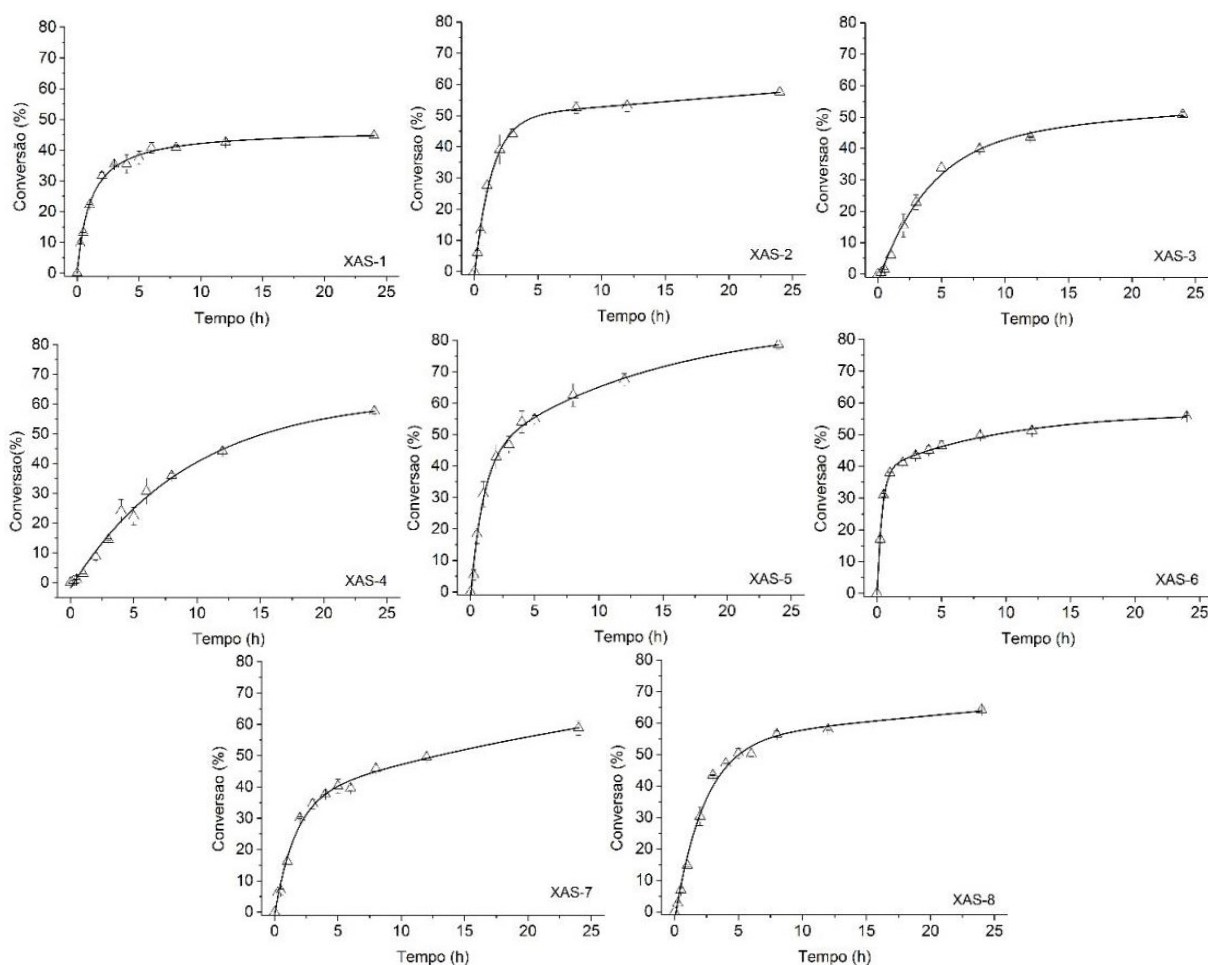
Figura 4.2 – Perfis de atividade de xilanases dos preparados enzimáticos avaliados em função do pH (atividade medida com xilana de bétula 1%, 50°C - tampão citrato 50mM (pH 4 e 5), tampão fosfato 50 mM (pH 7 e 6) e tampão bicarbonato de sódio 50mM (pH 8))



Realizou-se o levantamento do perfil de atividade de xilanasas em função do pH para verificar a viabilidade dos preparados enzimáticos no processo. Os resultados encontram-se na Figura 4.2, na qual observa-se que todas as xilanasas apresentaram elevada atividade catalítica no pH do processo de SHIF (pH = 5,6).

Uma vez verificada a viabilidade das xilanasas no pH do processo, deu-se início ao estudo da hidrólise da xilana pela ação destas enzimas. Realizou-se o ensaio de hidrólise enzimática da fração solúvel da xilana de faia (25,4 g/L). Os ensaios foram realizados em incubadora rotatória à 50°C, pH 5,6 (tampão citrato 50 mM) por 24 horas. A conversão do processo foi calculada conforme descrito no Item 3.9.1, e os perfis de hidrólise encontram-se na Figura 4.3.

Figura 4.3 – Hidrólise enzimática da fração solúvel da xilana de faia (25,4 g/L), 50°C, pH 5,6 (tampão citrato 50 mM) pela ação das xilanasas presentes nos preparados enzimáticos testados ($150 \text{ UI/g}_{\text{xilana}} = 3810 \text{ UI/L}$)



O perfil de XOS obtidos ao final de 24h para cada xilanase encontra-se na Tabela 4.2. Podemos observar que o produto comercial XAS-5 (Multifect CX XL A03139) é, dentre os preparados estudados, o mais indicado para ser utilizado visando a produção de xilose no processo de SHIF, uma vez que apresentou uma maior atividade de β -xilosidase quando comparado aos demais, produzindo mais xilose. Além disso, a XAS-5 apresentou a maior conversão no processo, de 78,7%.

Tabela 4.2 – Perfis dos XOS produzidos após 24h de hidrólise enzimática da fração solúvel de xilana de faia (25,4g/L) catalisada pela ação das xilanases estudadas (150 UI/g_{xilana}) – 50°C pH 5,6.

Xilanase	X6 (g/L)	X5 (g/L)	X4 (g/L)	X3 (g/L)	X2 (g/L)	Xilose (g/L)	Conversão (%)
XAS-1	0	0,20	1,22	4,43	3,49	0,00	44,8
XAS-2	0,00	0,59	0,53	2,13	7,26	5,29	57,5
XAS-3	0,00	0,00	0,47	3,88	7,12	2,35	50,9
XAS-4	0,00	0,00	0,14	1,49	12,75	1,25	57,7
XAS-5	0,00	0,18	0,31	1,85	6,48	13,24	78,7
XAS-6	0,00	0,19	0,02	1,41	10,6	3,00	55,7
XAS-7	0,00	0,00	0,34	1,51	6,45	8,08	58,8
XAS-8	0,00	0,00	0,08	0,55	14,13	2,76	64,2

A xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (XAS-1), por sua vez, destaca-se por apresentar exclusivamente atividade de endoxilanase, não possuindo atividade de β -xilosidase e, conseqüentemente, não produzindo xilose na hidrólise de xilana. Observa-se também na eletroforese mostrada na Figura 4.1, que é dos preparados enzimáticos mais puros, o que é esperado uma vez que a enzima clonada foi exclusivamente a endoxilanase. Apresentou, assim, coerentemente, a menor conversão, pois devido à ausência de enzimas ramificantes, sua ação ficou limitada pela sua especificidade. O preparado enzimático que apresentou a maior conversão e maior produção de xilose, o produto de interesse aqui, foi XAS-5, e foi por isso selecionado para prosseguimento dos estudos. XAS-1, contudo, desempenha um papel importante no processo SHIF. Segundo os resultados apresentados na Figura 4.1, aparentemente as endoxilanasas presentes em XAS-1 são diferentes das contidas no complexo

enzimático comercial XAS-5. Assim, sua inclusão no sistema catalítico permite não só aumentar de forma controlada a ação endo, mas também confere aumento do raio de ação das endo presentes no complexo XAS-5, já que tendo um tamanho molecular distinto deve ter também uma especificidade diferente das endo presentes no complexo.

Nesse contexto, foram selecionadas as enzimas endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (XynA) e as presentes no preparado comercial Multifect CX XL A03139 (XAS-5) para serem utilizadas co-imobilizadas com XI e *S. cerevisiae* no processo de SHIF. Desta forma, estudos de imobilização e estabilização destas enzimas devem ser realizados. Neste trabalho, realizou-se o estudo completo de imobilização e estabilização da endoxilanase de *B. subtilis* (XynA). O estudo de imobilização foi iniciado com XynA porque sua maior pureza permitia melhor controle do processo de imobilização. A imobilização de XAS-5 está em andamento, sendo esse estudo tema de outros pesquisadores no grupo de Tecnologia Enzimática do DEQ/UFSCar.

4.1.2. Imobilização e estabilização da xilanase recombinante de *B. subtilis* (XynA)

Estudos de imobilização e estabilização da endoxilanase de *B. subtilis* (XynA) foram realizados para viabilizar sua utilização no processo SHIF. As vantagens da imobilização de enzimas são amplamente conhecidas. No caso desta xilanase, agrega-se ainda o fato de como trata-se de uma enzima recombinante expressa em *E.coli* DH5 α , sua recuperação ao final do processo é outra vantagem em função da Lei de Biossegurança (CTNBIO, 2005).

4.1.2.1 Imobilização da endoxilanase de *B. subtilis* (XynA)

Estudos de imobilização da endoxilanase de *B. subtilis* (XynA) foram realizados em 3 suportes: quitosana-glutaraldeído; quitosana-glioxil e agarose-glioxil, conforme descrito no Item 3.2. O suporte de quitosana-glioxil apresenta uma elevada densidade de grupos glioxil em sua superfície, assim como a agarose-glioxil, mas porém com uma morfologia interna diferente (MANRICH et al., 2010) e uma camada de grupos catiônicos sob os grupos aldeído. Já a ativação de quitosana com glutaraldeído a pH 7, seguida da imobilização utilizando fosfato de sódio 100 mM pode favorecer o primeiro passo de imobilização (uma ligação covalente entre o suporte e o grupo amino reativo da proteína), porém neste pH, os grupos lisina não são reativos (MANRICH et al., 2010). Por isso, os diferentes protocolos de

imobilização utilizados para os diferentes suportes podem produzir resultados completamente distintos.

A ativação de agarose 6% (com glicidol) e de quitosana 4% (com epícloridrina) geraram, respectivamente, 82 e 184 μmol de grupos glioxil por grama de suporte. O maior número de grupos aldeído obtidos para a quitosana deve-se ao fato de que este material contém não apenas grupos hidroxil reativos, mas também grupos amina disponíveis para a ativação com epícloridrina. A Figura 4.4 mostra a cinética de imobilização de XynA em agarose-glioxil e quitosana-glioxil (Figura 4.4A) e em quitosana-glutaraldeído (Figura 4.4B) para a carga enzimática 105,0 UI/g_{suporte}.

A enzima solúvel (XynA) preservou 100% de atividade sob incubação nas condições para todos os protocolos de imobilização. Após 8 horas de incubação, 100% da enzima foi imobilizada em agarose-glioxil e 82% em quitosana-glioxil. Estes resultados de rendimento de imobilização foram inesperados, tendo em vista a baixa concentração de resíduos de lisina sobre a superfície da XynA (Figura 4.5). O processo de imobilização em suportes ativados com glioxil requer a formação de pelo menos duas ligações simultâneas (bases de Schiff reversíveis) entre os grupos glioxil e o $\epsilon\text{-NH}_2$ de resíduos de lisina (MATEO et al., 2005). Portanto, o baixo número de resíduos de lisina poderia comprometer uma imobilização eficiente.

Figura 4.4 – Cinética de imobilização de XynA. A) Atividade residual para os suportes ativados com glioxil: (\square) sobrenadante da quitosana-glioxil; (\circ) sobrenadante da agarose-glioxil; (\blacktriangle) controle. Condições de imobilização: tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,0, 25°C. B) Atividade residual para o suporte quitosana glutaraldeído: (\circ) sobrenadante; (Δ) controle. Condições de Imobilização: tampão fosfato 100 mM pH 7,0, 25°C.

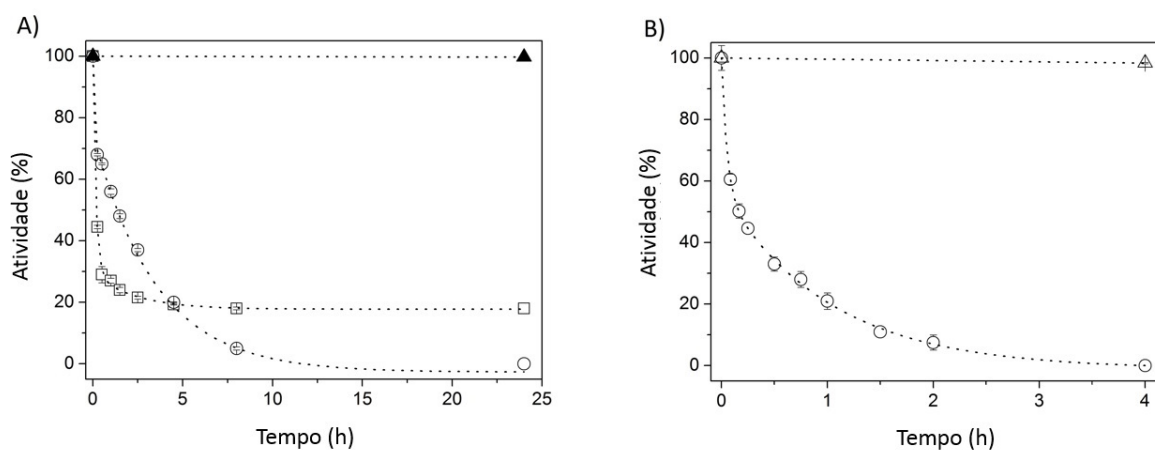
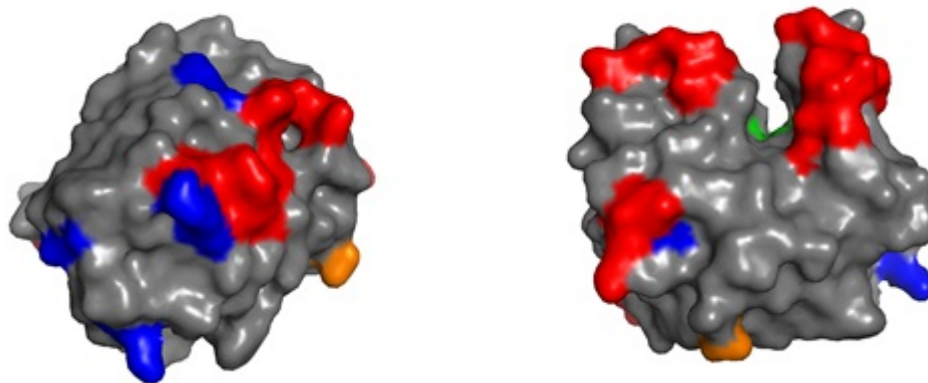


Figura 4.5 – Estrutura tridimensional da XynA mostrando os resíduos de lisina (azul), aminoácidos do sítio ativo (verde), os grupos N-terminais (laranja) e as regiões de baixa estabilidade na estrutura da proteína (vermelho)



A análise da estrutura tridimensional da enzima (Figura 4.5) (MURAKAMI et al., 2005) ajuda a compreender os resultados: a localização específica dos resíduos de lisina pode ter ajudado o processo de imobilização, uma vez que, pelo menos três delas estão no mesmo plano, tornando possível a imobilização multipontual através desta área. O ensaio de imobilização por quitosana-glioxil foi estendido até 24 horas, porém não houve aumento no rendimento de imobilização (RI). O RI inferior da enzima em quitosana-glioxil, após a ativação com epicloridrina, também foi observado por Rodrigues et al. (2008), para a imobilização da lipase de *Cândida antártica* B (CALB). O RI máximo obtido foi de 17%, após 72 horas de imobilização. De acordo com estes autores, uma possível explicação é uma diminuição no diâmetro médio do poro de quitosana após ativação com epicloridrina, devido a ligações cross-link entre unidades monoméricas de quitosana. Se isso ocorrer, a enzima não pode chegar à superfície do suporte. Esta explicação corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, onde um RI de 82% foi obtido para XynA, que contém 183 resíduos de aminoácidos e 22 kDa (MURAKAMI et al., 2005). Já a CALB tem 317 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 33 kDa (LI et al., 2010). Naturalmente, uma massa molar mais elevada implica uma menor superfície acessível em quitosana após ativação com epicloridrina.

A Figura 4.4B mostra os resultados para a imobilização de XynA em quitosana-glutaraldeído. Um RI de 100% foi obtido em 4 horas de incubação. A condição utilizada

(tampão fosfato 100 mM pH 7,0) evita a adsorção iônica da enzima e favorece a imobilização covalente, através do grupo mais reativo da proteína (provavelmente o grupo N-terminal, que na Figura 4.5 observa-se que está totalmente exposto). Apenas um grupo lisina (Lys) parece no mesmo plano deste grupo amino.

As atividades recuperadas (RA) de agarose-glioxil-XynA e quitosana-glioxil-XynA foram de $42,7 \pm 1,3\%$ e $53,6 \pm 1,7\%$, respectivamente. Esta perda de atividade pode ser explicada por duas hipóteses: resistência à transferência de massa ou modificação na estrutura da enzima provocada pela imobilização multipontual.

A baixa carga enzimática oferecida (5mg de proteína/g de gel) sugeriu que a segunda hipótese seria mais provável. Para verificar essa hipótese, novos experimentos de imobilização foram conduzidos, utilizando diferentes cargas enzimáticas, mais baixa e mais alta: 3,93 UI/g_{gel}, 39,3 UI/g_{gel} e 393,4 UI/g_{gel}, as quais correspondem a 0,2 mg/g_{gel}, 2 mg/g_{gel} e 20 mg/g_{gel}, respectivamente. Os resultados encontram-se na Tabela 4.3, na qual observa-se que não há variação na atividade recuperada até a carga enzimática de 105 UI/g_{gel}. Desta maneira, a perda de atividade após a imobilização deve ser causada por distorção da estrutura, devido à formação de ligações multipontais.

Por outro lado, para uma carga enzimática 393,3 UI/g_{gel} foi observada uma redução da atividade recuperada, indicando que, neste caso, a resistência à transferência de massa pode estar contribuindo para o decréscimo da velocidade de reação aparente. Assim sendo, o derivado de agarose-glioxil utilizando 105 UI/g_{gel} foi escolhido para estudos posteriores, uma vez que apresentou a maior atividade sem limitações significativas de transferência de massa.

Tabela 4.3 – Influência da carga enzimática oferecida nos parâmetros de imobilização da enzima XynA em agarose-glioxil. Carga enzimática (UI/g_{gel}) = unidades de enzima oferecida para imobilização; RI (%) = rendimento de imobilização, RA = Atividade recuperada (%),

Atgel (UI/g_{gel}) = atividade do biocatalisador após imobilização

Parâmetro de Imobilização	Carga Enzimática (UI/g _{gel})			
	3.93	39,3	105.0*	393.4
RI(%)	100	100	100	74,0
Atgel (UI/g _{gel})	1.7±0.1	16.3±1.7	44,8±3.9	19.5±1.3
RA(%)	43.1±2.7	41.3±4.9	42.7±1.3	6.7±0.4

*primeiro experimento

A atividade recuperada obtida para XynA imobilizada em quitosana-glutaraldeído foi de apenas $10,7 \pm 0,8\%$. Como existe apenas um grupo Lys no mesmo plano do grupo N-terminal, é muito improvável que aconteça a imobilização multipontual; e em pH 7 isto deve ser ainda mais difícil devido à baixa reatividade dos grupos Lys. Assim, neste caso a diminuição da atividade enzimática não é causada pelas ligações múltiplas que ligam os resíduos de lisina ao suporte. No entanto, o suporte não é inerte e algumas interações iônicas após a imobilização são esperadas. A quitosana pode ainda ter algum carácter hidrofóbico. Já foi reportado que o grupo amino terminal desta enzima tem uma função importante para a preservação da conformação tridimensional (MURAKAMI et al., 2005). Assim, a explicação mais provável para a queda de atividade é uma distorção desta área causada pela imobilização.

4.1.2.2. Estabilidade Térmica dos derivados de XynA

Xilanases com uma elevada estabilidade térmica são necessárias em muitos processos industriais, especialmente para a produção de XOS. As temperaturas elevadas levam a maiores velocidades de reação e, conseqüentemente, volume do reator inferior. Além disso, eles podem ser úteis para aumentar a solubilidade da xilana e ainda prevenir a contaminação microbiana (ARAGON et al., 2013). Assim sendo, os três derivados de XynA foram testados quanto à sua estabilidade térmica e comparados com a enzima livre.

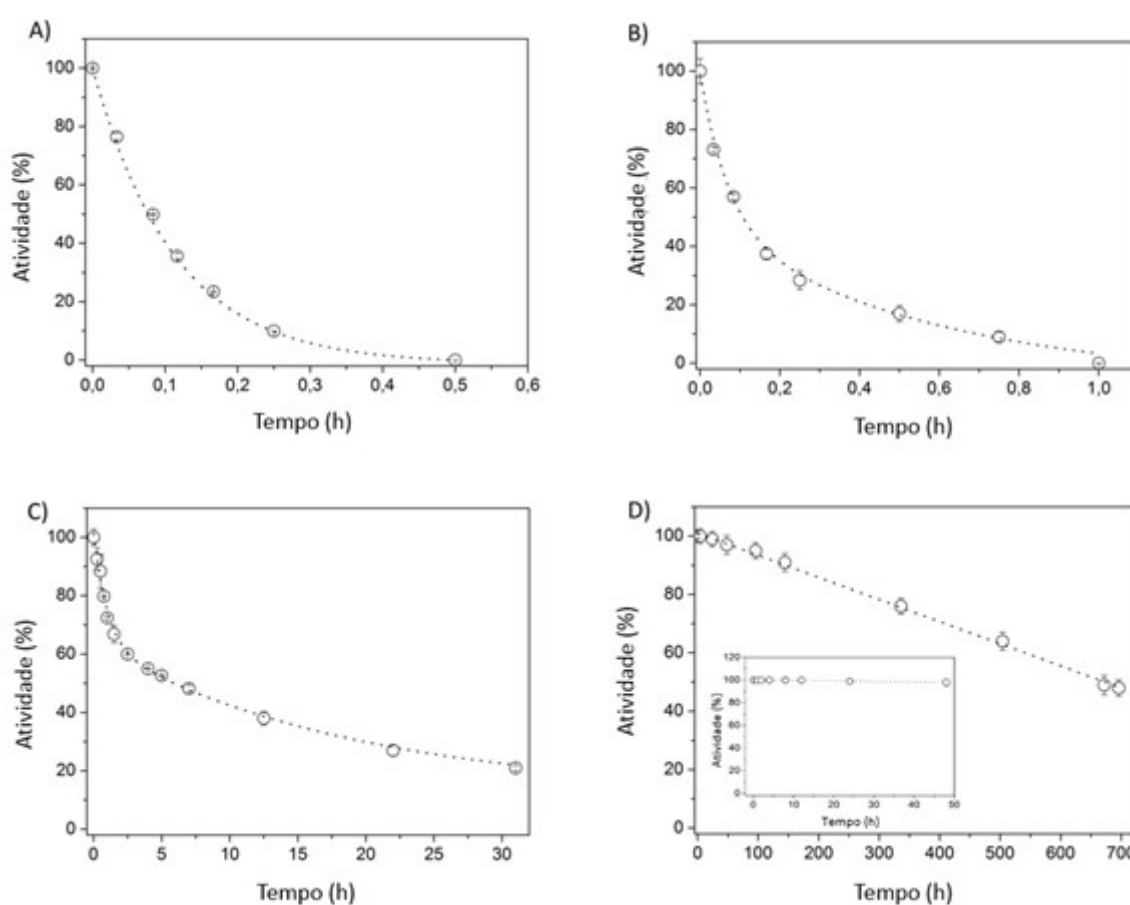
A Figura 4.6A mostra a atividade residual da XynA solúvel sob incubação a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tampão citrato 50 mM (pH 5,6). Sob estas condições, a enzima solúvel perdeu 100% da sua atividade catalítica após apenas 30 minutos, com uma meia-vida de 4,7 minutos. A Figura 4.6B indica que a quitosana-glutaraldeído-XynA, como esperado, apresenta um perfil de inativação ligeiramente mais lento do que a enzima livre, sendo que em 60 minutos este derivado havia perdido toda sua atividade catalítica, com uma meia-vida de 6,4 minutos (apenas 1,4 vezes maior do que a enzima livre).

Por outro lado, como esperado, houve um grande aumento nas meias-vidas de ambos derivados glioxil, confirmando a formação de ligações multipontuais entre enzima e suporte. A Figura 4.6C mostra que a quitosana-glioxil-XynA conservou 21% da sua atividade inicial após 30 horas de incubação sob as condições de ensaio, com uma meia-vida de 357 minutos (5,95 horas), 75 vezes mais estável do que a enzima solúvel.

A estabilidade térmica da agarose-glioxil-XynA, por sua vez, foi notável. Os resultados apresentados na Figura 4.6D fornecem um valor de meia-vida de 40.385 minutos

(673 horas), 8.600 vezes mais estável do que a enzima solúvel e 113 vezes mais estável do que o derivado de quitosana-glioxil.

Figura 4.6 – Inativação de XynA solúvel e imobilizada em diferentes suportes. O processo foi realizado a 56 °C em tampão citrato 50 mM pH 5.6. A) solúvel ($A_0=193\pm 5.9$ UI/mL); B) quitosana-glutaraldeído-XynA ($B_0=12.9\pm 0.2$ UI/g_{gel}); C) quitosana-glioxil-XynA ($C_0=42.9\pm 3.3$ UI/g_{gel}); D) agarose-glioxil-XynA ($D_0=44.84\pm 3.7$ UI/g_{gel}).



Apesar de apresentar poucas lisinas em sua superfície, a localização destes grupos é digna de nota (Figura 4.5). É possível notar que há duas possibilidades para a ligação dos três grupos no suporte: um plano inclui três Lys e outro plano inclui duas Lys e o grupo N-terminal. Além disso, os resíduos de lisina estão localizados nas regiões descritas como as regiões mais instáveis da enzima (MURAKAMI et al., 2005). Desta maneira, neste caso particular, a localização específica das ligações pode ter sido suficiente para diminuir

drasticamente a flexibilidade da enzima (SCHELLENGERGER et al., 1989). Dentre os resultados observados na literatura, este é o resultado mais significativo obtido até agora para uma xilanase imobilizada.

4.1.2.3. Hidrólise da xilana pela XynA solúvel e imobilizada

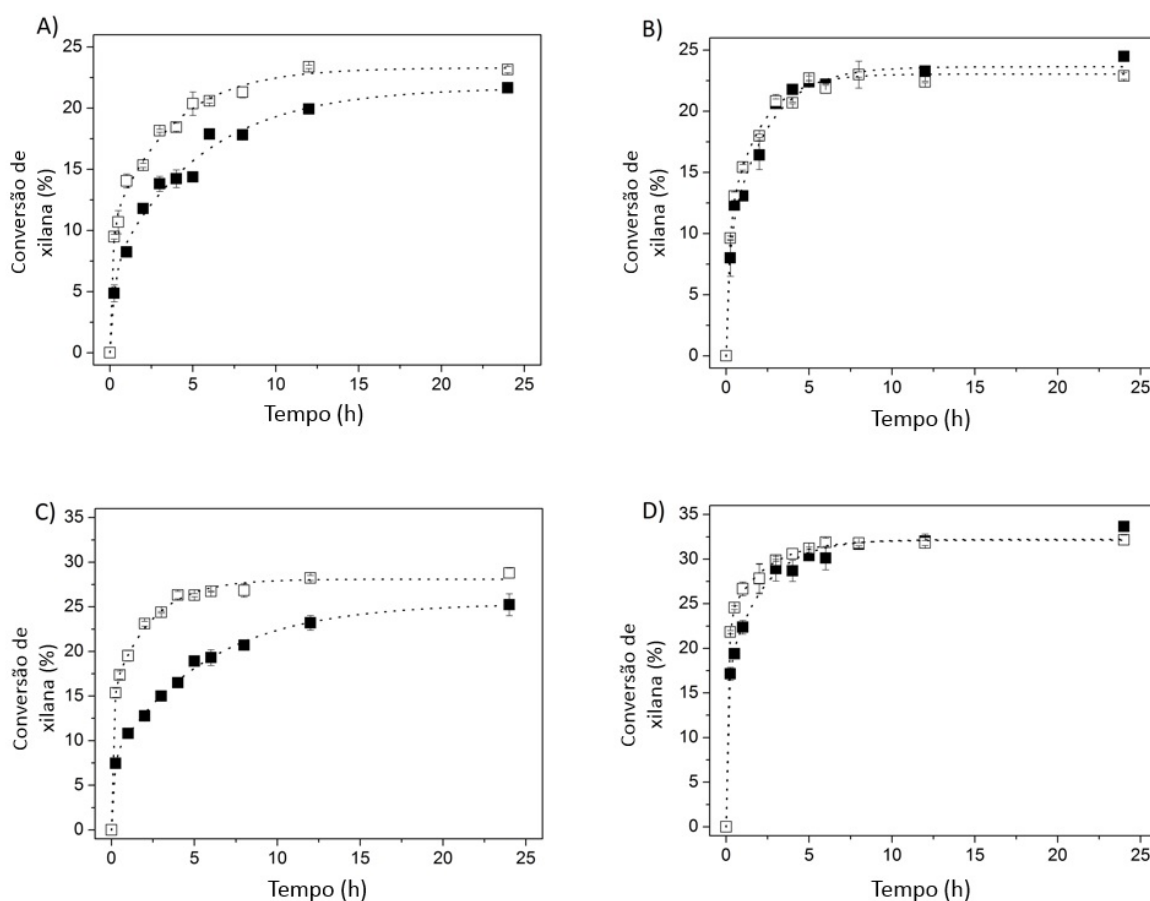
Os resultados obtidos na imobilização de XynA mostraram que houve expressivo aumento de estabilidade térmica em relação à enzima solúvel com suporte agarose ativado com grupos glioxil (113 vezes maior) seguido pelo suporte quitosana ativado com grupos glioxil (75 vezes maior), sendo que o suporte quitosana ativado com glutaraldeído praticamente não teve alteração na estabilidade. A decisão de qual suporte/ativação utilizar irá, contudo, depender de análise econômica do processo, pois há que se comparar a estabilidade operacional dessa enzima em relação aos demais elementos do sistema catalítico (XAS-5, XI e levedura) com o custo de imobilização (suporte e ativação). Em princípio, a grande estabilização obtida com agarose-glioxil recomenda o uso desse suporte. Entretanto, o estudo de estabilidade foi feito a 56°C, sendo que a operação deverá ser a 32°C, pois o estudo de estabilidade operacional da levedura mostrou ser essa a melhor temperatura para o processo (AQUINO, 2013; MORAES, 2013). O primeiro elemento que se desestabilizar decidirá o tempo de utilização do sistema catalítico como um todo. Como agarose é um suporte mais caro que quitosana e a ativação glioxil mais complexa que a com glutaraldeído, se a estabilidade operacional a 32°C de XynA imobilizada em quitosana-glutaraldeído não for a menor entre as dos demais elementos não valeria a pena economicamente aumentar o custo de imobilização se o tempo de operação for atendido por XynA- quitosana-glutaraldeído.

De todo modo, há que se avaliar o desempenho da enzima imobilizada. A expressiva estabilidade do derivado agarose-glioxil-XynA, além do fato desta ser obtida com imobilização multipontual, portanto com possível alteração na estrutura da enzima, recomenda a escolha desse derivado para comparação de desempenho entre enzima solúvel e imobilizada. Foi, assim, estudada a hidrólise de xilana de bétula para a produção de XOS, catalisada pela enzima XynA livre e imobilizada em agarose-glioxil. Foi também avaliado o desempenho da enzima livre e do seu derivado em dois substratos diferentes: xilana de bétula convencional e a fração solúvel da xilana de bétula. A hidrólise dos dois substratos pela ação da XynA solúvel e de agarose-glioxil-XynA pode ser vista na Figura 4.7.

Os resultados obtidos por DNS apresentam valores mais elevados do que aqueles quantificados por HPLC. Esta discrepância deve-se ao fato de que a quantificação realizada

pelo método de DNS identifica todas as extremidades redutoras presentes, incluindo aquelas dos xilooligômeros maiores (MILLER et al., 1959). A metodologia para quantificar XOS por HPLC permite quantificar XOS até 6 monômeros de xilose, justificando, assim, a diferença observada entre os perfis obtidos a partir de açúcares redutores e usando análises HPLC. No entanto, apesar das diferenças entre os valores, as tendências das curvas foram semelhantes.

Figura 4.7 – Hidrólise da xilana de bétula (13 mg/ml, pH 5.5, 50°C) pela ação da XynA solúvel(□) e agarose-glioxil-XynA (■). Quantificados por HPLC - XOS (A – xilana convencional, B – xilana solúvel) e açúcares redutores (C – xilana convencional; D – xilana solúvel).



Os perfis de hidrólise da xilana de bétula solúvel conduzida usando XynA livre e imobilizada foram semelhantes (Figuras 4.7B e 4.7D). O derivado agarose-glioxil-XynA e a enzima solúvel apresentaram a mesma conversão de xilana solúvel após 3 horas de processo (20,4% e 20,6%, respectivamente). A produção máxima de XOS foi atingida após 24 horas: a enzima solúvel, $3,1 \pm 0,04$ mg/mL (22,7% de conversão); e para a enzima imobilizada, $3,2 \pm$

0,02 mg/mL (23,5%). Assim sendo, no caso da xilana solúvel como substrato, ambos os catalisadores parecem hidrolisar o substrato com a mesma velocidade.

Para a xilana convencional (isto é, com as frações solúvel e insolúvel), após 3 horas de reação, o derivado agarose-glioxil-XynA apresentou uma conversão de $13,7 \pm 0,06\%$ ($1,9 \pm 0,09$ mg/mL de XOS), enquanto que a enzima solúvel, alcançou $18,0 \pm 0,1\%$ ($2,4 \pm 0,1$ mg/mL de XOS). Em 24 horas, a enzima imobilizada atingiu $21,5 \pm 0,18\%$, produzindo $2,9 \pm 0,03$ mg/mL de XOS e a XynA solúvel atingiu $22,9 \pm 0,25\%$, produzindo $3,1 \pm 0,04$ mg/mL de XOS.

Os resultados indicam que há um máximo de conversão no processo, e conseqüentemente, uma produção máxima de XOS em torno de 3 mg/mL quando 13 mg/mL de xilana solúvel são utilizadas como substrato.

Para 13 mg/mL de xilana convencional como substrato, a fração de xilana solúvel é de apenas 4,3 mg/mL (33%). Uma vez que existe um limite para a ação de XynA em xilana de bétula, se apenas a fração solúvel tivesse sido hidrolisada, a produção máxima esperada de XOS seria de 0,95 mg/mL. No entanto, a produção de XOS a partir da xilana convencional é sempre maior do que este valor, para os dois catalisadores, ou seja, ambas as frações solúvel e insolúvel são hidrolisadas.

A hidrólise da xilana de bétula convencional foi mais rápida para a enzima livre. Este resultado era esperado uma vez que fração insolúvel da xilana não seria acessível para a enzima imobilizada, pelo menos no início do processo. Apesar deste fato, os resultados indicam que o derivado foi capaz de hidrolisar de forma eficaz uma fração da xilana insolúvel.

A incapacidade de uma endoxilanase pura de hidrolisar completamente xilana já foi relatada. Akpınar et al. (2009) observaram um rendimento em XOS de 13,8% a partir de xilana de tabaco usando xilanase de *A. niger* (200 UI/g) a 50°C após 24h. Aragon et al. (2013), na hidrólise de xilana de bétula (18 mg/ml), obtiveram um rendimento de 13% em XOS utilizando endoxilanase de *A. versicolor* imobilizada em agarose-glioxil a 25°C e pH 5,0. A hidrólise completa de xilana usando apenas xilanases endo, sem enzimas auxiliares, não é possível, uma vez que a xilana não é um polímero linear de xilose pura (ZHANG et al, 2011).

A xilana de bétula é uma glucuronoxilana (ZHANG et al., 2011; SARASWAT et al., 2000), consistindo de uma cadeia principal de xilose com ramificações de ácido 4-metil- α D-glucurônico (MeGa) (DODD et al., 2009). A cadeia lateral de xilana é reconhecida por xilanases, e essas ramificações influenciam a ação destas enzimas (CARVALHO et al., 2013).

Xilanases da família 11, como a XynA, atuam somente sobre a xilose imediatamente anterior ao MeGa (DODD et al., 2009). Assim, a hidrólise da xilana por endoxilanases puras tem um rendimento limitado, o qual depende das ramificações da xilana.

A Tabela 4.4 indica que os principais produtos obtidos em todos os ensaios de hidrólise foram xilotetraose (X4), xilotriose (X3) e xilobiose (X2). As propriedades funcionais dos XOS são intimamente relacionadas com a sua distribuição e peso molecular, e XOS contendo menos de 4 unidades de monômeros são considerados excelentes prebióticos, uma vez que eles promovem eficazmente a proliferação de bifidobactérias, que são consideradas benéficas para a microflora intestinal de humanos (VAZQUEZ et al., 2000). Assim, os XOS produzidos por XynA neste estudo são de excelente qualidade e têm alto valor agregado.

Tabela 4.4– Produção de xilohexaose (X6); xilopentaose (X5); xilotetraose (X4); xilotriose (X3); xilobiose (X2) e xilose (X1) na hidrólise das xilanas convencional e solúvel (13 mg/mL, pH 5.6, 50°C) catalisada pela XynA solúvel e imobilizada (1.95 UI/mL).

(mg/mL)	Xilana Convencional		Xilana Solúvel	
	XynA Solúvel	XynA Imobilizada	XynA Solúvel	XynA Imobilizada
X7+	9,9	10,1	9,9	9,70
X6	0	0	0	0,00
X5	0	0	0	0,00
X4	0,45	0,15	0,35	0,15
X3	1,62	1,19	1,64	1,47
X2	1,05	1,6	1,10	1,60
X1	0	0	0	0,00
Total	3,1	2,9	3,1	3,20

O perfil de XOS produzidos pelo derivado agarose-glioxil-XynA foi diferente do obtido com a enzima solúvel. A produção de xilotriose foi favorecida pela enzima solúvel, enquanto a xilanase imobilizada favoreceu a produção de xilobiose. Essa diferença no perfil de XOS pode ser explicada por uma possível mudança na conformação da xilanase devido à imobilização, alterando as propriedades catalíticas e levando a diferentes perfis de produto (ROMO-SANCHEZ et al., 2014). Outra explicação pode ser que os produtos parciais (X4 e X3) são liberados no interior dos poros, onde podem atingir uma concentração mais elevada do que na solução. Estas altas concentrações de X4 e X3, no interior dos poros do suporte, pode favorecer um aumento na velocidade de hidrólise, quando a enzima imobilizada foi utilizada, levando a uma concentração mais elevada de X2 (RODRIGUES et al., 2013). É

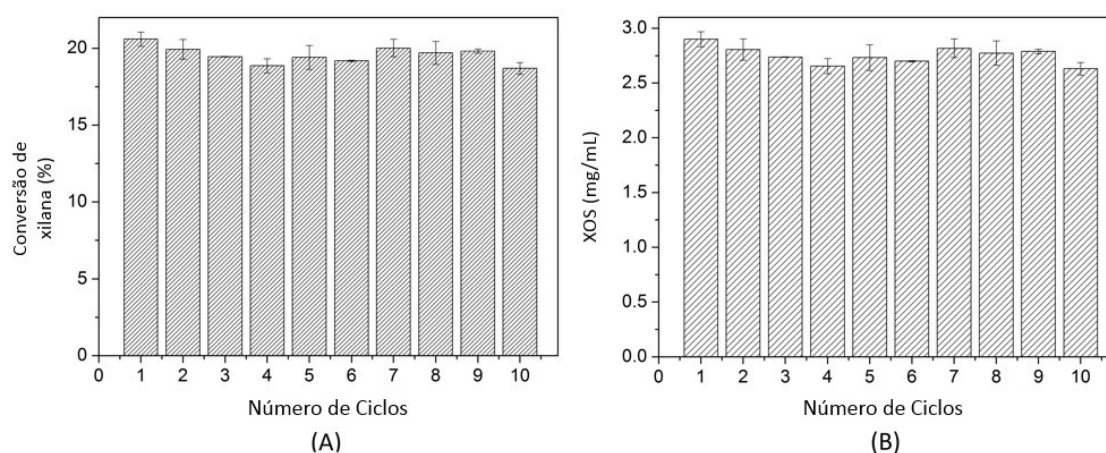
válido ressaltar que a hidrólise de xilana de bétula utilizando XynA foi livre de subprodutos, gerando apenas XOS com elevado grau de pureza e sem a produção de xilose.

4.1.2.4 Estabilidade operacional da XynA imobilizada em agarose-glioxil

O derivado agarose-glioxil-XynA mostrou-se promissor para uso industrial, apresentando uma melhoria significativa na estabilidade térmica quando em comparação com a XynA solúvel, (mais de 8600 vezes maior) e produzindo xilooligômeros, sem xilose como co-produto.

Para analisar a viabilidade de reutilização do derivado, ciclos de hidrólise da xilana solúvel catalisada por agarose-glioxil-XynA foram executados. Cada ciclo durou 3 horas. No primeiro ciclo, uma conversão de 20% foi alcançada após este tempo de reação, portanto, 90% da conversão máxima (22%), com uma produção de XOS de 2,9 mg/mL. Após 10 ciclos consecutivos, a conversão de hidrólise e produção de XOS permaneceu essencialmente constante (Figura 4.8). A recuperação do biocatalisador foi realizada através de uma etapa simples e rápida de filtração pela qual o biocatalisador pôde ser recuperado e utilizado em reações sequenciais sem perdas.

Figura 4.8 – Ciclos consecutivos de hidrólise da fração solúvel da xilana de bétula (13 mg/mL) utilizando o derivado agarose-glioxil-XynA (1.95 UI/mL) (50°C e pH 5.5).



Os resultados obtidos nesse estudo de estabilidade operacional confirmam a expressiva estabilidade do derivado XynA, obtida no estudo da estabilidade térmica anteriormente realizado. Espera-se, pois, correspondente desempenho dos derivados quitosana-glioxil e

quitosana-glutaraldeído. A estabilidade operacional desses derivados na hidrólise de xilana de bétula não foi estudada, pois considerou-se ser de mais interesse estudar em paralelo a hidrólise de um substrato real, de cada um dos elementos do sistema catalítico e deles juntos para a decisão do suporte/ativação a ser utilizado para cada enzima. O derivado de xilose isomerase que vem sendo utilizado até o momento foi obtido por imobilização em quitosana ativada com glutaraldeído (Silva et al, 2012). As tentativas preliminares de imobilização dessa enzima em suporte agarose-glioxil, realizadas por Silva (2013), mostraram-se infrutíferas. Segundo a autora, a imobilização em agarose-glioxil requer pelo menos dois grupos amino próximos na superfície da enzima e isso não era disponível em XI. Então, a enzima foi aminada o que elevou de 1,5 para 57% o rendimento de imobilização, e desses 57% de atividade mediram-se 69% no derivado obtido. Contudo, a necessária etapa de aaminação inativava grande parte da enzima, uma perda que só compensaria caso se obtivesse um aumento muito grande na estabilidade na enzima imobilizada. Isso não ocorria, com o derivado apresentando estabilidade semelhante à da enzima solúvel, tal qual ocorre com o derivado quitosana-glutaraldeído. Isso é devido ao fato de XI ser multimérica e esses procedimentos de imobilização não conseguirem imobilizar todas as sub-unidades. A liberação de uma ou mais sub-unidades não imobilizadas, que ocorre da mesma forma que com a enzima solúvel, afeta a atividade da enzima, explicando o não aumento da estabilidade no derivado. Estão em andamento no grupo estudo de outras técnicas de imobilização para se obter aumento de estabilidade de XI. De todo modo, sendo sua temperatura de máxima atividade 70°C e a de operação do processo 32°C, não deverá ser requerido um aumento expressivo dessa estabilidade pois, segundo Silva (2013), o derivado XI-quitosana-glutaraldeído já se mostrou estável em condições operacionais típicas de SIF por 120 horas.

O estudo da imobilização das demais xilanases a serem utilizadas no processo SHIF está em andamento no grupo, conforme já mencionado. É importante ressaltar, contudo, que o substrato a ser utilizado na SHIF deverá ter outros elementos que podem afetar o desempenho das enzimas e da levedura, sendo a definição desse substrato importante para se poder comparar a estabilidade de cada elemento do sistema catalítico e definir o sistema de imobilização para cada uma.

4.2. Obtenção do substrato hemicelulósico rico em xilooligômeros para a SHIF

Conforme já discutido na introdução deste trabalho, visando evitar contaminações por microrganismos consumidores de xilose, decidiu-se alimentar o processo de produção de etanol com xilooligômeros, pois estes compostos não são digeríveis por contaminantes (CARVALHO et al., 2013). Para isso, é necessária uma hidrólise branda do bagaço de cana-de-açúcar, evitando assim a hidrólise total da xilana (com geração de xilose).

O pré-tratamento organossolve mostrou possuir grande potencial para obtenção de uma fração líquida rica em xilooligômeros. Tal pré-tratamento foi estudado anteriormente no grupo por Wolf (2011), que submeteu bagaço de cana a diferentes condições operacionais do processo organossolve (etanol-água) e determinou quais as condições favoráveis para obtenção de uma fração líquida resultante rica em xilooligômeros, com baixa concentração de xilose. Contudo, o máximo rendimento de extração obtido era de 50%. Durante a realização do presente trabalho estava em execução paralelamente no grupo estudos envolvendo o processo hidrotérmico em maior escala, o qual assim como o pré-tratamento organossolve, proporciona solubilização de hemicelulose na forma de xilooligômeros, embora com geração de maior concentração de xilose que a observada com o tratamento organossolve. Todavia, o estudo do pré-tratamento não era objetivo deste trabalho e a presença de xilose no meio não inviabilizava nenhum dos estudos que se pretendia aqui fazer. Além disso, esse pré-tratamento vem sendo intensivamente utilizado nas plantas de produção de etanol 2G em operação, sendo importante então estudar o desempenho da SHIF nesse meio. Além disso, uma concentração não muito grande de xilose alimentada com os xilooligômeros pode não ser muito prejudicial do ponto de vista de contaminação, além de poder ser interessante para aumento da concentração de xilulose fornecida à levedura no início do processo. Teríamos assim o benefício extra de estudar o efeito de produtos de degradação gerados nesse pré-tratamento no desempenho do processo, bem como o efeito de um nível ainda pequeno de xilose no meio na facilidade de contaminação do processo. Nesse contexto, decidiu-se utilizar neste trabalho, nos estudos onde uso do substrato real era requerido, a fração líquida contendo hemicelulose solubilizada pelo tratamento hidrotérmico que vinha sendo gerada no grupo.

O pré-tratamento hidrotérmico foi então realizado, conforme descrito no Item 3.3, a 195°C por 10 min (1:10 sólido líquido). De acordo com o estudo realizado por Silva (2015), essas condições permitem extração de grande parte da xilana presente inicialmente no bagaço de cana, com uma fração grande na forma de xilooligômeros.

A fração líquida gerada a partir do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana de açúcar foi denominado hidrolisado bruto. Este hidrolisado foi então concentrado por rotoevaporação (70°C) para obter-se uma concentração de xilooligômeros da ordem de 50,0 g/L. A caracterização química dos hidrolisados bruto e concentrado encontra-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Composição da fração líquida obtida no pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar (195°C e 10 min – 1:10 sólido/líquido), onde X6= xilohexaose, X5= xilopentaose, X4= xilotetraose, X3= xilotriose e X2= xilobiose.

Componente (g/L)	Fração Líquida Hidrotérmica	
	Bruta	5x concentrada
Xilooligômeros totais	11,94	48,90
X6+X5	0,00	0,00
X4	1,11	2,40
X3	0,55	5,68
X2	1,31	11,16
Xilose	3,13	20,20
Arabinose	1,04	4,88
Glicose	0,07	0,31
Ácido Acético	3,23	9,18
Furfural	0,153	Nd*
Hidroxi-metil-furfural (HMF)	0,031	Nd
pH	3,89	3,48

*Nd - não detectado

As condições de pré-tratamento promoveram uma elevada solubilização de xilana, atingindo-se 74,0% de solubilização e totalizando 11,94 g/L de xilooligômeros. A concentração de glicose obtida, por sua vez, não foi significativa. Tal fato já era esperado uma vez que devido às suas condições amenas, o pré-tratamento hidrotérmico é eficiente para a remoção de hemicelulose da biomassa sem degradar a fração celulósica, uma vez que a hemicelulose é mais suscetível à ruptura. Este comportamento encontra-se extensivamente relatado na literatura. Nitsos, Matis e Triantafyllidis (2013) realizaram o pré-tratamento hidrotérmico de madeira de faia (180°C por 15 min) e obtiveram uma fração líquida com teor de xilose 10 vezes maior que glicose (6,5 e 0,61 g/L, respectivamente). Rodríguez-Zúñiga et

al. (2014) no pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar (190°C por 10 min) observaram um aumento de celulose na biomassa pré-tratada de 38,8 para 59,3%. Tal aumento significativo de celulose na fração sólida pré-tratada deve-se à solubilização da hemicelulose. Zakaria et al. (2015) também observaram esse aumento de celulose empregando fibra de palma (200°C por 10 min) indo de 32,7 para 58,5% de celulose.

Após a etapa de concentração do hidrolisado (5 vezes), os teores dos XOS aumentaram com variações ao fator de concentração, possivelmente devido à fracionamento de XOS maiores em menores, como por exemplo, xilotetraose (X4) teve um aumento de 2,1 vezes, enquanto xilobiose (X2) aumentou em 8,5 vezes, o que pode ser explicado pela ruptura de X4 em X2 devido às condições do processo. Tal fato explica também o aumento da concentração de xilose em 6,5 vezes.

A presença de xilose no hidrolisado não é um fator negativo, uma vez que conforme apresentado anteriormente, a produção de xilose a partir da xilana por xilanases não é imediata. Sendo assim, esta pequena concentração de xilose pode ser rapidamente utilizada pela XI, evitando assim a ação dos microrganismos contaminantes e servindo de substrato imediato para a XI, garantindo assim a formação de xilulose para a levedura e conseqüentemente o início do processo.

A xilose potencial no hidrolisado bruto correspondia a 83,45 g/L, porém após a concentração o valor observado foi de 75,77 g/L. A ausência dos 7,68 g/L de xilose potencial necessários para fechar o balanço podem ser explicados por possível degradação da xilose durante o método de quantificação de XOS total, no qual utiliza-se hidrólise ácida total da xilana e possui alta severidade. Tal fato também foi constatado por Wolf (2011).

Além dos açúcares, observa-se também a presença de compostos tóxicos aos microrganismos como ácido acético, originado dos grupos acetila presentes na fração hemicelulósica, e furfural e hidroximetilfurfural (HMF), originados da degradação de xilose e glicose, respectivamente (GOLDSTEIN, 1981). Entretanto, apesar de presentes, as concentrações destes compostos são baixas quando comparadas a outros processos de pré-tratamento. Por exemplo, Milessi (2012) obteve 0,68 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF na hidrólise ácida de bagaço de cana de açúcar, valores significativamente superiores aos obtidos no presente trabalho (0,153 e 0,031 g/L, respectivamente). Além disso, no presente trabalho observou-se completa remoção destes compostos apenas com a realização da rotoevaporação do hidrolisado na etapa de concentração, uma vez que estes compostos são muito voláteis.

Segundo Parajó et al. (1998) a evaporação permite a redução na quantidade de diversos compostos voláteis, sendo possível a remoção de até 50% do ácido acético presente.

De fato, observou-se uma redução em 43% de ácido acético do hidrolisado devido ao processo de concentração, o qual apesar de aumentar sua concentração de 3,23 para 9,18 g/L, o valor final da concentração de ácido acético foi inferior ao proporcional ao fator de concentração.

Desta maneira, a fração líquida obtida a partir do pré-tratamento hidrotérmico será utilizada na continuidade dos estudos deste trabalho, uma vez que apresentou elevada concentração de xilooligômeros e baixa concentração de inibidores do metabolismo.

4.3 Estudos do Processo de Hidrólise, Isomerização e Fermentação Simultâneos (SHIF)

4.3.1 Estudos preliminares do processo SHIF

Tendo em vista a produção contínua de etanol lignocelulósico utilizando-se hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) de hemicelulose, realizou-se um ensaio preliminar de SHIF de xilana de bétula comercial (108 g/L, pH 5,6 tampão citrato 50mM) contendo derivados das enzimas xilanase Acellerase XY A03304 e xilose isomerase (XI) co-imobilizadas em alginato de cálcio com a levedura *S. cerevisiae*. Neste ensaio preliminar, utilizou-se a XAS-7 uma vez que esta enzima apresentou perfil de XOS semelhantes à XAS-4 selecionada e o derivado desta enzima imobilizada em quitosana-glutaraldeído encontrava-se disponível devido ao desenvolvimento de projetos paralelos no grupo de Tecnologia Enzimática do DEQ/UFSCar.

A xilana de bétula comercial foi pré-hidrolisada pela ação da endoxilanase de *B. subtilis*, objetivando aumentar a concentração de XOS com cadeias menores e consequentemente facilitar o acesso enzimático no processo de SHIF. Para isso, foram oferecidas 150 UI/g_{xilana} da XynA imobilizada em quitosana glutaraldeído (35,0±0,8 UI/g) por 24 horas, 50°C sob agitação mecânica. Apesar de menos estável que o derivado de XynA em agarose-glioxil, utilizou-se quitosana-glutaraldeído como suporte de imobilização nesta etapa pois trata-se de um suporte de custo mais baixo e uma elevada estabilidade operacional não era imprescindível uma vez que o processo seria realizado em batelada, sem a realização de ciclos do biocatalisador. Ao final, a enzima imobilizada foi recuperada por uma etapa de filtração e a massa seca de xilana retida no filtro foi quantificada (fração insolúvel da xilana) A composição do substrato após a pré-hidrólise encontra-se na Tabela 4.6.

Como esperado, não houve produção de xilose no processo, uma vez que a XynA é exclusivamente endoxilanasase. Observou-se ainda que apenas 67% da xilana foi solubilizada. De acordo com Gray et al. (2007), a solubilidade dos oligômeros de xilana irá depender do grau de polimerização de cada composto assim como da interação desses compostos com a saturação dos demais, desta maneira, nas condições utilizadas 33% da xilana de bétula é insolúvel.

Os *beads* foram confeccionados de acordo com o Item 3.4 e o processo SHIF foi realizado em incubadora rotatória a 150 rpm e 32°C por 24h (utilizando-se tubos falcon 15 mL contendo 2,4mL de volume reacional suplementado de acordo com Item 3.5). A carga oferecida de xilanasase foi de $1,7 \times 10^4$ UI/L e de xilose isomerase foi de $3,7 \times 10^4$ UI/L. Utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* comercial da marca Itaiquara® na concentração de 50g_{seca}/L. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.7 e nas Figuras 4.9 e 4.10.

Tabela 4.6 – Caracterização do substrato SHIF (xilana de bétula 108 g/L) após pré-hidrólise com XynA (150UI/g_{xilana}) – 50°, pH 5,6, 24h.

Componente (g/L)	Xilana de bétula hidrolisada
X6 ou maior	62,29
X5	0,00
X4	1,20
X3	2,46
X2	7,07
Xilose	0,00
Total Solúvel	73,02
Total Insolúvel (retido na filtração)	35,57
Total de xilana	108,6

Tabela 4.7 – Acompanhamento da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanasase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm e 32°C.

Tempo (h)	X5+X6 (g/L)	X4 (g/L)	X3 (g/L)	X2 (g/L)	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	pH
0	56,84	1,53	3,57	3,88	0	0	0	5,65
4	56,10	0	1,85	6,12	1,58	0,34	0	5,2
8	55,64	0	1,25	5,49	2,24	1,1	0	5,1
12	53,45	0	5,07	4,03	2,22	1,2	0,25	5,3
24	52,25	0	0	1,10	1,62	2,2	0,84	5,1

Figura 4.9 – Acompanhamento dos teores de XOS e xilose durante a SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm e 32°C.

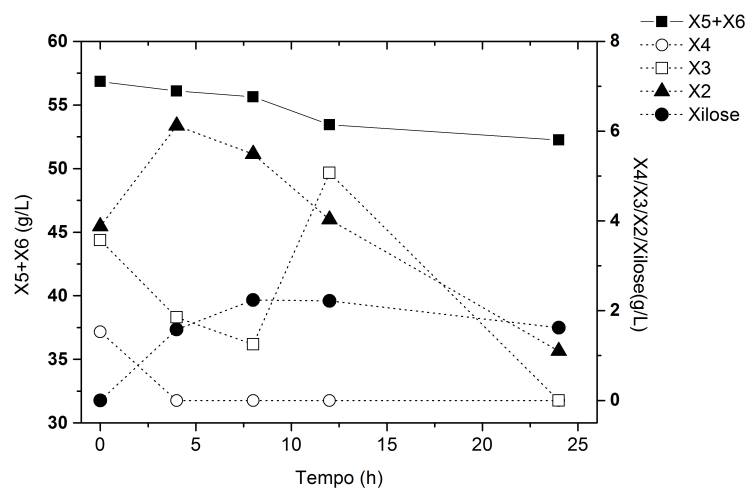
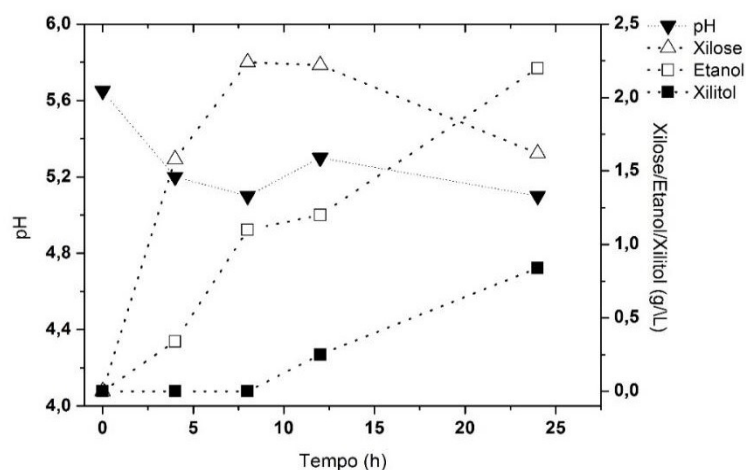


Figura 4.10 – Acompanhamento do pH e dos teores de xilose, etanol e xilitol durante a SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm e 32°C.



Observa-se que o processo é possível, uma vez que partindo-se da xilana de bétula foi possível produzir-se etanol. A produção de etanol no processo foi maior que de xilitol, apresentando uma seletividade de 2,61. A produtividade do processo foi de 0,092 g/L.h e o fator de rendimento (Y_p/s) foi de 0,160 g/g, calculado em base de xilose potencial.

Entretanto, observa-se um acúmulo de xilose no processo, o qual indica que a isomerização de xilose em xilulose não está acontecendo como esperado. Existem duas possibilidades para ocorrência deste fato: a XI não está catalisando a isomerização de xilose corretamente ou a levedura não está consumindo a xilulose, a qual estaria acumulando e consequentemente parando a isomerização devido à relação de equilíbrio xilose:xilulose. Uma vez que a levedura permaneceu íntegra (viabilidade celular inicial e final inalterada: 96%) e não houve acúmulo de xilulose no meio, o acúmulo de xilose no processo pode ser explicado pelo mal funcionamento da XI.

Os resultados obtidos no experimento controle (Tabela 4.8), utilizando apenas xilose como substrato, demonstram que a XI funcionou normalmente na catálise do processo alimentado com xilose. O baixo rendimento ($0,103 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$) observado deve-se ao grande volume de oxigênio dissolvido presente na conformação utilizada no processo (volume útil de 2,4 mL em um frasco de 15 mL), o qual ocasiona o desvio de metabolismo celular para o crescimento de biomassa.

Tabela 4.8 – Experimento controle realizado com xilose (100 g/L) como substrato, 150 rpm 32°C

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Xilulose (g/L)	$Y_{P/S}$ $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$	$Y_{X_{iOH}/S}$ $\text{g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$	Seletividade $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilitol}}$
0	100,61	0	0	0			
12	11,80	9,1	4,8	0,1	0,103	0,053	1,9

De acordo com a literatura, o íon cálcio presente na composição dos *beads* de alginato de cálcio, assim como na suplementação do meio (CaCl_2), pode inibir a atividade da xilose isomerase (FUXREITER et al., 1997). Silva (2013) observou que a XI possui grande sensibilidade a variações de pH, sendo pHs ácidos desfavoráveis para sua atividade catalítica. Por outro lado, é sabido que o íon magnésio é um importante cofator da XI, realizando função ativadora sobre a enzima. Assim sendo, uma vez que o pH do meio tende a diminuir devido à hidrólise da xilana, um estudo buscando verificar a influência dos íons cálcio e magnésio na XI em diferentes pHs se mostrou necessário.

4.3.2 Estudos da influência do pH e dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} sobre a xilose isomerase

Para investigação da influência dos íons cálcio e magnésio na atividade catalítica da enzima xilose isomerase, quantificou-se a atividade desta enzima em diferentes pHs (5,0 a 8,0) variando-se as concentrações dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} conforme Tabela 3.2 do Item 3.7. O meio considerado como meio padrão era constituído por Frutose 2M em Tampão Tris-maleato pH 8,0, MgSO_4 50mM e CoCl_2 2,5mM. A partir deste meio padrão, Mg^{2+} e Ca^{2+} foram adicionados em concentrações variadas e o pH foi alterado. A Tabela 4.9 apresenta a atividade obtida em cada condição estudada, tomando como 100% o ensaio realizado com o meio padrão em pH 8,0.

Tabela 4.9 – Influência dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na atividade de XI realizada em frutose 2M, 60°C. Atividade catalítica em meio padrão pH 8,0 foi considerada como 100%.

Meio	Descrição	pH 8,0		pH 7,0		pH 6,0		pH 5,0	
		Atividade (UI/mL)	%	Atividade (UI/mL)	%	Atividade (UI/mL)	%	Atividade (UI/mL)	%
1	Padrão	1896,1±68,3	100,0	1590,6±23,5	83,9	1466,9±12,9	77,4	442,8±21,2	23,4
2	2xMg	2041,5±31,4	107,7	1890,0±7,9	99,7	1820,0±3,14	96,9	940,6±24,8	49,6
3	5xMg	2202,4±67,4	116,2	2287,2±43,2	120,6	2333,3±12,8	123,1	1166,1±35,4	61,5
4	padrão+Ca*	1454,4±97,6	76,7	1312,2±20,7	69,2	572,8±85,6	30,2	380,8±45,6	20,1
5	2xCa	1366,7±72,1	72,1	944,4±69,1	49,8	503,3±94,3	26,6	352,2±45,3	18,6
6	5xCa	1063,2±56,1	56,1	797,8±56,6	42,1	356,7±31,4	18,8	255,1±44,6	13,5
7	padrão+Ca*	1454,4±76,7	76,7	1312,2±20,7	69,2	572,8±85,6	30,2	380,8±45,6	20,1
8	2xMg	1542,4±81,3	81,3	1673,3±27,4	88,3	1073,3±56,6	56,6	803,3±20,1	42,4
9	5xMg	1672,8±88,2	88,2	2236,7±39,3	117,9	1250,0±16,6	65,9	966,1±17,4	51,0

* $[\text{CaCl}_2] = 4 \text{ g/L}$ (mesma utilizada na suplementação da SHIF)

O íon Ca^{2+} comprovou-se um inibidor desta enzima, provocando quedas significativas na atividade de XI proporcionalmente ao aumento de sua concentração no meio. Mg^{2+} , por sua vez, realmente foi capaz de ativar a enzima, aumentando a atividade enzimática em 16,2% em pH 8,0 e em 163% em pH 5, ambos em meio livre de cálcio. Este cofator mostrou-se ainda capaz de contornar a inibição provocada pelo cálcio, uma vez que reativou a enzima na presença deste íon, aumentando sua atividade catalítica em todos os pHs estudados.

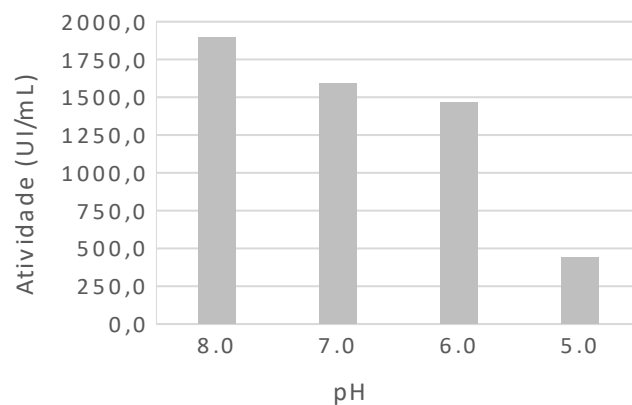
A reação de isomerização catalisada pela XI inicia-se pela abertura do anel de açúcar, seguida pela isomerização via troca de hidretos e finalmente estabilização do produto pelo fechamento do anel (ASBOTH; SZABOB, 2000). Apesar de não haver relação entre a presença de magnésio e a etapa de abertura do anel, este cátion é essencial para que ocorra a isomerização (Allen et al., 1994). De acordo com Kasumi et al. (1982), a reação é guiada

obrigatoriamente pela existência de um complexo binário enzima-cátion divalente, uma vez que o substrato irá se ligar apenas ao sítio ativo deste complexo. A xilose isomerase possui dois sítios ativos, cada um contendo dois cátions divalentes (Allen et al., 1994). Assim sendo, a presença de maiores concentrações de magnésio no meio reacional garante a presença deste íon no sítio ativo da enzima, permitindo a catálise da reação de isomerização.

O íon cálcio, apesar de ser divalente e pertencer à mesma família da tabela periódica que o magnésio (possuindo assim a mesma configuração na camada de valência), encontra-se em um período diferente da tabela. Enquanto Mg^{2+} pertence ao terceiro período, Ca^{2+} pertence ao quarto período, possuindo assim 4 camadas eletrônicas e conseqüentemente um raio atômico maior que o Mg^{2+} . Tal fato pode explicar porque apesar de ambos serem íons divalentes e pertencerem à mesma família, Mg^{2+} é um ativador da enzima enquanto Ca^{2+} inibe a XI, pois devido à diferença no raio atômico possuem diferentes interações com o sítio ativo da enzima.

Além da influência significativa dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , a enzima XI apresenta grande sensibilidade à variação de pH, perdendo atividade significativamente em pH 5,0 (Figura 4.11).

Figura 4.11– Influência do pH na atividade de XI observada em frutose 2M, 60°C

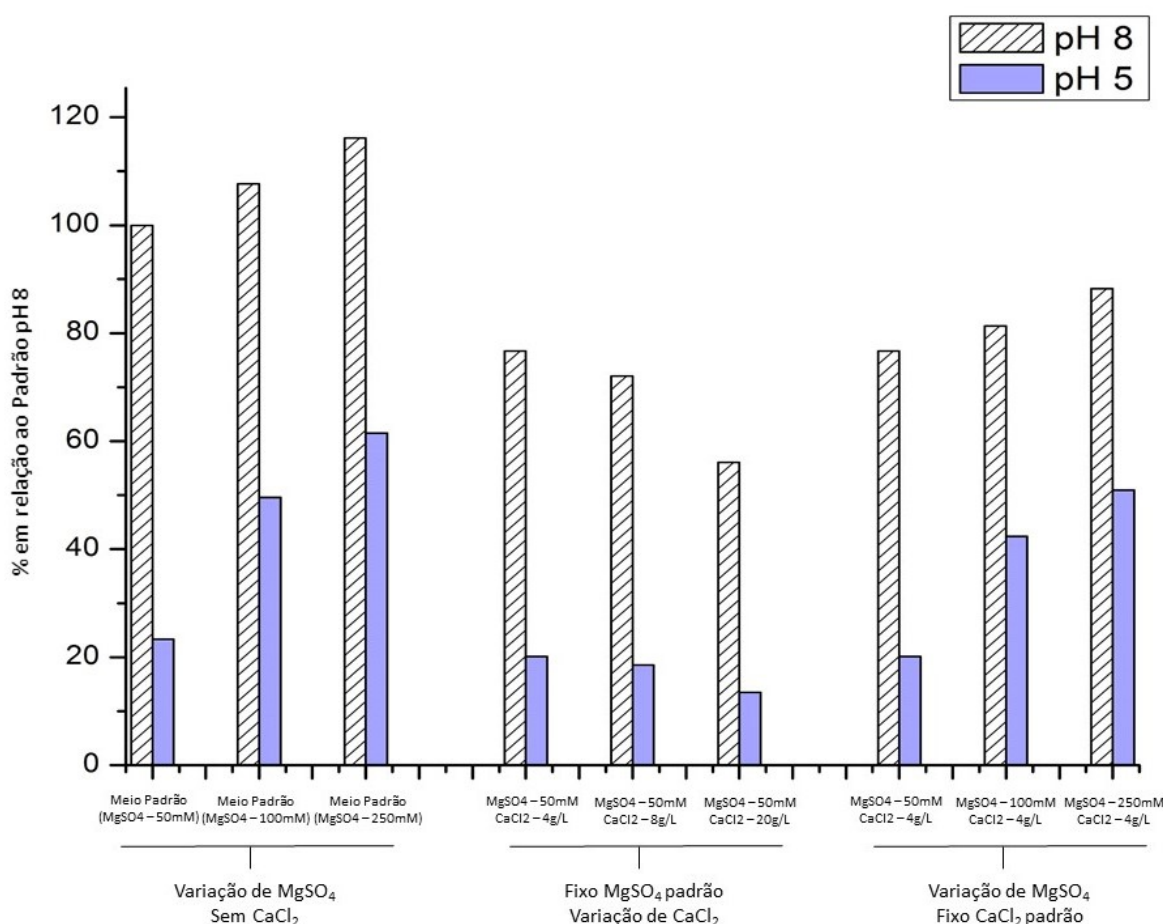


A sensibilidade da XI à variação de pH já foi observada anteriormente por Silva (2013), a qual enfatizou a importância do controle do pH durante o processo de SHIF. Entretanto, a partir dos resultados do presente estudo observa-se ainda que a ativação proporcionada pelo Mg^{2+} é potencializada em pHs mais baixos (Figura 4.12). Ao se fixar Ca^{2+}

(4g/L), a adição do íon magnésio foi capaz de recuperar 11,5% da atividade catalítica padrão em pH 8,0, enquanto em pH 5,0 este valor foi de 30,9%.

Uma vez que os efeitos dos íons são potencializados em pHs mais baixos, o controle de pH no processo de SHIF (pH 5,7) mais uma vez mostra-se indispensável. Um ensaio foi realizado tentando produzir os *beads* de alginato utilizando apenas $MgCl_2$, substituindo a solução de coagulação convencional utilizada por Silva (2013) ($CaCl_2$ 0,25M e $MgCl_2$ 0,25M). Esta abordagem foi utilizada uma vez que a gelificação do alginato de sódio ocorre rapidamente na presença de cátions bivalentes por meio de reações de cross-link, onde a interação destes cátions com as unidades de ácido glucurônico formam pontes poliméricas (RABANEL et al., 2009). Porém os beads formados neste processo não eram estáveis, sendo dissolvidos rapidamente após sua formação.

Figura 4.12 – Influência do pH na interferência dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na atividade de XI medida com frutose 2M a 60°C



4.3.3 Ensaio SHIF com controle de pH e excesso de Mg²⁺

Objetivando contornar a possível inibição da XI causada pela presença do íon Ca²⁺, realizou-se um ensaio SHIF com controle de pH e excesso de magnésio. Para isso, os *beads* foram confeccionados sem a adição de CaCO₃, uma vez que este sal não seria necessário para o controle de pH e com sua remoção estaríamos eliminando mais uma fonte de Ca²⁺ do processo.

Xilana de bétula comercial (108 g/L pH 5,6 tampão citrato 50mM)) pré-hidrolisada pela endoxilanase de *B. Subtilis* foi utilizada como substrato. Os *beads* do biocatalisador foram confeccionados de acordo com descrito no Item 3.4 e o processo foi realizado em reator com camisa de vidro a 32°C sob agitação mecânica e controle de pH (5,7) por 12h. A carga de xilanase oferecida foi de 1,7x10⁴ UI/L, XI foi de 3,7x10⁴ UI/L e a concentração celular era de 50g_{seca}/L. O meio foi suplementado com 100mM de MgSO₄ (24,6 g/L), concentração a qual correspondia a 4 g/L anteriormente. A concentração de CaCl₂ foi mantida a mesma (4 g/L) devido à necessidade deste nutriente para manter a integridade dos *beads*. É importante ressaltar que a agitação do processo não afetou a integridade dos *beads*. O acompanhamento do processo com o tempo encontra-se na Tabela 4.10 e nas Figuras 4.13 e 4.14.

Tabela 4.10 – Acompanhamento da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150 rpm e 32°C e pH 5,7.

Tempo (h)	Etanol (g/L)	Xilose (g/L)	X2 (g/L)	X3 (g/L)	X4 (g/L)	X5+X6 (g/L)	Xilulose (g/L)	Xilitol (g/L)
0	0	0	4,85	2,73	3,02	50,45	0	0
1	0,30	0,56	3,44	1,98	0,93	46,57	0,08	0
4	0,55	1,63	4,47	1,52	0,81	41,53	0,13	0,09
8	2,93	2,95	8,02	2,08	1,75	55,89	0,08	0,54
12	3,09	1,80	3,88	1,59	1,60	65,91	0,10	0,99

Observou-se uma maior produção de etanol no processo com controle de pH e excesso de Mg²⁺ quando comparado ao ensaio preliminar realizado (3,1 e 2,2 g/L, respectivamente). A seletividade em etanol e a produtividade também foram favorecidas, aumentando para 3,12 e 0,26 g/L.h, respectivamente. O cálculo do fator de rendimento (Y_{p/s}) não foi possível uma vez que a hidrólise da xilana continuou acontecendo durante o processo pois neste ensaio a fração insolúvel restante ao final da pré-hidrólise foi mantida no meio. Assim sendo, XOS continuaram a ser produzidos pela ação das xilanases, fato que pode ser verificado pelo aumento nas concentrações de X5+X6 (Tabela 4.10).

Figura 4.13 – Acompanhamento dos teores de XOS e xilose da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm, 32°C e pH 5,7.

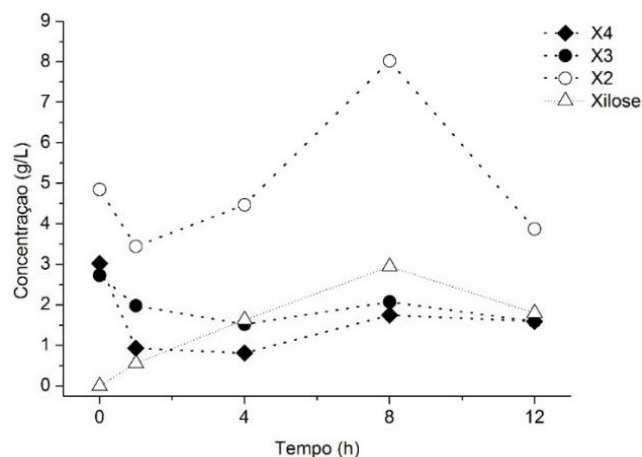
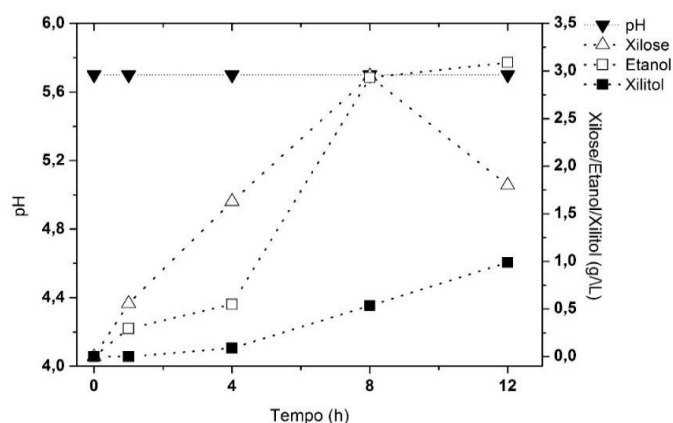


Figura 4.14 – Acompanhamento do pH e dos teores de xilose, etanol e xilitol da SHIF de xilana de bétula (5% m/m xilanase, 15% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150 rpm, 32°C e pH 5,7.



Entretanto, apesar da melhora no processo, novos estudos são necessários para sua viabilização pois além da baixa velocidade do processo, o acúmulo de xilose ainda observado no meio sugere que a XI ainda encontra limitações para agir na isomerização.

A Tabela 4.11 apresenta os resultados obtidos no experimento controle, realizado em tubo falcon de 15 mL contendo 10 mL de volume útil e utilizando apenas xilose como substrato, no qual apesar de não ser realizado sob controle de pH observa-se o dobro da produtividade de etanol da SHIF com xilana (0,53 g/L.h).

Tabela 4.11 – Experimento controle realizado com xilose (26 g/L) como substrato, 150 rpm 32°C

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Xilulose (g/L)	$Y_{P/S}$ $\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{xilose}}}$	$Y_{X_{iOH}/S}$ $\frac{g_{\text{xilitol}}}{g_{\text{xilose}}}$	Seletividade $\frac{g_{\text{etanol}}}{g_{\text{xilitol}}}$
0	26,0	0	0	0			
12	7,9	6,39	3,96	0,1	0,353	0,219	1,6

Surgiu então a hipótese de inibição da XI pelos XOS, principalmente por xilobiose (X2) e xilotriose (X3), os quais são obtidos em maior quantidade e possuem semelhança estrutural à xilose. Desta maneira, decidiu-se realizar ensaios SIF convencional, sem a presença de xilanase, para avaliar a influência dos XOS na ação da XI.

4.3.4 Avaliação da influência dos XOS sob a ação catalítica da xilose isomerase (XI)

Visando identificar possível inibição na ação da enzima xilose isomerase (XI) pela presença dos XOS, realizou-se um ensaio SIF (Isomerização e Fermentação Simultâneas) utilizando-se o *bead* de alginato de cálcio contendo apenas XI co-imobilizada com *S. cerevisiae* nas proporções 20% m/m de XI e 10% de levedura, representando uma carga enzimática de $1,03 \times 10^5$ UI/L e concentração celular de $100 g_{\text{seca}}/L$.

Três ensaios foram realizados a 32°, 150 rpm e pH 5,7 cujos meios eram compostos por:

Ensaio A – Controle contendo 60g/L de xilose comercial;

Ensaio B – Fração Líquida hidrotérmica + 60 g/L de xilose;

Ensaio C – Fração Líquida hidrotérmica + 60 g/L de xilose + XAS-5 (150 UI/ g_{xos}).

A fração líquida hidrotérmica continha inicialmente 0,9 g/L de X5; 2,29 g/L de X4; 2,37 g/L de X3 e 4,47 g/L de X2 (Total XOS: 10,03 g/L), permitindo assim verificar a influência da presença destes compostos no processo. A composição dos inibidores encontra-se na Tabela 4.5 do Item 4.2. A partir destes experimentos será possível ainda verificar a viabilidade do emprego da fração líquida hidrotérmica pela levedura, uma vez que compostos gerados na etapa de pré-tratamento podem ser tóxicos para as células. O acompanhamento dos experimentos encontra-se apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura), 150rpm, 32°C e pH 5,7. Controle realizado com xilose comercial.

Ensaio A - Controle - 60 g/L de Xilose					
Tempo (h)	Xilose (g/L)	Xilulose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	pH
0	59,7	3,03	0	0	5,7
2	38,2	10,08	4,52	0,18	5,45
5	21,26	5,01	9,69	3,04	5,55
10	4,8	0,95	16,48	6,66	5,51
15	0,76	0,16	17,82	7,73	5,4
Ensaio B - Fração Líquida Hidrotérmica - 60 g/L de Xilose					
Tempo (h)	Xilose (g/L)	Xilulose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	pH
0	52,08	5,37	0	0	5,7
2	41,68	9,72	3,01	0,08	5,3
5	36,41	9,66	4,9	0,18	5,45
10	28,25	7,94	4,31	1,74	5,44
15	13,64	5,22	8,11	3,38	5,52
Ensaio C - Fração Líquida Hidrotérmica - 60 g/L de Xilose + XAS-5					
Tempo (h)	Xilose (g/L)	Xilulose (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	pH
0	52,08	5,37	0	0	5,7
2	37,05	8,77	2,36	0,105	5,31
5	33,46	8,58	8,3	0,085	5,26
10	18,84	5,56	6,11	0,15	5,05
15	15,31	4,7	7,26	0,115	4,91

*Xilulose e Arabinose co-eluem no método utilizado no HPLC, explicando assim a xilulose quantificada no tempo zero, a qual provavelmente corresponde a arabinose

A fração líquida hidrotérmica não provocou perda de viabilidade celular de *S. cerevisiae*, uma vez que não se observou acúmulo de xilulose nos ensaios e a contagem de células viáveis inicial e final manteve-se constante, $7,4 \times 10^7$ células/mL e $7,1 \times 10^7$ células/mL, respectivamente.

Observa-se que a velocidade de consumo de xilose, assim como o rendimento em etanol foram inferiores utilizando-se a fração líquida hidrotérmica como substrato (Tabela 4.13), representando uma queda na ação catalítica da XI e inibição do metabolismo da levedura devido a presença dos inibidores. A partir das Figuras 4.15 e 4.16 observa-se que a xilose foi totalmente consumida após 15h no experimento controle, enquanto no experimento B após o mesmo período ainda restavam 13,6 g/L da pentose no meio. Contudo, apesar do

consumo mais lento, a tendência da curva indica que o processo não havia parado, apenas estava sendo realizado em uma velocidade reduzida.

Tabela 4.13 – Parâmetros da SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura) 150 rpm, 32°C e pH 5,7. A - Controle foi realizado com xilose comercial; B- fração líquida hidrotérmica; C – fração líquida hidrotérmica + XAS-5 (150UI/g_{xos}).

	Ensaio		
	A	B	C
Xilose Consumida (g/L)	58,9	38,44	36,77
$Y_{P/S}$ (g _{etanol} /g _{xilose})	0,303	0,21	0,19
$Y_{X_{iOH/S}}$ (g _{xilitol} /g _{xilose})	0,131	0,088	0,077
V consumo xilose (g/L.h)	3,9	2,6	2,4

Já no ensaio C, é possível verificar uma tendência de estagnação na curva, ou seja, a xilose passou a ser acumulada, assim como etanol deixou de ser consumido, indicando que a XI parou de realizar a isomerização de xilose a xilulose. Tal fato sustenta a hipótese de inibição pela presença dos XOS, uma vez que o ensaio C possui a xilanase XAS-5 agindo sobre a xilana e liberando XOS no processo. Ao final de 15 horas o meio continha mais que o dobro da concentração inicial de XOS (1,45 g/L de X5; 3,96 g/L de X4; 8,26 g/L de X3 e 9,73 g/L de X2 - Total de XOS: 23,4 g/L), justificando assim a maior queda na velocidade do processo. Além disso, devido à etapa de hidrólise ocorrendo simultaneamente ao processo, observou-se uma maior queda do pH do ensaio C, o qual interfere significativamente na atividade da XI, justificando também a perda de atividade.

Figura 4.15 – Consumo de xilose da SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura) 150rpm e 32°C. Controle foi realizado com xilose comercial.

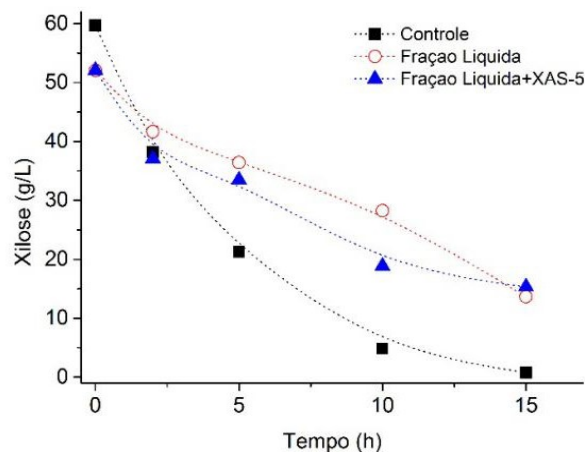
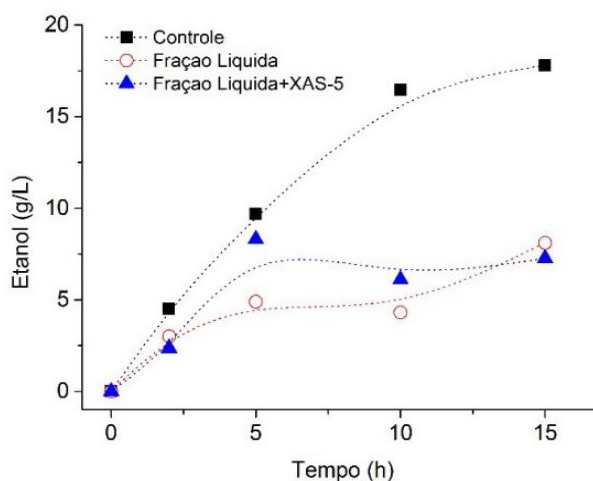
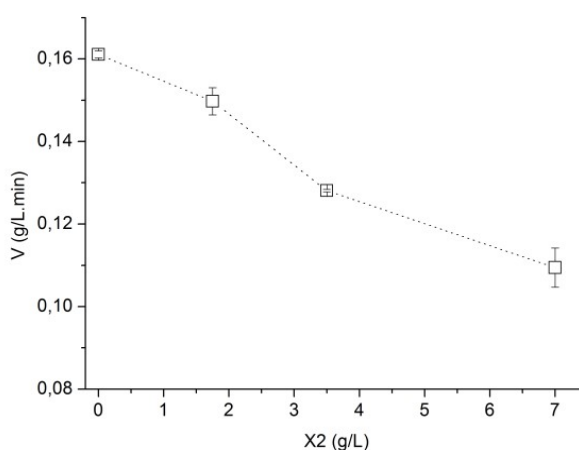


Figura 4.16 – Produção de etanol da SIF da fração líquida hidrotérmica (20% m/m XI e 10% m/m de levedura) 150 rpm, 32°C e pH 5,7. Controle foi realizado com xilose comercial.



Objetivando comprovar a inibição da XI por XOS, mediu-se a velocidade inicial de isomerização de frutose à glicose na presença de diferentes concentrações de X2 (0; 1,75; 3,5 e 7,0 g/L). Tal experimento possibilitou observar a queda significativa na velocidade da reação catalisada pela enzima conforme a concentração de xilobiose foi aumentada (Figura 4.17), a qual diminuiu de 0,16 g/L.min nas condições sem inibidor para 0,11 g/L.min na presença de 7 g/L de X2 (31,6% de redução da velocidade).

Figura 4.17 – Velocidade de isomerização de frutose à glicose catalisada pela XI na presença de diferentes concentrações de X2 (0; 1,75; 3,5 e 7,0 g/L) – 60°C e pH 7,0



Desta maneira, fica clara a influência de X2 e possivelmente de XOS na ação catalítica da enzima XI. Provavelmente trata-se de uma inibição reversível uma vez que a atividade de XI nos *beads* medida em frutose no início e ao final do processo manteve-se constante (Antes: $44,4 \pm 2,0$ UI/g – Depois: $43,7 \pm 1,3$ UI/g). Para maior entendimento do processo, estudos cinéticos de inibição da enzima por estes compostos, principalmente X2 e X3 ainda deverão ser realizados dentro do grupo para se caracterizar o tipo de inibição.

Conforme já mencionado na introdução, a patente previa o uso de levedura geneticamente modificada para realizar a isomerização *in-vitro*. Surgiu a oportunidade de se trabalhar em colaboração com o grupo do Prof. Johan M. Thevelein, que desenvolveu as leveduras GSE16-T18 e GSE16-T18 HAA1 e tinha interesse em testá-las na forma imobilizada. Era de nosso interesse também testar o processo SIF com a levedura modificada, pois caso se mostre muito difícil manter a atividade *in-vitro* de XI imobilizada, o uso da levedura geneticamente modificada poderia aumentar a velocidade de produção de etanol, já que ela opera bem a pHs abaixo de 5. Os demais pesquisadores do grupo assumiram então a continuidade do estudo do processo SHIF com XI imobilizada e levedura não modificada, enquanto que o presente trabalho foi direcionado para estudo do desempenho da levedura geneticamente modificada sob condições operacionais semelhantes às utilizadas no processo SHIF.

Nesse contexto, passar-se-á a apresentar e discutir os experimentos realizados com a levedura geneticamente modificada. Parte dos experimentos foi conduzida durante doutorado sanduíche no laboratório do Prof. Johan M. Thevelein, enquanto que os estudos em reator de leito fixo foram executados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (DEQ/UFSCar).

4.4. Experimentos em batelada utilizando *S. cerevisiae* geneticamente modificada

Após comprovar-se que a xilose isomerase sofre inibição pelos XOS utilizados como substrato no processo de SHIF, o emprego de levedura geneticamente modificada capaz de assimilar xilose diretamente foi considerado como uma solução a ser testada. Desta maneira, a continuidade do trabalho foi realizada em parceria com o laboratório do Prof. Johan Thevelein da KU Leuven (Bélgica), onde a doutoranda realizou doutorado sanduíche.

Utilizou-se a levedura GSE16-T18SI.1 (T18), uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* engenheirada para o consumo de xilose. Esta cepa foi obtida através da inserção de genes de XI de *Clostridium phytofermentans* na levedura Ethanol Red (utilizada industrialmente na

produção de etanol 1G) por meio de técnicas de análise poligênica e adaptação evolutiva (DEMEKE et al., 2013a).

Uma das desvantagens do emprego de microrganismos geneticamente modificados é a possibilidade de perda de características importantes após a modificação genética para a expressão do gene de interesse. No caso particular da levedura T18, as modificações genéticas necessárias para a expressão da enzima glicose isomerase prejudicaram a robustez da levedura parental, a qual passou a ser menos tolerante à inibidores do metabolismo microbiano, como o etanol e o ácido acético (DEMEKE et al., 2013b).

Para que o processo SHIF possa ser conduzido de forma contínua, é importante que a levedura seja capaz de permanecer viável por longos períodos na presença de inibidores provenientes da etapa de pré-tratamento. O emprego da levedura imobilizada pode auxiliar na performance da levedura, uma vez que dentre as vantagens da técnica de imobilização de leveduras e enzimas, além da recuperação do biocatalisador, podemos citar a possível proteção aos inibidores presentes no meio devido à presença do suporte de imobilização, o qual cria um microambiente em seu interior. Desta maneira, primeiramente avaliou-se a viabilidade da levedura livre e imobilizada assim como os perfis de fermentação de xilose e tolerância à inibidores.

4.4.1. Perfil de fermentação de xilose pela levedura T18 e efeito do ácido acético

A presença de ácido acético nos hidrolisados lignocelulósicos pode reduzir significativamente a capacidade fermentativa da levedura uma vez que este composto é um forte inibidor do metabolismo microbiano, influenciando severamente a fermentação em baixas concentrações de ácido (Krisch e Szajáni, 1997). A capacidade de fermentar pentoses inserida artificialmente por engenharia genética é especialmente afetada pelo ácido acético, enfatizando assim a importância de estudos para contornar a baixa tolerância a este composto para que se atinja a total conversão dos açúcares presentes no hidrolisado à etanol (Meijnen et al., 2016).

Ensaio fermentativos foram realizados em xilose (40 g/L) na presença de diferentes concentrações de ácido acético (0,0 a 8,0 g/L) utilizando-se a levedura T18 em sua forma livre e imobilizada em gel de alginato de cálcio. Os perfis obtidos encontram-se na Figura 4.18 e os parâmetros fermentativos na Tabela 4.14. Os beads foram produzidos de acordo com Item 3.4, entretanto sem adição das enzimas.

Figura 4.18 – Fermentação de YPX 40 g/L pela levedura T18 em diferentes concentrações de ácido acético (35°C, 150 rpm e pH 5,2). Os experimentos contendo células livres (A) continham DO 4 inicial e os com células imobilizadas (B) a proporção de 1:1 volume de *beads* e volume de meio. Ethanol Red foi utilizada como controle negativo.

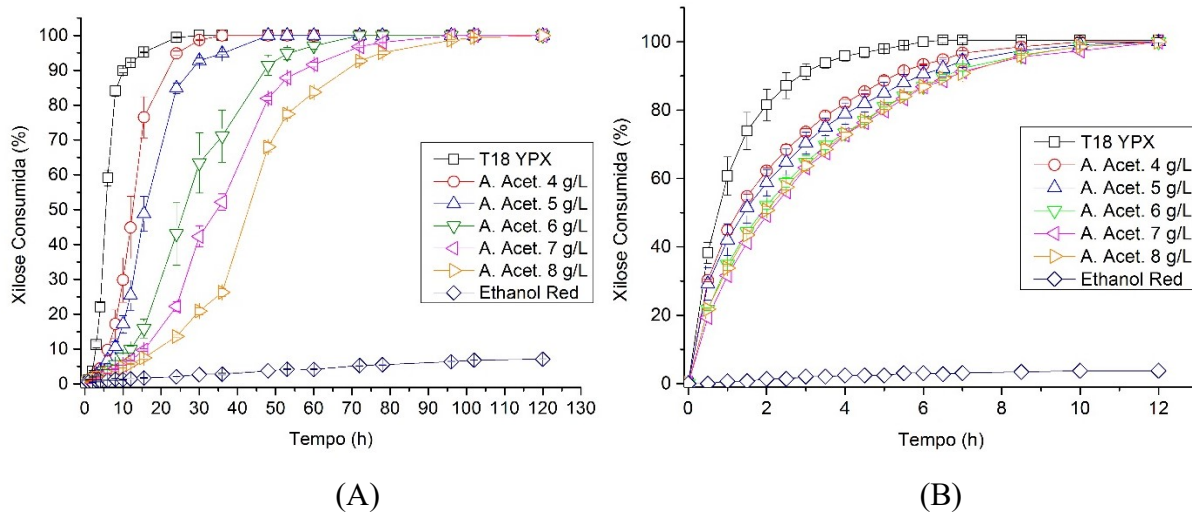


Tabela 4.14 – Parâmetros da fermentação da levedura T18 em meio YPX 40 g/L contendo diferentes concentrações de ácido acético. Os experimentos contendo células livres foram inoculados com DO 4 e os experimentos com células imobilizadas com a proporção de 1:1 volume de *beads* e volume de meio (35°C, 150 rpm e pH 5,2).

T18 livre				
	Etanol (g/L)	Yp/s (g/g)	Qp (g/L.h)	pH final
YPX 40 g/L	16,3 ± 0,2	0,441 ± 0,006	1,36	5,1
A. Acético 4 g/L	16,2 ± 1,9	0,439 ± 0,054	0,68	5,1
A. Acético 5 g/L	18,3 ± 0,1	0,467 ± 0,003	0,38	5,1
A. Acético 6 g/L	16,5 ± 0,5	0,422 ± 0,018	0,23	5,1
A. Acético 7 g/L	16,3 ± 0,3	0,416 ± 0,005	0,17	5,1
A. Acético 8 g/L	15,9 ± 0,1	0,405 ± 0,025	0,13	5,0
T18 Imobilizada				
	Etanol (g/L)	Yp/s (g/g)	Qp (g/L.h)	pH final
YPX 40 g/L	14,4 ± 0,00	0,422 ± 0,066	3,61	4,1
A. Acético 4 g/L	15,4 ± 0,00	0,429 ± 0,000	1,93	4,8
A. Acético 5 g/L	16,2 ± 0,1	0,455 ± 0,009	1,35	4,9
A. Acético 6 g/L	15,5 ± 0,2	0,417 ± 0,004	1,30	4,9
A. Acético 7 g/L	14,3 ± 0,9	0,444 ± 0,024	1,19	4,9
A. Acético 8 g/L	15,6 ± 0,5	0,458 ± 0,019	1,30	5,0

A levedura T18 foi capaz de fermentar eficientemente xilose enquanto o controle negativo (Ethanol Red) não consumiu a pentose. Em 12 horas de processo em meio YPX 40 g/L a T18 havia consumido toda xilose, com uma produtividade de 1,36 g/L.h e rendimento de 0,441 g/g, o qual corresponde a 87% do rendimento teórico (Tabela 4.14). É importante ressaltar que não observou-se a presença de xilose residual assim como não houve a produção de subprodutos como xilitol e glicerol.

A busca por leveduras que fermentem xilose eficientemente é amplamente estudada na literatura, seja por modificações genéticas ou microrganismos naturalmente fermentadores de pentoses. Li et al. (2016) obtiveram uma cepa de *S cerevisiae* modificada para expressão de xilose isomerase que foi capaz de fermentar xilose em meio sintético necessitando de mais de 72h para consumir 35 g/L de xilose. Além disso, os autores observaram significativa produção de xilitol e glicerol. Gonçalves et al. (2014) construíram uma cepa de *S cerevisiae* capaz de fermentar xilose (MA-B43) por expressar a xilose isomerase. Entretanto, também foram necessárias 72h para o consumo de 40 g/L de xilose em meio sintético. Além disso, nem toda a xilose havia sido consumida no final do processo. Silva et al. (2011) estudaram a produção de etanol a partir da levedura *Pichia stipitis*, naturalmente fermentadora de xilose e apesar do bom rendimento em etanol (0,32 g/g) obtiveram uma baixa produtividade (0,32 g/L.h) devido ao longo tempo de processo (96h). Desta maneira, a T18 destaca-se como uma excelente fermentadora de xilose, com uma velocidade elevada quando comparada com a literatura e sem a produção de subprodutos.

Apesar do bom desempenho na ausência de ácido acético, é evidente que este inibidor interfere significativamente no metabolismo da T18, aumentando o tempo de fermentação de 12 para 120h quando na presença de 8 g/L de ácido acético (Figura 4.18A).

Martani et al (2013) estudando o desempenho da *S. cerevisiae* selvagem incubada em diferentes concentrações de ácido acético observou que a levedura sofreu grande queda na viabilidade na presença de 100 mM do ácido (6 g/L), porém o pH utilizado pelos autores era mais ácido (pH 3,0) fato que potencializa a toxidez do ácido acético. O ácido acético é um ácido fraco ($pK_a = 4,76$) e em baixos pHs apresenta-se em sua forma não dissociada, a qual difunde pela membrana plasmática chegando ao citosol, onde se dissocia em prótons e ânions acetato devido ao pH neutro intracelular, diminuindo o pH intracelular e prejudicando a síntese de DNA e RNA e o funcionamento das enzimas intracelulares, além de causar um consumo elevado de ATP para bombear os prótons para fora da célula pela atividade da ATPase (SWINNEN et al., 2014; GREETHAM, 2014).

Guldfeldt e Arneborg (1998) analisaram o efeito de 2 g/L de ácido acético na redução do pH interno da *S. cerevisiae* em diferentes pHs. Os autores observaram que quando empregados valores mais baixos de pH (4,5 e 3,5), o pH interno celular ia de 5,6 para 4,4; porém, ao utilizar-se pH 5,6, o decréscimo do pH interno era de apenas 0,4 unidades de pH. Desta maneira, em pH menos ácidos, como é o caso do utilizado no presente trabalho (pH 5,2), a concentração de ácido acético na forma não dissociada é menor, sendo assim menos tóxico para a levedura do que em pHs mais ácidos. Desta forma, em pH 5,6 é esperado que a levedura selvagem seja mais resistente a este inibidor do que observado por Martani et al. (2013) em pH 3,0. De fato, Graves et al. (2006) verificaram que na fermentação de hidrolisado de amido de milho por *S. cerevisiae* em pH 5,5 em diferentes concentrações de ácido acético, apenas era observada queda na produtividade do processo utilizando-se 15 g/L de ácido acético. Desta maneira, evidencia-se a necessidade de se melhorar a tolerância da levedura T18 a este inibidor.

A levedura T18 imobilizada, por sua vez, teve um desempenho melhor para todas as concentrações de ácidos (Figura 4.18B). O processo sem inibidor utilizando a T18 imobilizada durou apenas 4 horas, 3 vezes mais rápido que a levedura livre. Já nos ensaios com ácido acético, a influência deste composto foi amenizada, sendo que toda xilose havia sido consumida em 12h para todas as concentrações do inibidor. Desta maneira, o processo utilizando T18 imobilizada foi até 10 vezes mais rápido, como no caso dos ensaios utilizando 8 g/L de ácido acético, no qual a duração do processo foi de 120h para 12h.

Estes resultados sustentam a hipótese de que a presença do gel de alginato é capaz de proteger as células da ação de inibidores como o ácido acético. Entretanto tal melhora no processo utilizando células imobilizadas poderia também ser atribuída à maior quantidade de células presentes no sistema. Propôs-se então um experimento empregando uma concentração inicial de células livres correspondente à presente nos experimentos com *beads*.

Um experimento em YPX 40 g/L contendo 0,8% de ácido acético foi realizado com 1:1 volume de *beads* para volume de meio e outro com o mesmo meio contendo células livres na mesma concentração. Os perfis obtidos encontram-se na Figura 4.19, na qual observou-se que a levedura encapsulada foi mais eficiente (12h) do que a levedura livre (24h), comprovando assim o efeito de proteção proporcionado pelo gel de alginato de cálcio.

Figura 4.19 – Fermentação de YPX 40 g/L + 8 g/L de ácido acético pela T18 livre e imobilizada. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se a mesma concentração inicial de células (35°C, 150 rpm e pH 5,2).

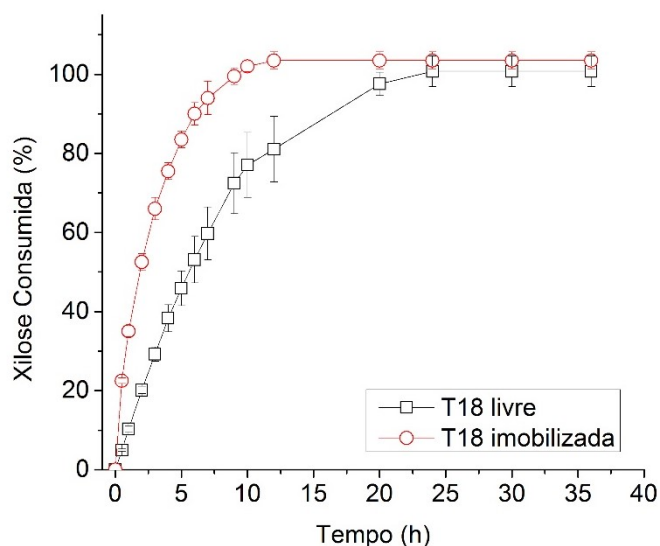


Tabela 4.15 – Parâmetros da fermentação da levedura T18 livre e imobilizada em meio YPX 40 g/L e 8,0 g/L de ácido acético. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se a mesma concentração de células (35°C, 150 rpm e pH 5,2).

	T18 Livre	T18 Imobilizada
Etanol (g/L)	15,3	15,8
Xilose residual (g/L)	3,9	0
Yp/s (g/g)	0,423	0,488
Qp (g/L.h)	0,638	1,317

O efeito protetor do gel de alginato já foi relatado na literatura, sendo utilizado extensamente para a liberação gradativa de medicamentos no intestino humano como insulina e amoxicilina, servindo como protetor em frente às condições adversas do estômago (ácido gástrico) (SILVA et al., 2006; LEE; MOONEY, 2012). Krisch et al. (1997) estudaram o efeito protetor do gel de alginato de cálcio para células de *S. cerevisiae* em relação ao etanol e ao ácido acético. Os autores observaram que as células imobilizadas resistiam por mais tempo na presença dos inibidores do que as células livres, entretanto para os autores o mecanismo de tal fenômeno ainda não era claro. Para Lanza et al. (1995), o gel de alginato de cálcio possui uma rede molecular negativamente carregada que restringe a entrada de compostos negativamente

carregados, mesmo que os poros do gel sejam grandes suficiente (o alginato de cálcio pode ser permeável para moléculas de até 600 kDa).

Keweloh et al. (1989) observaram o efeito protetor do gel no crescimento da bactéria *Escherichia coli* em glicose na presença de fenol. Os autores observaram que 1 g/L de fenol inibia de 3 a 4 vezes mais o crescimento de células livres do que de células imobilizadas. Já para concentração de 2 g/L de fenol, apenas as células imobilizadas foram capazes de crescer. Concluíram ainda que as células imobilizadas possuíam uma concentração mínima inibitória 0,5 g/L maior do que as células livres. De acordo com os autores, é possível supor que as células no exterior do suporte protegem as células do interior, as quais continuam a crescer sem inibição. De acordo com Sun et al 2007, a existência de uma camada de “sacrifício” de células é um mecanismo de proteção contra condições de estresse proporcionado pela técnica de encapsulamento de leveduras em gel. Entretanto, esta hipótese não foi sustentada por Keweloh et al. (1989) pelo fato de não ter sido observada fase lag após a adição de mais fenol ao meio. Os autores sugeriram ainda que uma redução na atividade de água das células imobilizadas é responsável por mudanças fisiológicas que as tornam mais resistentes. De fato, Jirku (1999) estudando *S cerevisiae* imobilizada covalentemente em gel de metacrilato observou que as células imobilizadas eram mais tolerantes a etanol devido a alterações na composição da membrana plasmática, a qual apresentou aumento nas concentrações de ergosterol e ácidos graxos saturados.

A imobilização celular pode ainda interferir no comportamento metabólico das células. Galazzo, Shanks e Bailey (1987) estudando *S. cerevisiae* imobilizada em gel de alginato de cálcio observaram que durante o processo fermentativo o pH citoplasmático das células imobilizadas era menor que o de células livres, provocando um aumento nas atividades das enzimas da via glicolítica e conseqüentemente maior produtividade em etanol.

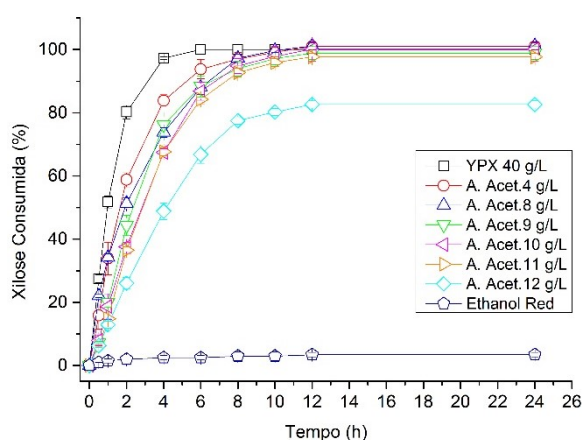
O efeito da limitação do transporte de massa intrapartícula através do gel também pode explicar este efeito protetor para as células devido a existência um gradiente de concentração de inibidor no interior dos *beads*. Sendo assim, a concentração de ácido acético no interior do biocatalisador seria menor que a presente no meio de fermentação. De acordo com Luong (1985) este fenômeno ocorre inevitavelmente em processos onde se possui agregados de células, como no encapsulamento por alginato de cálcio.

As células imobilizadas possuem a vantagem de ser facilmente separadas do meio e reutilizadas. Além disso, devido à elevada DO inicial, ficaria inviável trabalhar-se industrialmente com a mesma quantidade de células livres (DO 100). Observou-se ainda a

presença de xilose residual no ensaio utilizando-se levedura livre, provavelmente causado pela toxidez do meio.

Devido ao excelente desempenho da levedura imobilizada em elevadas concentrações de ácido acético, um teste foi realizado buscando verificar qual a máxima concentração deste inibidor na qual a levedura é capaz de fermentar xilose (Figura 4.20).

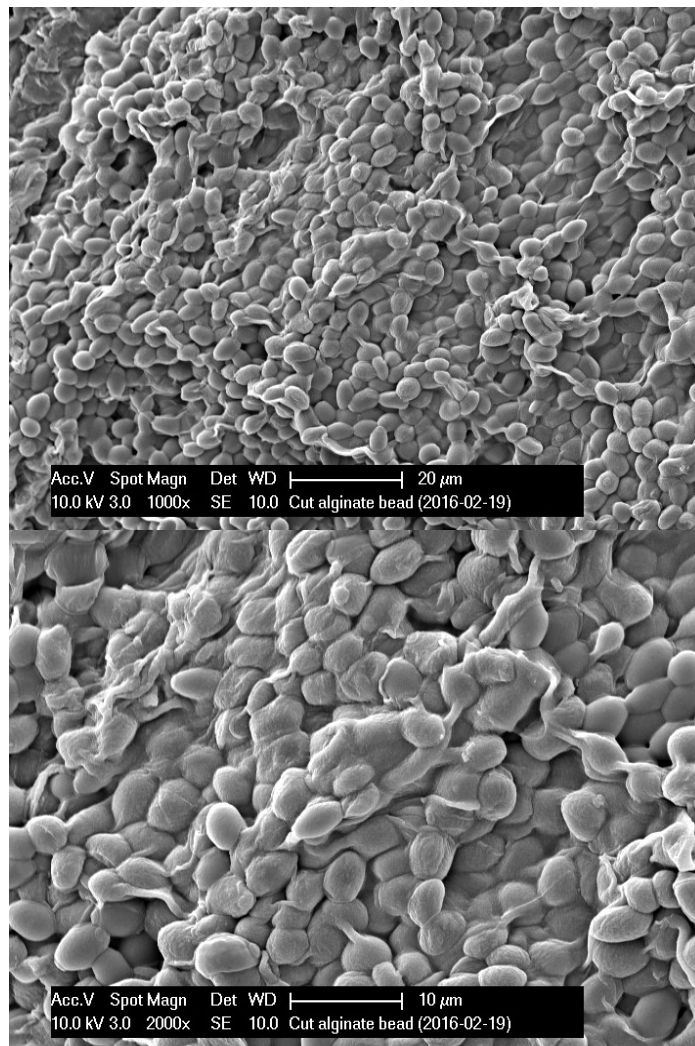
Figura 4.20 – Fermentação de YPX 40 g/L com diferentes concentrações de ácido acético pela levedura T18 imobilizada. Os experimentos foram conduzidos em volume de 8mL utilizando-se a proporção 1:1 v de *beads* e v de meio (35°C, 150 rpm e pH 5,2).



A levedura T18 apresentou um bom desempenho na presença de elevadas concentrações de ácido acético, perdendo desempenho significativamente apenas quando atingiu-se a concentração de 12 g/L de ácido. É interessante destacar as concentrações de 4,0 e 9,0 g/L, as quais são correspondentes às frações líquidas hidrotérmicas bruta e concentrada obtidas para a SHIF.

É interessante ressaltar que a técnica de imobilização utilizada foi eficiente uma vez que não houve desprendimento da levedura imobilizada para o meio de fermentação, sendo mantida a integridade do biocatalisador ao final do processo (Figura 4.21).

Figura 4.21 – Microfotografia eletrônica de varredura (MEV) dos *beads* de alginato de cálcio contendo 10% m/m da levedura T18 após fermentação de xilose com 8 g/L de ácido acético ampliados 1000 vezes (A) e ampliados 2000 vezes (B)



4.4.2. Reciclos de células imobilizadas de T18 em meio sintético

Após comprovar-se a capacidade da levedura encapsulada de fermentar na presença de ácido acético, realizou-se ensaios de fermentação de xilose em batelada repetida na presença de diferentes concentrações do inibidor. Após o final de cada ciclo, as células imobilizadas eram separadas e um novo meio de fermentação era adicionado. Foram conduzidos até 10 ciclos uma vez que retirava-se alíquotas de *beads* para quantificação de viabilidade celular entre os ensaios e após 10 ciclos mais de 10% da massa inicial de *beads* havia sido retirada. O acompanhamento dos reciclos realizados pode ser observado na Figura 4.22.

A levedura foi capaz de realizar 10 ciclos com o mesmo desempenho em meio sintético livre de ácido acético (Figura 4.22A), apresentando uma produção de etanol de 17 g/L e um rendimento em torno de 0,44 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$ em todos os ciclos, sem a produção de subprodutos como xilitol. De fato, o tempo do processo melhorou de 4 para 3 horas devido à adaptação da levedura ao meio e a viabilidade da levedura manteve-se constante (Figura 4.23A), mostrando seu potencial para ser utilizada no processo contínuo.

Para as concentrações de 4 g/L e 8 g/L de ácido acético, foi possível realizar 10 reciclos sem perda significativa da produtividade (Figura 4.22B e 4.22C), com rendimentos médios de 0,46 e 0,45 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$, respectivamente. Entretanto, para as concentrações mais elevadas (9, 10, 11 e 12 g/L) foram possíveis apenas 6 reciclos com o mesmo perfil. A partir do 7º reciclo, o tempo de processo começou a aumentar devido à queda de viabilidade celular, como podemos observar nas Figura 4.22 e 4.23 (D, E e F), porém é interessante ressaltar que toda xilose consumida foi utilizada para a produção de etanol, não havendo interferência no rendimento do processo.

Verificou-se ainda que, como esperado, a produtividade diminui mais rapidamente de acordo com o aumento da concentração de ácido acético (Figura 4.24). Observa-se ainda que houve um acúmulo de etanol entre os reciclos, indicando que a T18 foi capaz de fermentar xilose na presença de uma concentração inicial de até 6 g/L de etanol, o qual é um conhecido inibidor do metabolismo microbiano.

Figura 4.22 – Acompanhamento dos reciclos da levedura T18 imobilizada em meio YPX 40 g/L com diferentes concentrações de ácido acético: A- 0 g/L; B-4 g/L; C-8 g/L; D- 9g/L; E-10 g/L; F-11 g/L (35°C, 150 rpm e pH 5,2).

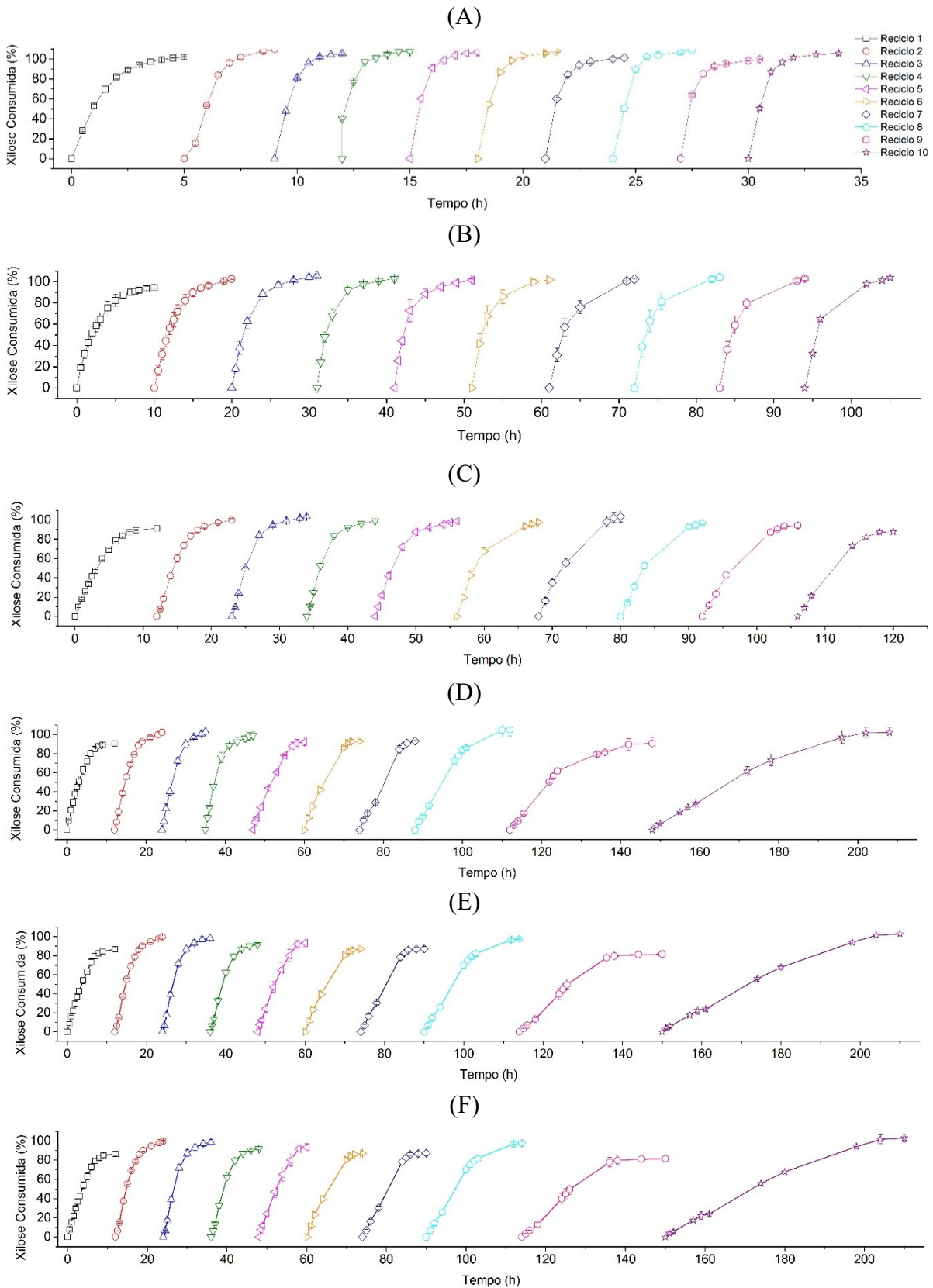


Figura 4.23 – Viabilidade da levedura T18 durante os reciclos em meio YPX 40 g/L em diferentes concentrações de ácido acético: A- 0 g/L; B-4 g/L; C-8 g/L; D-9 g/L; E-10 g/L; F-11g/L (35°C, 150 rpm e pH 5,2).

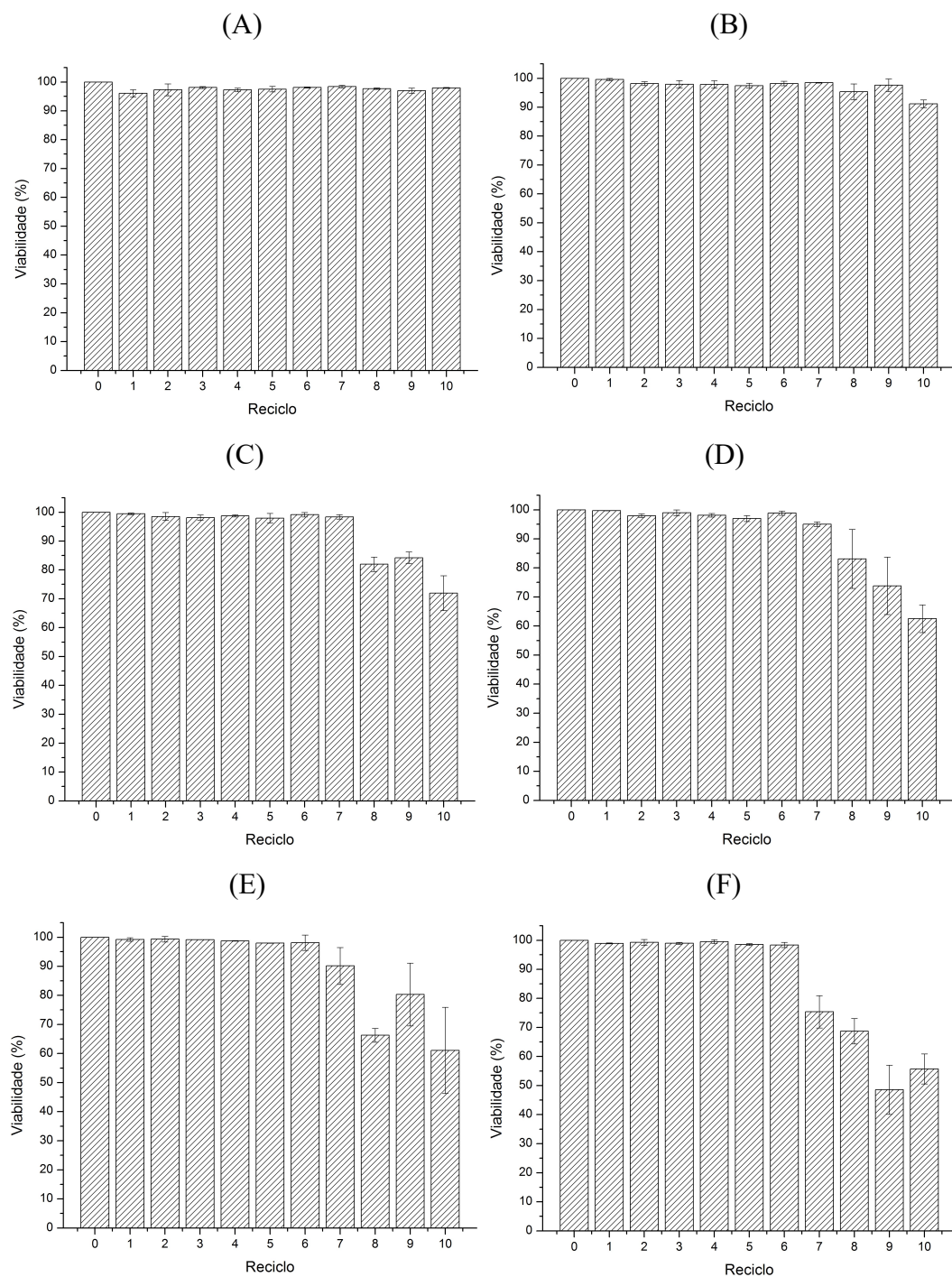
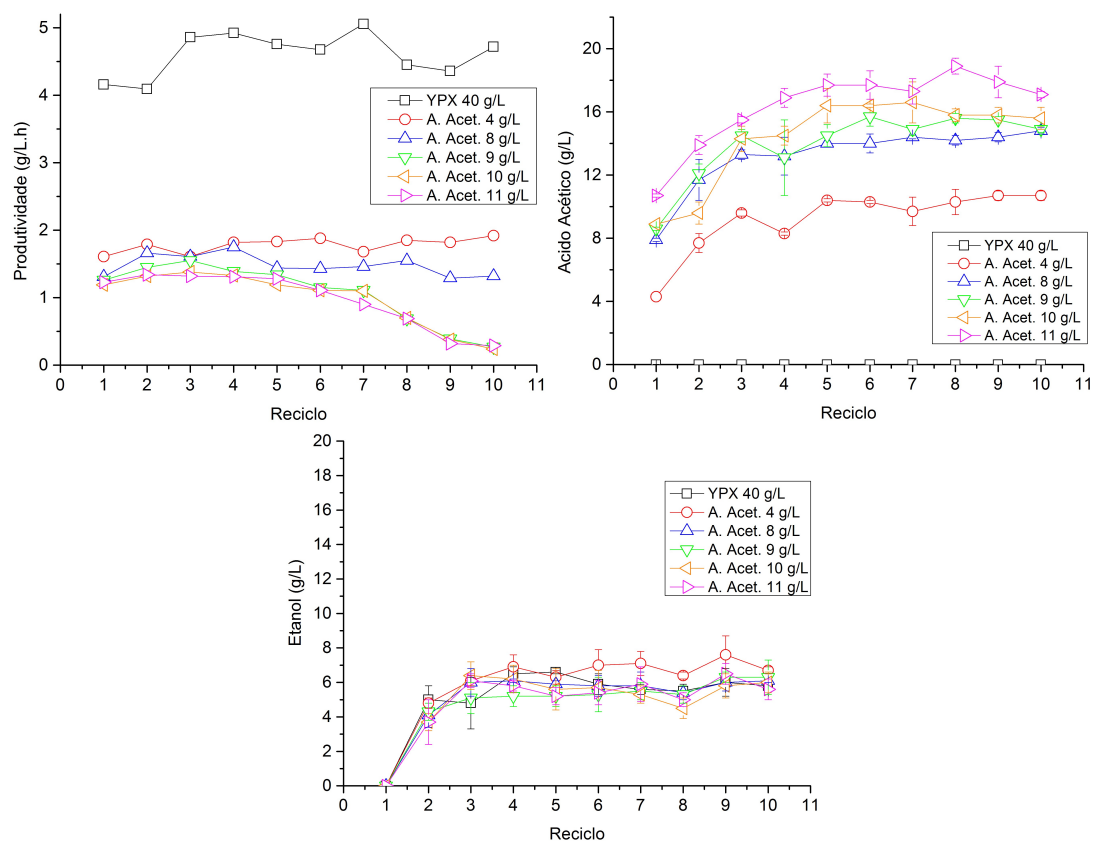


Figura 4.24 – Produtividade, acúmulo de ácido acético e acúmulo de etanol nos reciclos em meio YPX 40g/L e diferentes concentrações de ácido acético. Os experimentos foram conduzidos em volume de 8mL utilizando-se a proporção 1:1 v de beads e v de meio (35°C, 150 rpm e pH 5,2).



Observou-se acúmulo de ácido acético entre os reciclos (Figura 4.24), chegando próximo a 20 g/L do inibidor no experimento alimentado com 11 g/L de ácido acético, mostrando novamente que a levedura foi capaz de fermentar em elevadas concentrações do inibidor (ordem de 20 g/L). É importante ressaltar que em todos os reciclos o pH final estava em 5,0.

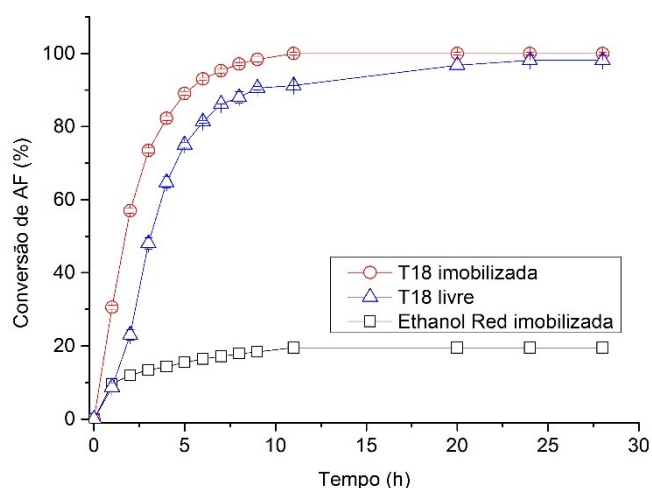
4.4.3. Perfil da levedura T18 em hidrolisado hemicelulósico rico em xilose

Uma vez verificado o bom desempenho da levedura nos reciclos em meio sintético, iniciou-se então experimentos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. O hidrolisado utilizado nesta etapa do trabalho foi gentilmente cedido pelas Indústrias Praj

(Índia) e sua composição consistia em 21,4 g/L de glicose, 92,8 g/L de xilose, 7,8 g/L de arabinose, 4,7 g/L de manose, 7,6 g/L de ácido acético, 0,29 g/L de furfural e 0,67 g/L de hidroximetilfurfural. O hidrolisado foi suplementado com ureia 2 g/L. É importante ainda ressaltar que o hidrolisado utilizado nesta etapa possui um elevado teor de furfural e hidroximetilfurfural quando comparado com o hidrolisado obtido pelo tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio utilizando-se T18 livre e imobilizada foram realizados de forma que se obtivesse a mesma concentração inicial de células e a mesma composição de meio, assim sendo, a diluição proporcionada pela adição dos beads foi corrigida com água ultrapura no caso do experimento com células livres. A levedura T18 foi capaz de assimilar completamente os açúcares fermentescíveis (AF) presentes no hidrolisado hemicelulósico oferecido, exceto arabinose, a qual é uma pentose e, assim como a xilose, *S. cerevisiae* não a consome naturalmente. Assim como esperado, a levedura Ethanol Red utilizada como controle negativo consumiu apenas a fração correspondente à glicose e manose do hidrolisado, açúcares os quais são naturalmente fermentados pela *S. cerevisiae* (Figura 4.25).

Figura 4.25 – Acompanhamento da conversão de açúcares fermentescíveis (AF) de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela levedura T18 livre e imobilizada (35°C, 150 rpm e pH 5,2). A levedura Ethanol Red foi utilizada como controle negativo.



A presença dos *beads* mostrou-se mais uma vez vantajosa para o processo, sendo a performance da levedura imobilizada melhor do que a levedura livre, a qual apresentou uma pequena fase lag no processo. A levedura imobilizada apresentou um rendimento de 0,47

$g_{\text{etanol}}/g_{\text{AF}}$ (28 g/L) enquanto para a levedura livre este valor foi de 0,40 $g_{\text{etanol}}/g_{\text{AF}}$ (24g/L). Entretanto a diferença observada entre a T18 livre e imobilizada foi menor do que quando em meio sintético, provavelmente devido à influência dos demais inibidores do metabolismo microbiano no hidrolisado, como furfural e hidroximetil-furfural, assim como o sinergismo entre eles.

Ao final no processo, a viabilidade da T18 imobilizada manteve-se inalterada (99,6%), enquanto as células livres apenas 2% permaneciam viáveis. Desta maneira, o emprego da T18 imobilizada para a fermentação do hidrolisado se mostra vantajoso uma vez que a levedura imobilizada, além de mais rápida, pode ainda ser reutilizada.

4.4.4. Reciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Após verificar-se a capacidade da levedura de fermentar hidrolisado com alto teor de inibidores, reciclos utilizando T18 imobilizada foram realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Após o final de um ciclo, o meio era retirado e substituído por novo meio, sem lavagem das células para evitar-se a geração de mais um resíduo no processo (água de lavagem). Os perfis dos reciclos estão apresentados na Figura 4.26, na qual observa-se que a levedura foi capaz de realizar 3 ciclos com o mesmo desempenho, passando a diminuir a produtividade a partir do quarto reciclo, assim como sua viabilidade (Figura 4.27 e Tabela 4.16).

Figura 4.26 – Acompanhamento da conversão dos açúcares fermentescíveis (AF) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) pela levedura T18 imobilizada (35°C, 150 rpm e pH 5,2).

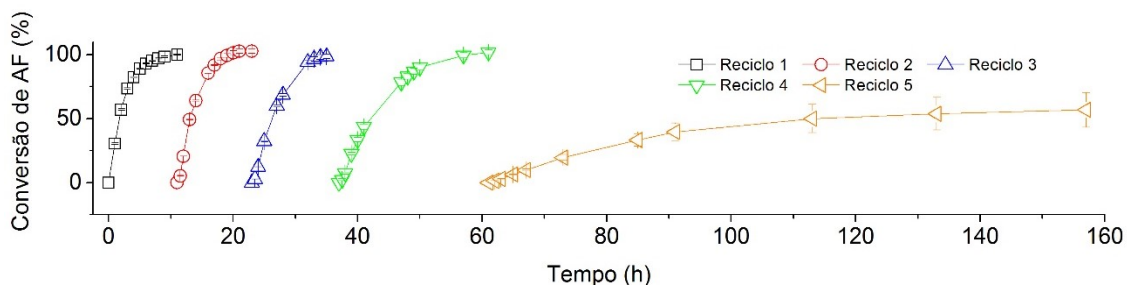


Figura 4.27 – Viabilidade celular da T18 imobilizada ao final dos ciclos realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

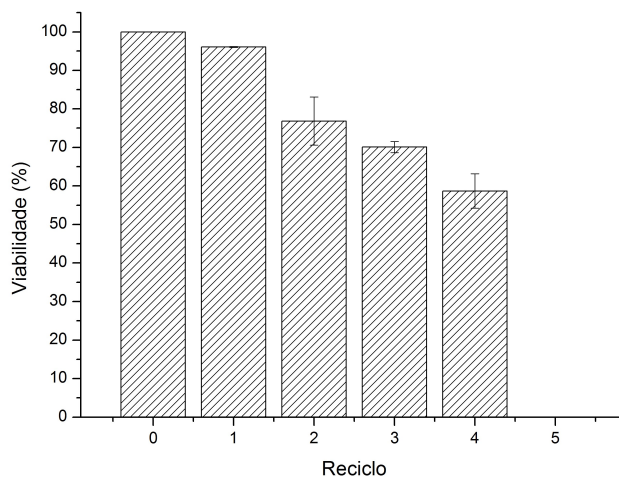


Tabela 4.16 – Parâmetros dos ciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) pela levedura T18 imobilizada em alginato e cálcio (35°, 150 rpm e pH 5,2).

Reciclo	1	2	3	4	5
Etanol (g/L)	28,0	28,6	30,4	28,9	14,1
Xilitol (g/L)	0	0	0	0	0
$Y_{P/S}$ (g _{etanol} /g _{AF})	0,471	0,481	0,49	0,486	0,414
Qp (g/L.h)	2,33	2,38	2,50	1,20	0,15
Xilose residual (g/L)	0	0	0	0	25,4
pH final	5,01	4,89	4,98	5,00	4,98

O rendimento e a produtividade observados nos primeiros 3 ciclos foram satisfatórios. De fato, observou-se uma melhoria na produtividade de etanol do processo, indicando possível adaptação da levedura ao hidrolisado utilizado uma vez que houve melhoria na produtividade de etanol apesar da viabilidade celular estar diminuindo. Porém, após o terceiro ciclo, a produtividade diminuiu significativamente, tornando a continuidade do processo inviável no quinto ciclo, no qual observou-se 25,4 g/L de xilose residual.

A condução de processos fermentativos empregando-se o reciclo de células oferece diversas vantagens, principalmente em casos onde o microrganismo sofre inibição pelo

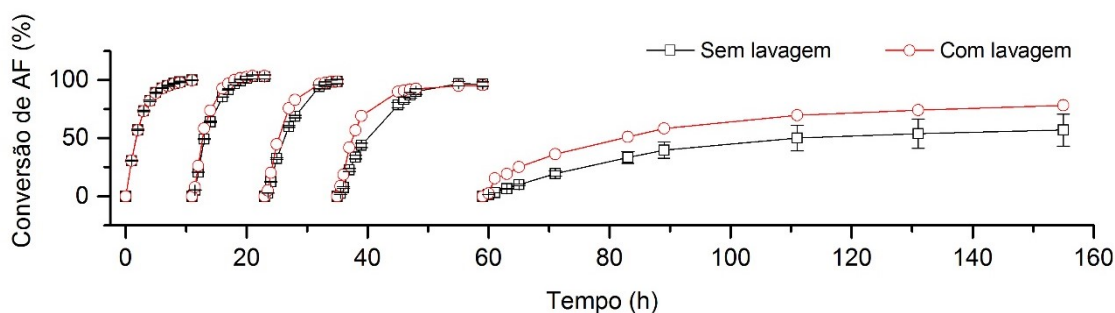
produto, como é o caso do etanol (CHANDEL et al., 2011b). O reciclo de células (livres e imobilizadas) em meio rico em glicose é amplamente estudado na literatura. Riansa-ngawong et al. (2012), observaram que em meio sintético YM, células imobilizadas de *C. shehatae* eram capazes de realizar 4 reciclos sem perder desempenho. Chen et al. (2013), utilizando células de *S. cerevisiae* imobilizadas em matriz fibrosa, atingiram resultados promissores em meio sintético rico em glicose e livre de inibidores, operando 22 reciclos consecutivos sem queda de produtividade. Já em hidrolisado celulósico, Silva et al. (2016) estudaram o reciclo de células de *S. cerevisiae* na fermentação de hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar e realizaram 5 reciclos sem perda de produtividade. Entretanto, os autores realizaram a lavagem das células entre os ciclos e o hidrolisado utilizado não possuía hidroximetilfurfural e furfural em sua composição.

A condução de processos utilizando reciclos de células para a produção de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico, por sua vez, é pouco mencionada na literatura. Grande parte dos estudos utilizam ciclos consecutivos em hidrolisado hemicelulósico visando a adaptação evolutiva da levedura ao hidrolisado. Em estudos utilizando reciclos na fração hemicelulósica, Sanda et al. (2011) utilizando células livres de *S. cerevisiae* geneticamente modificada, realizaram reciclos em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz contendo 12 g/L de glicose, 10 g/L de xilose e baixas concentrações de acetato e formato como inibidores. Os autores atingiram 5 ciclos fermentativos de 24h, a partir dos quais a produtividade começou a cair. Porém, além de trabalharem em baixa concentração de açúcares disponíveis, a cepa desenvolvida apresentou elevadas concentrações de xilitol. Milessi (2012) utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* imobilizada em gel de alginato de cálcio, realizou bateladas repetidas em biorreator tipo cesta utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar como substrato. A levedura realizou 2 ciclos fermentativos com desempenho semelhante, porém a produtividade caiu significativamente a partir do terceiro ciclo. Além disso, por ser uma levedura naturalmente fermentadora de pentose, apesar da alta concentração celular no reator, cada ciclo fermentativo tinha a duração de 48h. Desta maneira, os resultados obtidos nos reciclos em hidrolisado hemicelulósico do presente trabalho são promissores por não apresentar produção de subprodutos e pela rápida velocidade de fermentação (12 horas por ciclo).

Objetivando-se aumentar a viabilidade da levedura no processo para atingir-se um maior número de reciclos, um experimento foi realizado lavando-se os beads entre os reciclos com ureia 2 g/L pH 5,2, garantindo-se assim que o pH inicial do processo fosse 5,2 e diminuindo a concentração de etanol e inibidores acumulados no início de cada ciclo.

Verificou-se que o desempenho da levedura foi melhor quando lavada (Figura 4.28), sendo capaz de realizar 4 ciclos de fermentação eficientemente.

Figura 4.28 – Perfis dos ciclos da levedura T18 imobilizada utilizando-se hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) com e sem lavagem das células entre os ciclos (35°C, 150 rpm e pH 5,2).



Os rendimentos e produtividades obtidos realizando-se a lavagem entre ciclos foram semelhantes ao processo sem lavagem nos primeiros 3 ciclos. Os 4º e 5º ciclos, por sua vez, apresentaram melhoria na produtividade em etanol (2,33 e 0,18 g/L.h). Entretanto, não mais que 4 reciclos foram possíveis, com uma xilose residual de 11,3 g/L e viabilidade celular de 0% após 96h do quinto ciclo. Além disso, o pH final observado foi semelhante aos obtidos nos experimentos sem lavagem (próximo de 5,0), decidindo-se assim dar continuidade aos experimentos sem realizar-se a lavagem das células, pois acredita-se que outras abordagens para melhorar viabilidade celular são possíveis (como a adaptação da levedura aos inibidores) e mais adequadas do que a lavagem, por não contribuir para a geração de resíduos.

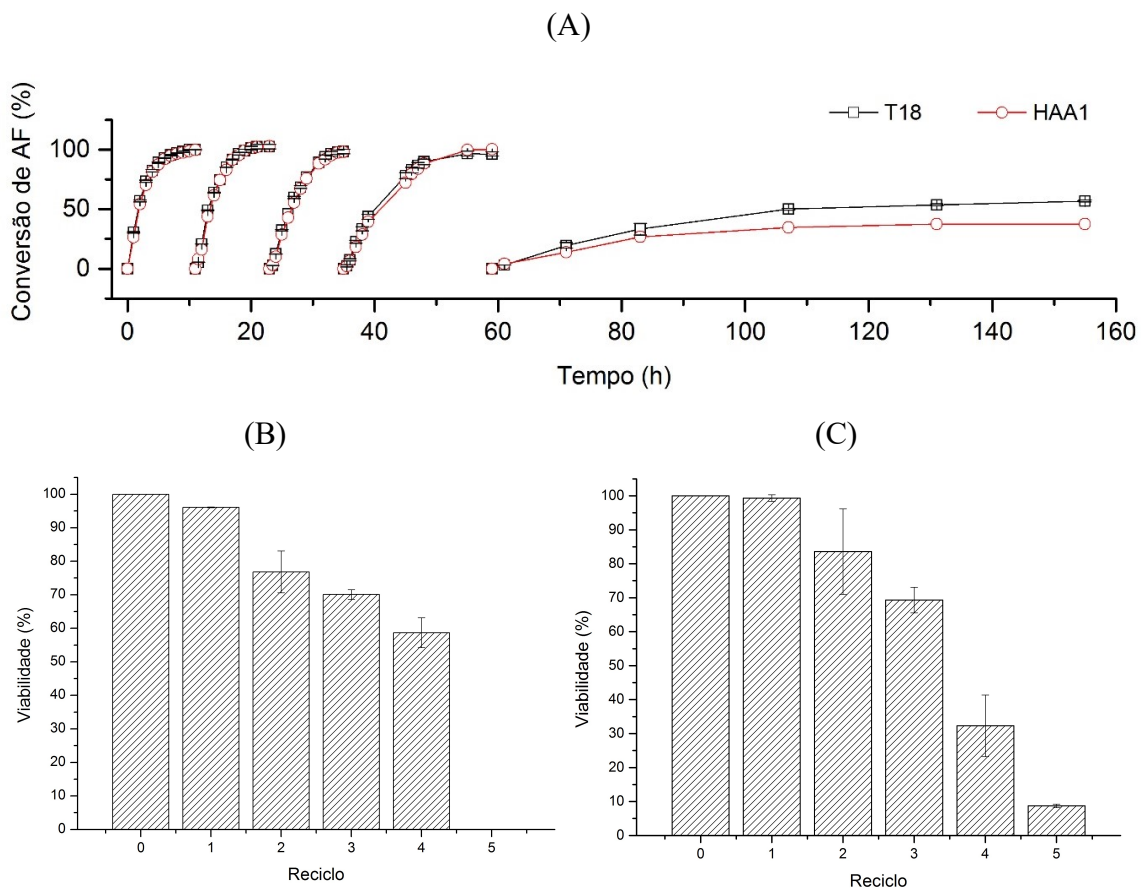
4.4.5. Ensaios utilizando a levedura T18-HAA1 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar

Uma vez que a lavagem dos *beads* entre os reciclos não proporcionou uma melhoria significativa na viabilidade celular e conseqüentemente no processo, decidiu-se testar uma levedura com maior tolerância ao ácido acético. Paralelamente aos estudos desenvolvidos neste trabalho, o grupo do Prof. Johan Thevelein identificou o gene HAA1 como associado à tolerância a este inibidor. Assim, duas cópias do alelo superior contendo uma mutação no gene HAA1 para melhorar a resistência da levedura ao ácido foram inseridos na levedura GSE16-T18. A T18 possui naturalmente o gene HAA1, entretanto com a inserção do gene

com mutação esperava-se melhorar a tolerância da levedura ao ácido. De fato, tal melhoria foi observada e a nova cepa foi nomeada como T18-HAA1 (Meijnen et al., 2016).

Reciclos utilizando a levedura T18-HAA1 foram realizados com o objetivo de aumentar o número de ciclos no qual a levedura apresentava bom desempenho. O perfil das bateladas repetidas realizadas assim como a viabilidade celular durante o processo encontra-se na Figura 4.29.

Figura 4.29 – Acompanhamento dos reciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com uréia (2 g/L) (35°C, 150 rpm e pH 5,2) pelas leveduras T18 e T18-HAA1 imobilizadas. Onde (A) consumo de açúcares no processo; (B) viabilidade da levedura T18 e (C) viabilidade da levedura T18-HAA1



Observa-se que apesar da T18-HAA1 apresentar maior tolerância ao ácido acético, e consequentemente manter uma maior viabilidade entre os ciclos, não houve melhoria no seu emprego em hidrolisado hemicelulósico quando comparada à T18. A produtividade e rendimento em etanol observados nos 3 primeiros ciclos, foram os mesmos que os obtidos para a levedura T18 (2,3 g/L.h e 0,47 g_{etanol}/g_{xilose}, respectivamente), os quais diminuíram

consideravelmente após o quarto ciclo, assim como para a levedura sem a mutação no gene HAA1. De fato, no último ciclo, a levedura T18 apresentou melhor desempenho do que a T18-HAA1, o que pode ser atribuído aos demais inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico assim como ao sinergismo entre eles e o ácido acético, ou ainda à possível queda de tolerância aos inibidores associada à expressão do gene com mutação. O pH final entre ciclos permaneceu em torno de 5,0 em todos os ensaios.

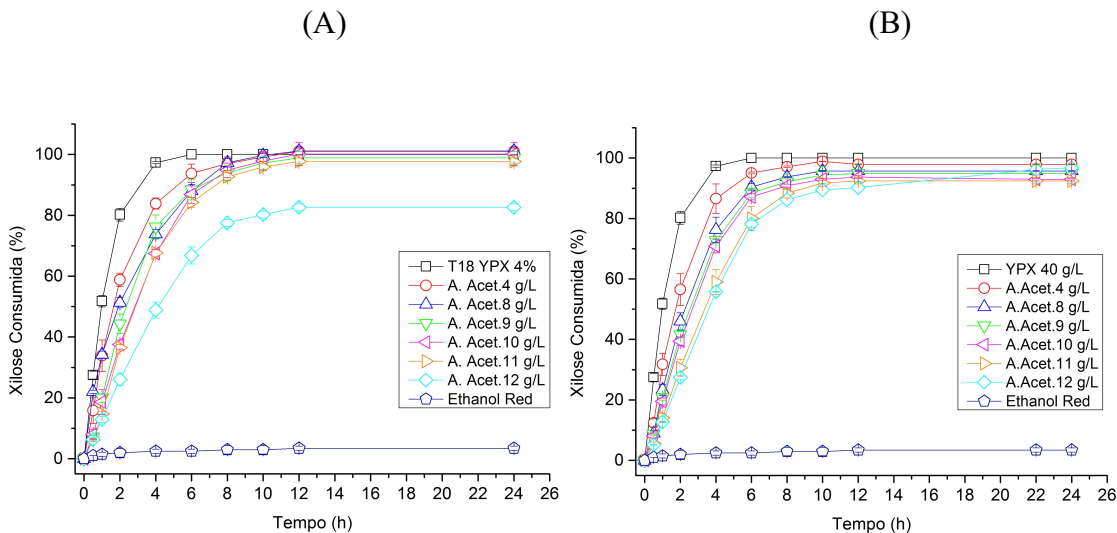
Uma alternativa para superar a toxidez do hidrolisado é realizar a adaptação evolutiva da levedura ao hidrolisado hemicelulósico, a partir da qual é possível identificar-se os genes associados à tolerância aos inibidores e por meio de técnicas de análise poligênica inseri-los na levedura T18-HAA1, melhorando seu desempenho no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, a adaptação evolutiva é uma técnica que requer inúmeras gerações para se alcançar as características evolutivas de interesse, necessitando de um período consideravelmente longo.

O hidrolisado hemicelulósico proveniente do pré-tratamento hidrotérmico a ser utilizado no processo SHIF é menos tóxico que o hidrolisado utilizado nesta etapa do processo pois não possui concentrações significativas de furfural e hidroximetilfurfural, apesar da elevada concentração de ácido acético (9 g/L). De forma que decidiu-se dar continuidade ao trabalho utilizando a levedura T18-HAA1 uma vez que ela possui uma elevada tolerância ao ácido acético. Entretanto, antes de realizar ensaios contínuos de produção de etanol 2G, foram realizados ensaios comparativos utilizando biocatalisador contendo a levedura T18 co-imobilizada com a enzima XI visando analisar se a presença da enzima melhora o processo uma vez que pode aumentar a taxa de consumo de xilose, gerando xilulose simultaneamente, a qual é assimilada por *S. cerevisiae* por via natural.

4.4.6 Ensaios utilizando XI co-imobilizada com a T18

Ensaios fermentativos contendo a enzima xilose isomerase (XI) co-imobilizada com a levedura T18 foram realizados objetivando analisar se a enzima iria intensificar a fermentação por fornecer diretamente xilulose para a levedura, melhorando o desempenho do processo. Os *beads* foram confeccionados de acordo com Silva et al. (2012) e a performance da enzima co-imobilizada com a levedura foi analisada em diferentes concentrações de ácido acético, os quais encontram-se apresentados na Figura 4.30 e comparados com os obtidos para os *beads* sem enzima.

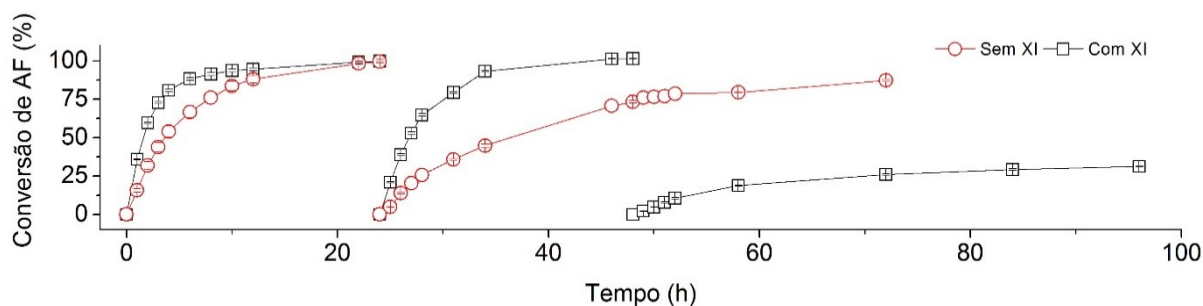
Figura 4.30 – Fermentação de YPX 40 g/L com diferentes concentrações de ácido acético pela da levedura T18 immobilizada onde (A) corresponde aos *beads* contendo apenas T18 e (B) apresenta os *beads* com T18 e XI co-immobilizadas (35°C, 150 rpm e pH 5,2).



A presença da enzima xilose isomerase nos *beads* melhorou o desempenho da levedura, a qual foi capaz de fermentar eficientemente na concentração de 12 g/L de ácido acético, o que antes não era observado apenas com a levedura nos *beads*. Observou-se um pH final de 5,15 nos ensaios utilizando XI nos *beads*, enquanto no ensaio apenas com alginato o pH final era 5,0. Em todos os ensaios não observou-se produção de xilitol. Tais resultados sugeriram que a presença da enzima era benéfica para o processo. Realizou-se assim os reciclos com os *beads* contendo T18 e XI utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Para esta etapa, utilizou-se um hidrolisado hemicelulósico com maior carga de inibidores doado pelas Indústrias Praj (Índia), no qual a T18 foi capaz de realizar apenas um ciclo eficientemente, perdendo consideravelmente desempenho a partir do segundo ciclo (Figura 4.31) enquanto a melhoria no desempenho da levedura com a presença da enzima foi notável.

Figura 4.31 - Reciclos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com elevado teor inibidores suplementado com uréia (2 g/L) utilizando *beads* contendo a levedura T18 pura e co-imobilizada com XI (35°C, 150 rpm e pH 5,2).



A presença da enzima GI na composição dos *beads* beneficiou o processo quando em meios de grande estresse celular, como no caso do meio sintético contendo 12 g/L de ácido acético e no hidrolisado hemicelulósico com alta toxicidade. Já em condições menos extremas, o perfil observado com a enzima foi o mesmo quando apenas a levedura estava presente no *bead*. Tal fato sugere duas hipóteses: a presença da enzima imobilizada no *bead* auxilia no processo devido à presença da quitosana, suporte de imobilização da enzima, a qual juntamente com o alginato de cálcio age como uma barreira para a levedura; ou o transporte e metabolismo de xilulose e xilose sofrem diferentes efeitos pela presença dos inibidores.

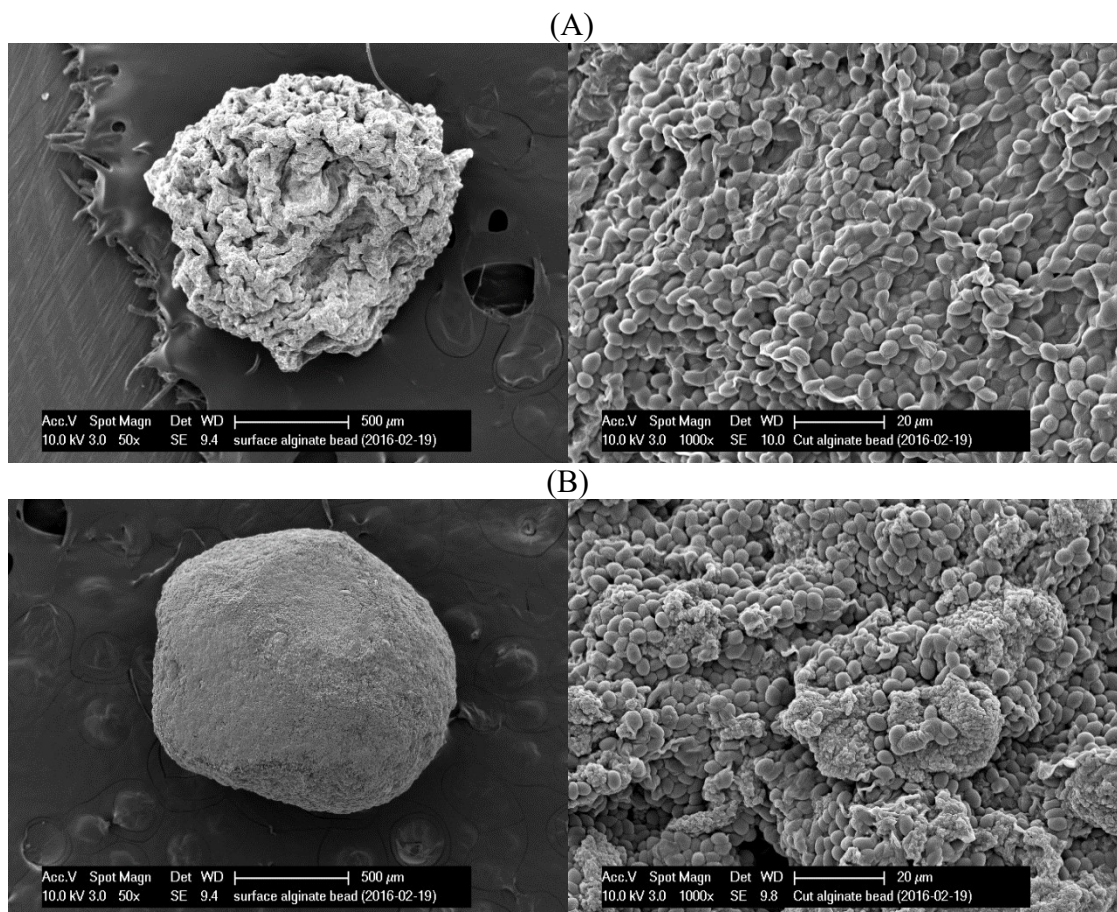
O transporte de xilulose em *S. cerevisiae* ainda não é muito claro, porém acredita-se que utilizem transportadores similares à xilose. De acordo com Hohenschuh et al. (2015) o transporte de xilulose é realizado pelas proteínas da família HTX (mesmas das hexoses) com o auxílio de outros fatores ainda não elucidados.

A capacidade protetora da quitosana como suporte de imobilização, por sua vez, é descrita anteriormente na literatura. De fato, sua ação conjunta com o alginato de cálcio já foi relatada. Nualkaekul et al. (2012) utilizaram esferas de alginato de cálcio revestidas de quitosana para encapsular *Lactobacillus plantarum* e verificaram proteção efetiva contra as características estressantes do suco de romã, visando atribuir propriedades probióticas ao produto alimentício industrializado. Kamalian et al. (2014) estudaram o efeito do alginato de cálcio e da quitosana na viabilidade de células imobilizadas de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 em fluido gastrointestinal sintético, visando a proteção dos probióticos para garantir sua chegada no intestino. O encapsulamento das células com alginato revestido de quitosana foi mais efetivo na proteção das células do que quando imobilizadas apenas em

alginato. Após serem submetidas à meio sintético simulando o ambiente estomacal por 120 min, o encapsulamento apenas em alginato foi capaz de manter 5,81 log ufc/mL de células íntegras, enquanto alginato e quitosana juntos atingiram 7,93 log ufc/mL.

Foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos *beads* contendo apenas alginato e T18 e dos *beads* contendo a XI imobilizada em quitosana incorporada em sua composição (Figura 4.32). A presença da quitosana no gel de encapsulamento realmente parece conceder maior estabilidade estrutural ao *bead*, sustentando a hipótese de maior proteção à T18 em condições extremas devido à presença da quitosana.

Figura 4.32 - Microfotografia eletrônica de varredura (MEV) dos *beads* de alginato de cálcio contendo a levedura T18 imobilizada (A) e co-imobilizada com a enzima XI (B).



4.5. Experimentos contínuos de produção de etanol utilizando *S. cerevisiae* geneticamente modificada

Os excelentes resultados obtidos com a imobilização da levedura recombinante em termos de aumento da tolerância a inibidores e viabilidade de operação com reciclo de células, motivam a exploração desse biocatalisador em outros modos de operação. O reator de leito fixo, operado continuamente, é um candidato natural para a continuidade dos estudos com a T18-HAA1 imobilizada em alginato de cálcio. Esse tipo de reator permite a operação em alta carga de biocatalisador, com alta produtividade em etanol e em reduzido volume reacional (TROVATI; GIORDANO; GIORDANO, 2009). Apesar das vantagens do reator de leito fixo, há poucos estudos na literatura mencionando o emprego do mesmo na produção de etanol.

Desta maneira, experimentos contínuos em reator de leito fixo para o estudo da produção de etanol foram realizados utilizando a levedura T18-HAA1 imobilizada em gel de alginato de cálcio. O sistema foi montado conforme descrito no Item 3.7.5 e o processo foi inicialmente operado com meio de alimentação sintético descrito no Item 3.5 em pH 5,2, contendo diferentes concentrações de xilose, para avaliação do desempenho do sistema na ausência dos inibidores presentes no hidrolisado. O fluxo de alimentação foi ajustado de acordo com a concentração de xilose na alimentação para manutenção de conversão mínima em 90%. As principais condições de operação encontram-se detalhadas na Tabela 4.17.

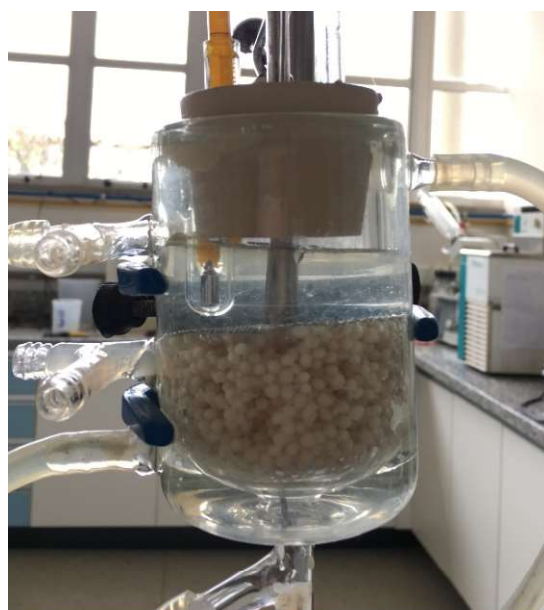
Tabela 4.17 – Características do processo contínuo de produção de etanol por células imobilizadas de T18-HAA1 a partir de xilose

Biocatalizador	Ca-alginato 1% + 10% m/m T18-HAA1
pH inicial do meio de alimentação	5,2
Temperatura inicial	35°C
Massa de biocatalisador no reator	50 g
Volume útil do reator	100 mL
Concentração inicial de células no reator	50 g/L
Tempo de residência	10,9 h
Xilose na alimentação	120 g/L
Viabilidade celular inicial	~100%

Apesar da presença da quitosana utilizada na imobilização da XI ter potencializado a proteção da levedura conferida pelo alginato, esse efeito foi observado principalmente em meios contendo compostos causadores estresse celular. Para os experimentos de reciclo realizados com meio sintético, a técnica de imobilização em gel de alginato de cálcio 1% se mostrou eficiente e resultados promissores foram observados para a concentração de 9 g/L de ácido acético (Figura 4.22).

O reator encamisado com volume útil de 100 mL possuía uma tela de retenção para conter as células imobilizadas e foi preenchido de forma que a proporção entre os *beads* e o meio fosse de $1V_{\text{beads}}/1V_{\text{meio}}$ (Figura 4.33). Os resultados obtidos no primeiro experimento contínuo, realizado com 116 g/L de xilose na alimentação, são apresentados na Tabela 4.18 e na Figura 4.34.

Figura 4.33 – Detalhe do reator utilizado no processo contínuo de produção de etanol preenchido com os *beads* na proporção $1V_{\text{beads}}/1V_{\text{meio}}$.



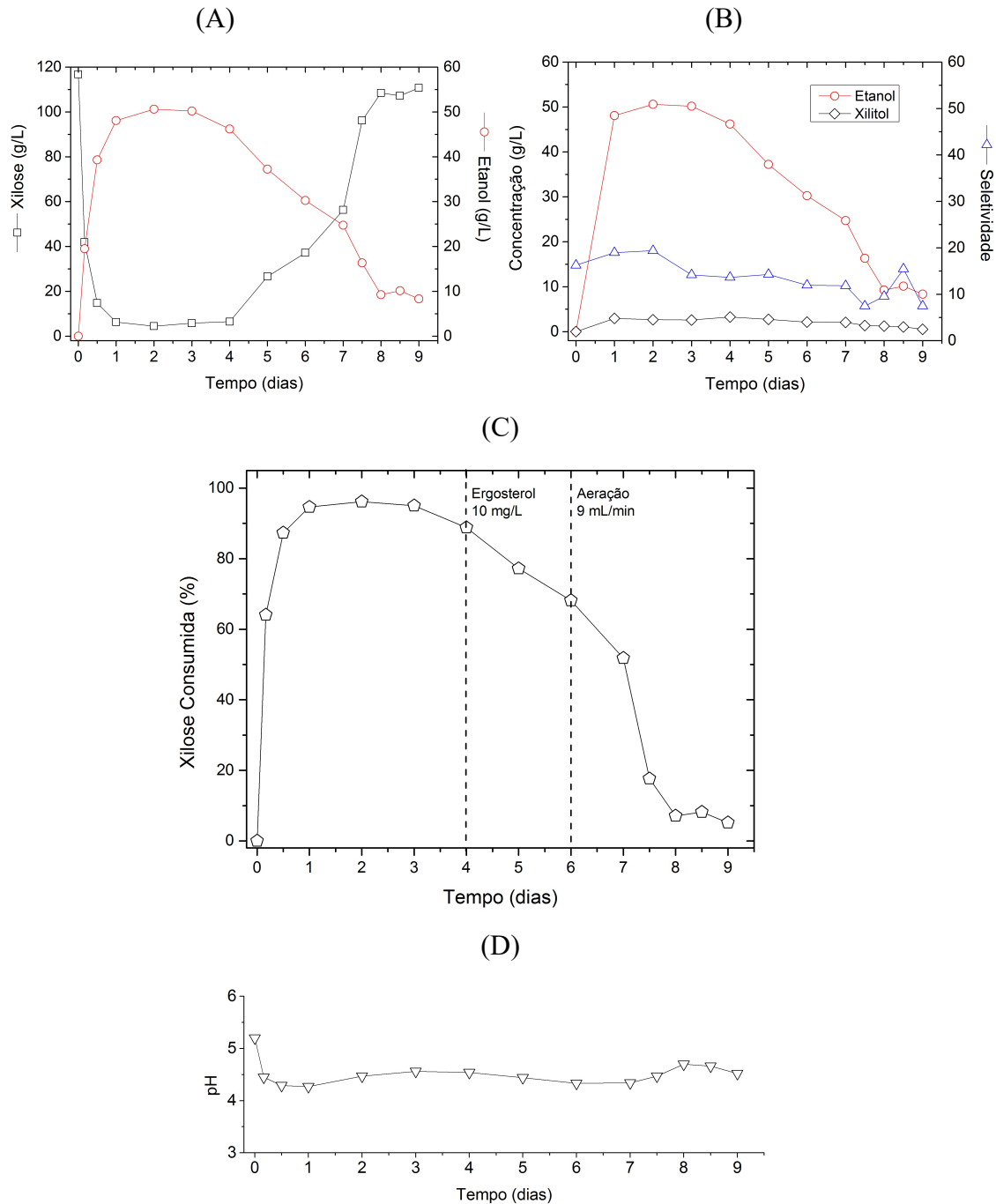
O sistema atingiu o estado estacionário em 24h e permaneceu estável por 5,5 tempos de residência, nos quais as concentrações de xilose e etanol no efluente se mantiveram próximas a 5 g/L e 50 g/L, respectivamente, com uma conversão de xilose de 95% e rendimento de $0,45 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$. Entretanto, após 96h de operação observou-se redução no consumo de xilose e da produção de etanol, que poderia estar ligada à queda da viabilidade celular.

Tabela 4.18 – Resultados do experimento contínuo em reator de leito fixo para produção de etanol a partir de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (35°C, pH 5,2, $\tau = 10,9\text{h}$, $1_{V_{\text{beads}}}/1_{V_{\text{meio}}}$) com concentração inicial de xilose de 116 g/L

t (dias)	t (h)	Tempo Residência (τ)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Seletividade ($g_{\text{etanol}}/g_{\text{xilitol}}$)	Xilose no efluente (g/L)	$Y_{P/S}$ $g_{\text{etanol}}/g_{\text{xilose}}$	Conversão (%)
0,0	0	0	0,00	0,00		116,75		0,00
0,2	4	0,37	19,50	0,25	78,00	41,93	0,261	64,08
0,5	12	1,10	39,29	2,52	15,59	14,78	0,385	87,34
1,0	24	2,21	48,08	2,96	16,24	6,28	0,435	94,62
1,5	36	3,31	50,60	2,67	18,95	4,47	0,451	96,17
2,0	48	4,41	50,18	2,59	19,37	5,80	0,452	95,03
3,0	72	6,62	46,19	3,26	14,17	6,51	0,419	94,42
4,0	96	8,82	37,23	2,73	13,64	26,60	0,413	77,22
5,0	120	11,03	30,26	2,12	14,27	37,16	0,380	68,17
6,0	144	13,24	24,73	2,07	11,95	56,26	0,409	51,81
6,5	156	14,34	16,33	1,38	11,83	96,15	0,793	17,64
7,0	168	15,44	9,26	1,24	7,47	108,45	1,116	7,11
7,5	180	16,54	10,13	1,06	9,56	107,19	1,060	8,19
8,0	192	17,65	8,34	0,54	15,44	110,71	1,381	5,17

Uma das possíveis causas para a queda de viabilidade é o estabelecimento de condições anaeróbias no reator. No início da operação, o meio reacional encontrava-se com alta concentração de oxigênio dissolvido, pois o carregamento do reator com *beads* foi feito em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas. Depois disso, o reator foi selado e a alimentação contínua iniciada, preenchendo lentamente o reator, misturando-se com o ar e os *beads* presentes. Entretanto, após algum tempo de operação, o oxigênio dissolvido inicialmente presente foi consumido, restando apenas o oxigênio dissolvido no meio de alimentação. Considerando-se a elevada concentração de células nos *beads*, o oxigênio dissolvido no meio é rapidamente esgotado na parte inferior do reator, próxima à entrada da alimentação, de forma que a maior parte do meio reacional se encontra em condição anaeróbia. O aumento gradativo da concentração de xilitol no efluente é um dos indícios da ocorrência de anaerobiose e pode ser explicada pela necessidade de regenerar os cofatores da cadeia metabólica após o esgotamento do oxigênio no reator (MONTAÑO, 2013, SUARÉZ, 2014).

Figura 4.34 – Resultados do experimento contínuo em reator de leito fixo para produção de etanol a partir de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (35°C, pH 5,2, $\tau = 10,9\text{h}$, $1V_{\text{beads}}/1V_{\text{meio}}$) com concentração inicial de xilose de 116 g/L. (A) Concentrações de xilose e etanol; (B) Seletividade e concentrações de etanol e xilitol; (C) Consumo de xilose e (D) pH.



De acordo com Shobayashi et al. (2005), condições de hipoxia (baixa concentração de oxigênio) e elevadas concentrações de etanol provocam baixa concentração de ergosterol nas células de levedura. O ergosterol é um componente essencial para as células de levedura e ajuda a manter a integridade da membrana além de estar relacionado com a tolerância à etanol

(SMITH; CROWLEY; PARKS, 1996). De fato, Andreasen e Stier (1954) observaram que a adição de ergosterol ao meio permitia o crescimento de *S. cerevisiae* em condições anaeróbicas contínuas, enquanto no experimento sem adição de ergosterol as células não eram capazes de crescer.

Desta maneira, decidiu-se adicionar 10 mg/L de ergosterol ao processo (SUAREZ, 2014), na tentativa de recuperar a viabilidade das células e contornar a queda do consumo de xilose. Porém, mesmo após 48h (4 tempos de residência) após o início da alimentação suplementada com ergosterol, não se observou melhoria na conversão de xilose e produção de etanol, os quais continuaram diminuindo (Figura 4.34). Assim sendo, iniciou-se aeração do meio após 144 h de processo numa vazão de ar de 9 mL/min de acordo com o realizado por Montañó (2013), objetivando reverter a limitação de oxigênio e auxiliar no balanço redox dos cofatores. Entretanto a conversão continuou caindo e após 192 h (8 dias) o processo foi interrompido.

As estratégias exploradas para reverter a queda na conversão não foram eficientes. É importante destacar que as estratégias de suplementação com ergosterol e aeração foram testadas com sucesso nos experimentos conduzidos com levedura selvagem (MONTAÑO, 2013, SUAREZ, 2014). Ao final do processo, todas as células imobilizadas estavam mortas, sugerindo que a elevada concentração de etanol alcançada exerceu efeito letal às células quando expostas continuamente por aproximadamente 48 h ao etanol na concentração de aproximadamente 50 g/L. O efeito observado foi irreversível, visto que mesmo com a queda da conversão e, conseqüentemente, exposição das células a concentrações de etanol menores que 25 g/L por 4 tempos de residência, não se observou mudança na velocidade de assimilação de xilose. Por isso, foi descartada a hipótese de inibição por produto como causa da queda na conversão e na produção de etanol, já que a inibição seria atenuada em concentrações mais baixas de etanol.

É importante ressaltar que não houve desprendimento das células para o meio a ponto de permitir quantificar a viabilidade celular durante o processo.

Desta maneira, decidiu-se realizar novos experimentos com menores valores de concentração de xilose na alimentação para se identificar condições de operação que favoreçam a manutenção da viabilidade celular, requisito fundamental para a operação de um processo contínuo com células imobilizadas por longos períodos.

No experimento seguinte (CC2), utilizou-se 40 g/L de xilose na alimentação, concentração na qual resultados satisfatórios foram obtidos anteriormente em sistema de

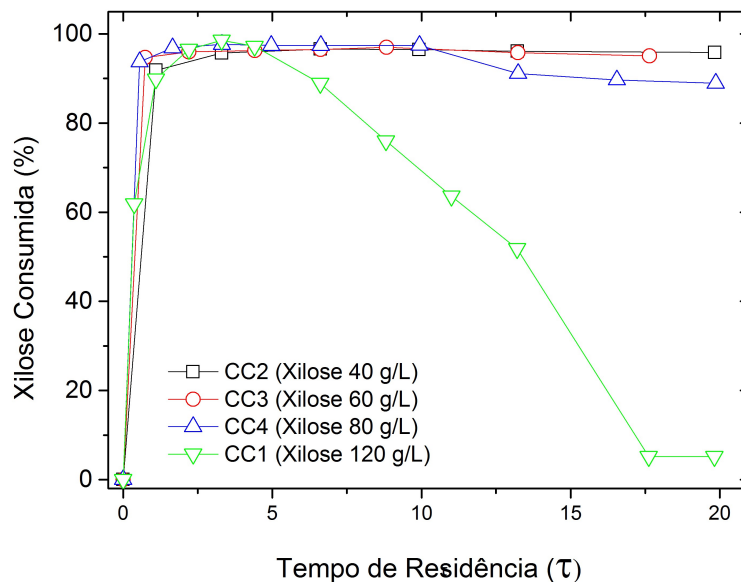
bateladas repetidas. Nos experimentos subsequentes, aumentou-se gradativamente a concentração de xilose para 60 e 80 g/L (CC3 e CC4, respectivamente). As características dos ensaios realizados encontram-se na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 –Características dos processos contínuos de produção de etanol por células imobilizadas de T18-HAA1 (Ca-alginato 1% + 10% m/m T18-HAA1) em reator de leito fixo conduzidos sob diferentes concentrações de xilose na alimentação

Experimento	CC2	CC3	CC4	CC1
Xilose na alimentação	40 g/L	60 g/L	80 g/L	120 g/L
pH inicial do meio de alimentação	5,2	5,2	5,2	5,2
Temperatura inicial	35°C	35°C	35°C	35°C
Massa de biocatalisador no reator	50 g	50 g	50 g	50 g
Volume útil do reator	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Concentração inicial de células no reator	50 g/L	50 g/L	50 g/L	50 g/L
Tempo de residência	3,6 h	5,4 h	7,3 h	10,9 h
Viabilidade celular inicial	~100%	~100%	~100%	~100%

A Figura 4.35 apresenta o acompanhamento de todos os ensaios contínuos realizados em termos de conversão. A levedura apresentou bom desempenho para a concentração de 40 g/L de xilose, assim como esperado, e em concordância com os resultados anteriores obtidos nos experimentos de reciclo de células (Figura 4.22). O sistema entrou em estado estacionário com apenas 4 horas de operação e permaneceu estável por mais de 20 tempos de residência, com uma concentração de etanol no efluente de 17 g/L (Figura 4.35A) e $Y_{P/S}$ de 0,45 g_{etanol}/g_{xilose}. Assim sendo, o processo conduzido com 40 g/L de xilose foi considerado satisfatório, sem ocorrência de queda na conversão e com manutenção do estado estacionário da concentração de etanol. Desta forma, no experimento seguinte, decidiu-se aumentar a concentração de xilose na alimentação para 60 g/L.

Figura 4.35 – Acompanhamento dos processos contínuos de produção de etanol pela levedura T18-HAA1 imobilizada a partir de diferentes concentrações de xilose na alimentação (35°C, pH 5,2, 1V_{beads}/1V_{meio}).



O desempenho do processo alimentado com 60 g/L de xilose, assim como ocorreu com 40 g/L, foi satisfatório. O estado estacionário foi atingido em 5,5 horas e manteve-se estável por 20 tempos de residência, com 95% de conversão de xilose, 26 g/L de etanol (Figura 4.36B) e rendimento de 0,46 g_{etanol}/g_{xilose}.

Aumentando-se a concentração de xilose na alimentação para 80 g/L, o estado estacionário foi alcançado em 24 horas, apresentando 98% de conversão de xilose e uma concentração de 33 g/L de etanol (Figura 4.36C), com rendimento de 0,44 g_{etanol}/g_{xilose}. Porém, após 3 dias de operação (10 tempos de residência) observou-se uma queda de viabilidade no sistema, a qual estabilizou em 88% de conversão após outros 10 tempos de residência, com uma concentração de etanol de 28 g/L (Y_{P/S} de 0,42 g_{etanol}/g_{xilose}).

A alimentação do sistema com 120 g/L de xilose, levando a uma concentração de 50 g/L de etanol após 5 tempos de residência, mostrou-se inviável e altamente letal para a levedura, como visto anteriormente, resultando em morte de todas as células presentes nos *beads* após 20 tempos de residência (Tabela 4.20).

Figura 4.36 – Acompanhamento das concentrações de xilose e etanol nos processos contínuos de produção de etanol pela levedura T18-HAA1 imobilizada a partir de (A) 40 g/L; (B) 60 g/L; (C) 80 g/L e (D) 120 g/L de xilose (35°C, pH 5,2, $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$).

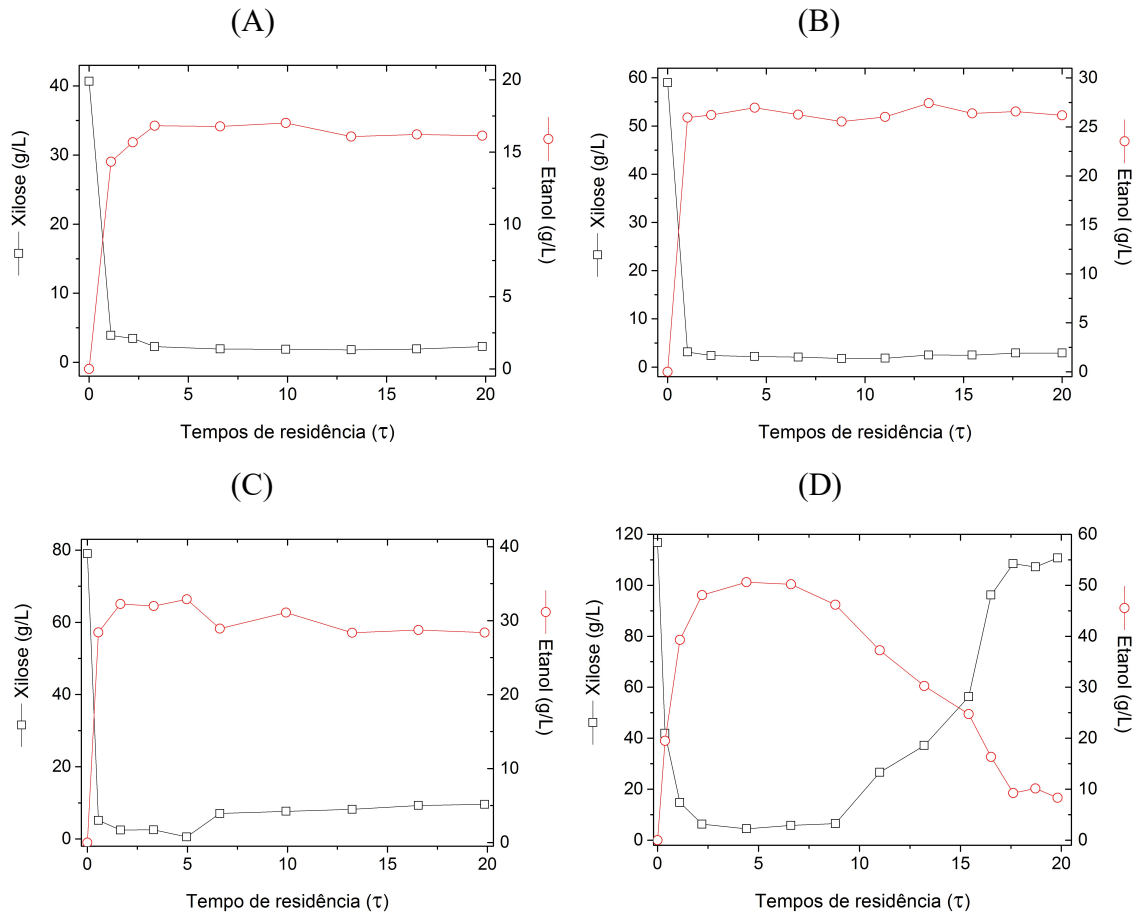


Tabela 4.20 – Viabilidade final das células imobilizadas de T18-HAA1 nos ensaios contínuos de produção de etanol a partir de diferentes concentrações de xilose (35°C, pH 5,2, $1_{V_{beads}}/1_{V_{meio}}$).

Experimento Contínuo	Viabilidade celular final
40 g/L de xilose	99,0%
60 g/L de xilose	98,1%
80 g/L de xilose	85,0 %
120 g/L de xilose	0,0 %

A partir da Tabela 4.20 observa-se que a viabilidade celular no final do processo diminuiu proporcionalmente com o aumento da concentração de xilose, sustentando a hipótese de que a eficiência do processo está sendo influenciada pelo efeito tóxico causado pelo etanol produzido.

O etanol é um inibidor do metabolismo microbiano. Como inibidor, ele se acumula preferencialmente na fração hidrofóbica da membrana, impedindo a assimilação de nutrientes, uma vez que interfere na estrutura e funcionalidade de transportadores presentes na membrana (SWINNEN et al., 2015). Em elevadas concentrações, o etanol interfere na viabilidade e aumenta a taxa de morte celular, pois influencia na biossíntese de macromoléculas, reduzindo a atividade enzimática de algumas enzimas e alterando o metabolismo celular (STANLEY et al., 2010).

A levedura *S. cerevisiae* é conhecida por sua elevada tolerância a etanol. Enquanto algumas cepas de laboratório toleram de 5-12% v/v do inibidor, linhagens industriais da levedura são capazes de acumular concentrações superiores a 16% v/v (126 g/L) de etanol (SWINNEN et al., 2012). Entretanto, de acordo com Demeke et al. (2013c), desenvolvedores da levedura utilizada no presente trabalho, a elevada tolerância a etanol observada na levedura original (Ethanol Red) não foi mantida na levedura GS1.11-26 (precursora da T18) devido ao acúmulo de mutações paralelas durante o processo de engenharia evolutiva para desenvolver a levedura. De fato, em trabalhos posteriores visando melhorar a levedura GS1.11-26, a partir da qual obteve-se a levedura GSE16-T18, os autores observaram que a levedura desenvolvida era capaz de fermentar 330 g/L de glicose, produzindo em torno de 17% v/v de etanol em condições aeróbicas. Porém, apesar do resultado promissor, estes testes foram realizados em glicose e em condições aeróbicas, não podendo ser comparados diretamente aos realizados em xilose no presente trabalho devido à grande diferença entre o metabolismo de pentoses e hexoses na *S. cerevisiae* e à limitação de oxigênio existente no processo contínuo. Os autores realizaram testes em xilose apenas utilizando 40 g/L da pentose e obtiveram resultados similares aos observados neste trabalho.

Swinnen et al. (2015) estudaram a tolerância à etanol da levedura *S. cerevisiae* e observaram que a sensibilidade ao etanol é influenciada pela disponibilidade de nutrientes. Quando um nutriente importante para o metabolismo se torna limitante, a célula fica mais susceptível aos efeitos do etanol. Assim sendo, a tolerância ao etanol irá depender das condições de estresse celular impostas pelas condições de cultivo (incluindo o meio reacional) assim como do tipo de auxotrofia. No caso do presente trabalho, as condições de condução do

processo levaram à limitação de oxigênio assim como provavelmente de nutrientes essenciais, uma vez que se utilizou meio mínimo na alimentação. A tolerância a etanol é uma propriedade complexa que está relacionada a inúmeros genes e a fatores externos. Aparentemente, no processo contínuo estudado, o efeito do etanol sobre a levedura é uma combinação da concentração de etanol e do tempo de exposição.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados nas diferentes concentrações de xilose (Figuras 4.35 e 4.36), escolheu-se a concentração de 80 g/L de xilose para as demais etapas deste trabalho, pois foi a maior concentração de substrato na qual observou-se estabilização do estado estacionário. A menor conversão do processo utilizando 80 g/L (88%) pode ser corrigida pelo simples ajuste do tempo de residência. Apesar da estabilização do estado estacionário também ter sido observada nas concentrações de 40 e 60 g/L, estas condições não seriam industrialmente viáveis em função da baixa concentração de etanol no efluente. Desta forma, um novo ensaio contínuo de produção de etanol a partir de 80 g/L de xilose foi realizado utilizando a levedura T18-HAA1 imobilizada em gel de alginato de cálcio. As características do processo encontram-se detalhadas na Tabela 4.21 e os resultados obtidos na Tabela 4.22 e na Figura 4.37.

Tabela 4.21 –Características do processo contínuo de produção de etanol por células imobilizadas de T18-HAA1 a partir de xilose

Biocatalizador	Ca-alginato 1% + 10% m/m T18-HAA1
pH inicial do meio de alimentação	5,2
Temperatura inicial	35°C
Massa de biocatalisador no reator	50 g
Volume útil do reator	100 mL
Concentração inicial de células no reator	50 g/L
Tempo de residência	7,3 h
Xilose na alimentação	80 g/L
Viabilidade celular inicial	~100%

Após a partida do reator, o processo atingiu o estado estacionário em 24 horas, com 97% de conversão média e 32 g/L de etanol no efluente, correspondendo a um rendimento de 0,42 g_{etanol}/g_{xilose}. Após 10 tempos de residência (3 dias), observou-se uma queda e estabilização da conversão do sistema para 88% (28 g/L de etanol e Y_{P/S} de 0,41 g_{etanol}/g_{xilose}). Entretanto, no sexto dia (20 tempos de residência) a conversão voltou a diminuir. Além disso,

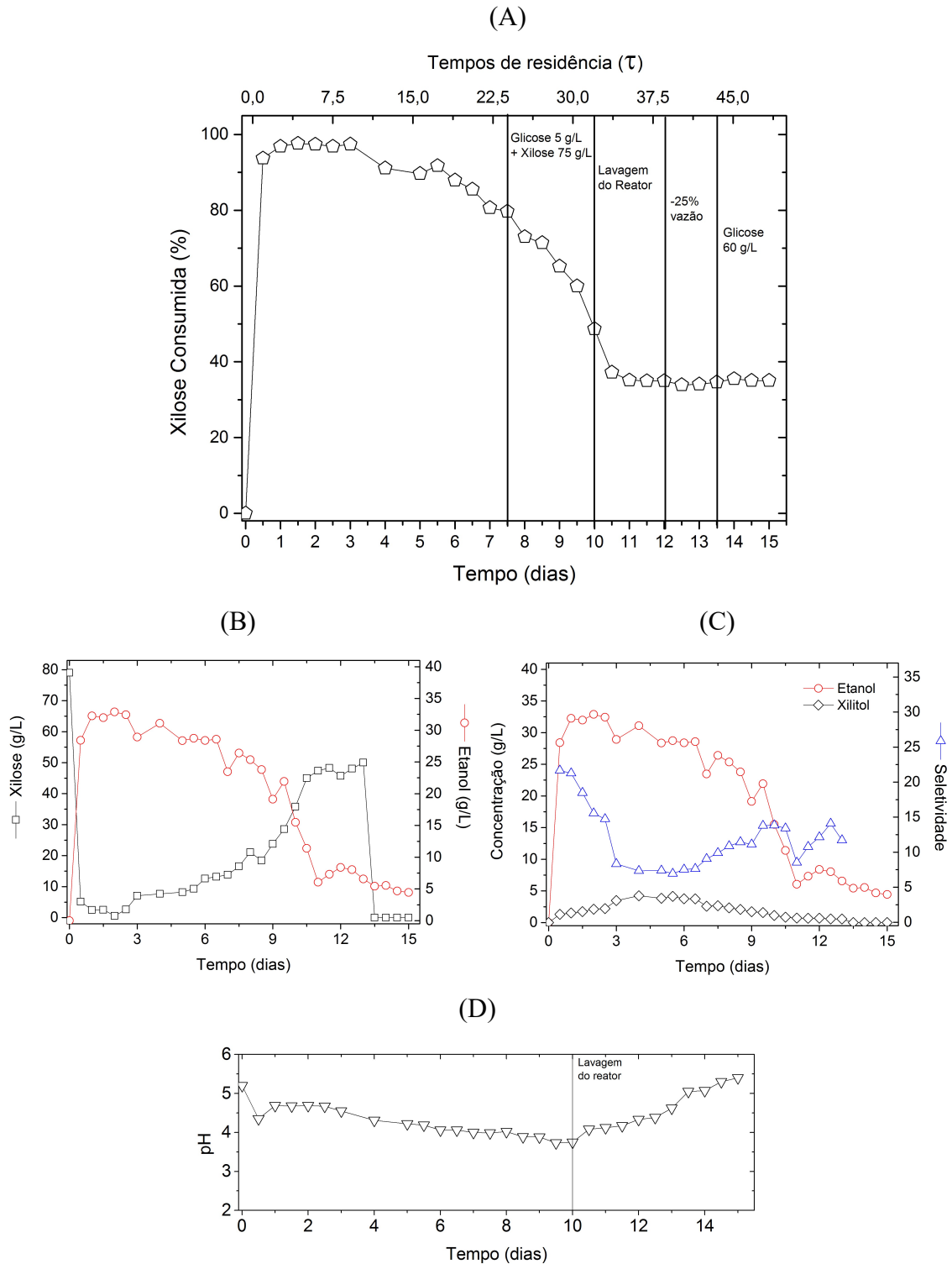
observou-se crescente produção de xilitol (de inicialmente 1,5 g/L para 4 g/L) e consequentemente queda da seletividade (de 18 para 8 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilitol}}$), assim como no ensaio realizado com 120 g/L, sustentando a hipótese que a queda do rendimento do processo e a sensibilidade ao etanol estão ligada não somente à concentração do produto mas também ao tempo de exposição e à limitação de oxigênio.

Tabela 4.22 – Produção contínua de etanol a partir de 80 g/L de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (condições iniciais: 35°C, pH 5,2, $\tau = 7,3\text{h}$, $1\text{v}_{\text{beads}}/1\text{v}_{\text{meio}}$)

	Tempo de residência (dias)	Tempo de residência (τ)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Seletividade ($\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilitol}}$)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Yp/s	Conversão (%)
	0	0,0	0	0		79,02	--		0
	0,5	1,7	28,41	1,31	21,67	5,16	--	0,385	93,47
	1	3,3	32,25	1,52	21,27	2,49	--	0,421	96,85
	1,5	5,0	31,98	1,73	18,48	2,53	--	0,418	96,80
	2	6,6	32,88	2,11	15,56	0,58	--	0,419	99,27
	2,5	8,3	32,45	2,20	14,74	2,6	--	0,425	96,71
	3	9,9	28,92	3,47	8,32	7,06	--	0,402	91,07
	4	13,2	31,08	4,23	7,35	7,66	--	0,436	90,31
	5	16,6	28,35	3,83	7,39	8,21	--	0,400	89,61
	5,5	18,2	28,74	4,14	6,95	9,29	--	0,412	88,24
	6	19,9	28,38	3,76	7,54	12,61	--	0,427	84,04
	6,5	21,5	28,57	3,75	7,63	13,19	--	0,434	83,31
	7	23,2	23,47	2,59	9,06	13,82	--	0,360	82,51
75 g/L xilose 5 g/L glicose	7,5	24,8	26,4	2,67	9,89	16,55	0	0,459	79,07
	8	26,5	25,36	2,33	10,87	21,10	0	0,479	73,32
	8,5	28,1	23,8	2,08	11,44	18,42	0	0,428	76,71
	9	29,8	19,12	1,72	11,12	23,78	0	0,380	69,93
	9,5	31,4	21,93	1,59	13,79	28,55	0	0,482	63,90
	10	33,1	15,5	1,12	13,84	35,82	0,11	0,405	54,56
Lavagem reator xilose + glicose	10,5	34,8	11,4	0,85	13,41	45,01	1,6	0,392	41,06
	11	36,4	6,05	0,71	8,52	47,42	0,25	0,227	39,72
	11,5	38,1	7,32	0,68	10,76	48,30	0,66	0,284	38,09
menos 25% vazão	12	39,2	8,38	0,69	12,14	45,71	0,24	0,295	41,89
	12,5	40,4	8,03	0,57	14,09	48,06	0,32	0,309	38,82
	13	41,5	6,56	0,56	11,71	50,01	0,21	0,273	36,49
Troca Glicose 60g/L	13,5	42,6	5,42	0	--	0	31,61	0,191	34,63
	14	43,8	5,54	0	--	0	31,71	0,196	35,50
	14,5	44,9	4,67	0	--	0	36,83	0,202	35,06
	15	46,1	4,44	0	--	0	33,66	0,169	35,18

Figura 4.37 – Acompanhamento do processo contínuo de produção de etanol a partir de 80 g/L de xilose pela levedura T18-HAA1 imobilizada (35°C, pH 5,2, $\tau = 7,3\text{h}$, $1V_{\text{beads}}/1V_{\text{meio}}$).

(A) Consumo de xilose/glicose; (B) Concentrações de xilose e etanol; (C) Seletividade e concentrações de etanol e xilitol e (D) pH.



Para tentar reverter a queda na conversão, decidiu-se trocar o meio de alimentação do sistema para um meio composto por uma mistura de xilose e glicose. De acordo com Öhgren et al. (2006), elevadas concentrações de glicose suprimem a assimilação de xilose por *S. cerevisiae* engenheiradas devido a especificidade dos transportadores da levedura. Entretanto, baixas concentrações de glicose são capazes de melhorar o consumo de xilose. De fato, Vilela et al. (2015), utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 observaram que quando se adicionava 10 g/L de glicose ao meio (com 40 g/L de açúcares totais), a taxa de consumo específica de xilose subia de 0,49 g/L.h para 0,55 g/L.h. Krahulec et al. (2010), estudando a co-fermentação de glicose e xilose por *S. cerevisiae* geneticamente modificada, observaram que quando utiliza-se 4 g/L de glicose em 50 g/L de xilose, a velocidade de assimilação da pentose era 5 vezes maior. Assim sendo, o sistema contínuo do presente trabalho passou a ser alimentado com 75 g/L de xilose e 5 g/L de glicose, mantendo as 80 g/L de açúcares totais. Desta forma, esperava-se melhorar o consumo de xilose no processo, auxiliar no balanço redox de cofatores gerados na via das pentoses e conseqüentemente a estabilizar a conversão do processo.

De fato, após iniciar-se a alimentação com meio composto de xilose e glicose (7,5 dias), observou-se uma melhoria na seletividade do processo (Figura 4.37), com diminuição na produção de xilitol, além do aumento esperado na produção de etanol graças à presença de glicose na alimentação (Tabela 4.22). Porém o consumo de xilose continuou a cair, indicando a ocorrência de perda de viabilidade.

Com 10 dias de operação, atingiu-se uma conversão de 54,5% e decidiu-se então realizar a lavagem do reator objetivando reduzir a concentração de etanol no reator, aumentando-se a vazão de alimentação pelo tempo necessário para obter uma concentração de 80 g/L em açúcares redutores no efluente (conversão zero). Após esse período, a vazão de alimentação de operação foi reestabelecida em 14 mL/h. A lavagem contribuiu para corrigir o pH novamente para 5,2, o qual estava em 3,9 antes da lavagem, conforme mostra a Figura 4.37.

Após a lavagem do reator, o sistema estabilizou em uma conversão de 38%. A vazão de alimentação foi então ajustada em 25% para menos (de 14 mL/h para 10,5 mL/h) para aumentar o tempo de residência (de 7,3 para 9,5 h) visando aumentar a conversão de substratos. Porém, o sistema manteve-se em 38% de conversão apesar do maior tempo de residência, indicando que provavelmente a viabilidade celular continuou diminuindo.

Neste ponto do processo, após 13 dias (41 tempos de residência), a concentração de etanol na saída do sistema era de 6,5 g/L, e as medidas tomadas para aumentar o consumo dos açúcares na alimentação e a eficiência do processo não foram eficientes. Desta forma, uma última tentativa de reverter a diminuição da viabilidade celular foi realizada pela troca completa do meio de alimentação por 60 g/L de glicose. Com isso, esperava-se avaliar se a queda na viabilidade era causada pelo balanço redox do cofatores e déficit de ATP decorrente da via PPP.

O sistema alimentado com glicose manteve-se estável em 35% de conversão por mais 4 dias, porém sem melhoria no desempenho do processo. No entanto, as medidas tomadas foram eficazes em estabilizar o reator, evitando a perda de todas as células presentes, conforme ocorreu no experimento conduzido com 120 g/L de xilose. A lavagem do reator parece ter sido a medida mais importante. Por meio da lavagem, a concentração de etanol a qual as células estavam expostas foi rapidamente diminuída de 15 para ~ 7 g/L. Devido à perda de viabilidade ocorrida ao longo dos primeiros 33 tempos de residência, o sistema não apresentou a resposta esperada (aumento de conversão) às mudanças posteriores na composição do meio de cultivo e do tempo de residência. Mas nessa condição de operação, o reator apresentou conversão estável nos 5 tempos de residência finais e, por isso, o experimento foi encerrado após 15 dias de operação (46 tempos de residência). É interessante destacar que a viabilidade celular no final do processo era de 32%, valor semelhante à conversão observada.

Apesar do processo ter sido interrompido devido à perda de viabilidade celular, informações importantes puderam ser extraídas a partir deste ensaio, as quais contribuirão no estabelecimento de um processo SHIF robusto:

- O fato da lavagem do reator ter estabilizado o processo sugere que o etanol produzido está causando a inativação das células de forma irreversível, uma vez que não houve recuperação das células após a lavagem;

- A queda da viabilidade celular está relacionada, a princípio, com a produção de etanol e exposição prolongada a uma determinada concentração do mesmo. Porém, a limitação de oxigênio e nutrientes no meio também são fatores a serem considerados;

- A conversão de xilose no processo está diretamente ligada à viabilidade final das células imobilizadas;

- A adição de glicose ao meio, apesar de ajudar na seletividade do processo, não melhorou a conversão, indicando que a queda de viabilidade não é um problema de déficit de ATP e balanço redox devido às limitações da via pentose fosfato (PPP);

- Conforme sugerido por Swinnen et al (2015), a tolerância a etanol em *S. cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada é afetada pela auxotrofia, e tal fato foi observado no processo pela queda da viabilidade celular frente a concentrações de etanol cada vez mais baixas ao longo do tempo prolongado de processo;

- A levedura T18-HAA1 necessita de uma adaptação não somente a inibidores presentes no hidrolisado de hemicelulose, mas principalmente a etanol. Nos ciclos realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar observava-se queda significativa da viabilidade, a qual costuma ser atribuída aos inibidores (ácido acético, furfural e HMF). No entanto, os resultados obtidos nos experimentos contínuos conduzidos em meio sintético, isento dos inibidores encontrados no hidrolisado, mostram que o efeito tóxico do etanol produzido, já que foram oferecidos 100 g/L de açúcares totais, deve ser considerado.

4.6. Comparação entre a produção contínua de etanol a partir de xilose utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada

Na busca por um processo SHIF viável, um dos objetivos finais do grupo é comparar os processos contínuos de produção de etanol a partir de xilose utilizando a levedura geneticamente modificada e a levedura selvagem. Neste contexto, o presente trabalho contribuiu para a aquisição de informações valiosas sobre o desempenho de uma levedura recombinante, capaz de assimilar eficientemente xilose, em reator de leito fixo, operado continuamente. A Tabela 4.23 apresenta uma comparação entre os ensaios contínuos realizados no presente estudo e ensaios contínuos realizados anteriormente no grupo por Montañó (2013) e Silva (2013) utilizando a levedura selvagem co-imobilizada com a XI, utilizando o mesmo reator.

Dentre os experimentos realizados, apesar do de Montañó ter sido o mais longo (432h), o experimento realizado no presente estudo apresentou o maior número de tempos de residência (46).

O processo utilizando a levedura geneticamente modificada se mostrou mais eficiente e rápido do que com a levedura selvagem, apresentando tempos de residência significativamente mais baixos (2,2 vezes mais rápido no caso de 60 g/L) e maiores valores de produtividade e rendimento em etanol. Tal fato pode ser facilmente explicado pela baixa velocidade de fermentação de xilulose da levedura selvagem. De fato, os resultados obtidos utilizando-se a levedura recombinante (90% do rendimento teórico e tempos de residência de

3,6 a 10,8h) são comparáveis à produção de etanol a partir de glicose. Atualmente no Brasil, a produção de etanol 1G é em sua maioria realizada com reciclo de células no qual o tempo de fermentação dura entre 6 e 10h (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Caicedo et al. (2003) utilizando *S. cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio obtiveram 54,5 g/L de etanol a partir de melaço, com 88,2% do rendimento teórico e 1,835 g/L.h. Gilson e Thomas (1995) obtiveram 83% do rendimento teórico (41 g/L de etanol e 2,98 g/L.h) a partir de glicose com *S. cerevisiae* imobilizada em gel de alginato.

Tabela 4.23 – Comparação da produção contínua de etanol a partir de xilose utilizando levedura geneticamente modificada com a SIF de xilose empregando levedura selvagem e xilose isomerase (Montaño, 2013 e Silva, 2013)

Ensaio	Montaño (2013)		Silva (2013)	Presente Estudo			
	65 g/L	32,5 g/L	65 g/L	40 g/L	60 g/L	80 g/L	120 g/L
Temperatura	32°C	32°C	32°C	35°C	35°C	35°C	35°C
pH ₀	5,6	5,6	5,6	5,2	5,2	5,2	5,2
τ (h)	15-19h	15h	12h	3,6h	5,4h	7,3h	10,8h
Etanol (g/L)	10	8,5	22,8	17	26	33	50
Conversão*	63%	71%	85%	97%	95%	97%	95%
Q _p (g/L.h)*	~ 0,67	0,57	1,9	4,68	4,78	4,41	4,58
Y _{P/S} *	~ 0,240	~ 0,370	0,350	0,450	0,46	0,44	0,45
Seletividade* (g _{etanol} /g _{xilitol})	3,2	3,7	5,7	32,3	31,0	21,3	19,3
Contaminação Bacteriana	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
Duração (τ)	11,9	28,8	22	26	18	46	33
Duração (h)	227	432	264	96	96	360	216
Viabilidade _f	--	87%	--	99%	98%	32%	0%

Montaño (2013) e Silva (2013) utilizaram levedura selvagem co-imobilizada com XI

Os parâmetros fermentativos Q_p, Y_{P/S}, Seletividade e Conversão foram estimados no estado estacionário

Apesar da levedura recombinante ser mais eficiente, de acordo com a literatura, a levedura selvagem deveria ser mais resistente às condições do processo, como limitação de nutrientes e elevada concentração de etanol. No experimento de Montaño (2013), a levedura

selvagem apresentou 87% de viabilidade após 18 dias de processo, porém este dado não pode ser comparado com o observado no presente trabalho pois as concentrações de xilose utilizadas por Montaño (2013) eram diferentes das utilizadas neste estudo, 32,5 e 80 g/L respectivamente.

Desta forma, como esperado, a levedura recombinante é superior à selvagem em termos de conversão, produtividade, seletividade, rendimento e até na menor susceptibilidade à ocorrência de contaminação (por causa da assimilação mais eficiente de xilose). Ela constitui uma opção interessante para o processo de hidrólise e fermentação simultâneas de hemicelulose (SHF), uma vez que é mais rápida e eficiente na produção de etanol a partir de xilose e sua utilização no processo significa eliminação de etapas de imobilização enzimática e custos com enzima e suporte. Entretanto, para que o processo seja viável, a resistência da levedura às condições de processo, principalmente ao efeito tóxico do etanol, deve ser melhorada por técnicas de engenharia genética ou adaptação evolutiva, uma vez que esta é a sua principal desvantagem. Na condução de processos contínuos, baixos valores de produtividade e rendimento podem ser facilmente contornados aumentando-se a concentração de células no reator ou ajustando-se o tempo de residência. A baixa tolerância a etanol, por sua vez, é um obstáculo digno de atenção pois é necessária a produção de elevadas concentrações de etanol para que o processo seja viável.

O processo proposto pela patente, por sua vez, na qual a fermentação e a hidrólise da hemicelulose ocorrem de forma simultânea, se mostra uma opção importante para a produção de etanol a partir da hemicelulose pois a xilose é um meio extremamente susceptível a contaminação. Os ensaios realizados com a levedura recombinante não apresentaram contaminação bacteriana por serem rápidos e o meio de alimentação ser trocado periodicamente (utilizou-se um balão com volume de 3L na alimentação). Porém, no aumento de escala do processo, onde espera-se trabalhar com volumes muito superiores, a utilização de um meio de difícil contaminação como os xilooligômeros se consolida como fator importante. Sendo assim, a otimização do biocatalisador contendo xilanases e a levedura recombinante co-imobilizadas para a produção contínua de etanol a partir de xilana se torna essencial em etapas futuras para concretizar o processo.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho envolveu a realização de vários estudos na direção do alcance da meta final, o desenvolvimento de uma tecnologia escalonável para a produção de etanol 2G a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar. Nesse contexto foram buscadas respostas para diferentes problemas.

O primeiro passo no processo estudado foi a hidrólise dos xilooligômeros, o novo substrato proposto visando reduzir a contaminação no processo, pois esse substrato tem que ser hidrolisado a xilose. Foram então estudados diferentes complexos enzimáticos de xilanases, chegando-se às seguintes conclusões:

- Dentre os preparados enzimáticos comerciais testados, destacou-se o produto Multifect CX XL A03139 (XAS-5), que apresentou o maior potencial para a produção de xilose assim como a maior conversão (78,7%).
- Para compor o *pool* de enzimas do processo SHIF foi selecionada, além do complexo enzimático Multifect CX XL A03139 (XAS-5), a xilanase recombinante de *B. subtilis* (XynA), a qual destacou-se por ser exclusivamente endoxilanase, podendo assim potencializar a ação da XAS-5 na produção de xilose a partir de oligômeros.
- Foi então estudada a imobilização de XynA em quitosana-glutaraldeído, quitosana-glioxil e agarose-glioxil. O melhor derivado foi agarose-glioxil, o qual apresentou 44,8 UI/g de biocatalisador e proporcionou notável estabilização da enzima devido às ligações multipontuais formadas entre enzima e suporte, aumentando o tempo de meia vida da xilanase em mais de 8 mil vezes (56°C e pH 5,6) e permitindo a operação da hidrólise da xilana por 10 ciclos mantendo a conversão acima de 90% da conversão máxima. Além disso, o derivado agarose-glioxil-XynA foi capaz de hidrolisar de forma eficaz uma fração da xilana insolúvel.

Foram realizados, a seguir, ensaios SHIF com os derivados obtidos, utilizando levedura selvagem, cujos resultados permitiram concluir que:

- O processo de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) de hemicelulose a etanol se mostrou possível utilizando-se um biocatalisador contendo derivados de xilanase e xilose isomerase co-imobilizados com *S. cerevisiae* em gel de alginato de cálcio.

Contudo, observou-se uma queda na atividade catalítica de xilose isomerase durante a SHIF, a qual não ocorre quando se utiliza xilose como substrato. Assim, a hidrólise de xilooligômeros gera condições intra-partícula que afetam a atividade de xilose isomerase. Passou-se a investigar os possíveis fatores que alteram o micro-ambiente, verificando-se que:

- Xilooligossacarídeos (XOS) são inibidores da xilose isomerase, provocando queda na velocidade do consumo de xilose pela enzima proporcionalmente ao aumento da concentração destes compostos no meio. De fato, a velocidade de isomerização catalisada pela enzima diminuiu em 32% na presença de 7 g/L de xilobiose.
- Ocorre queda de pH com a hidrólise, ao serem liberadas ramificações ácidas dos xilooligômeros, aumentando a dissolução do carbonato de cálcio presente no meio. O íon Ca^{2+} se mostrou como um forte inibidor da xilose isomerase, mas Mg^{2+} é um ativador da enzima e o aumento da concentração desse íon no meio permite superar a inibição do Ca^{2+} . Verificou-se ainda que a influência destes íons é potencializada em pH mais baixos.
- Um ensaio com controle de pH e aumento da concentração de Mg^{2+} permitiu melhora do desempenho do ensaio SHIF, mas não foi suficiente para impedir a queda de atividade catalítica da xilose isomerase, devido provavelmente à inibição por XOS. Conclui-se assim que é importante aumento da concentração de β -xilosidase no biocatalisador para se obter rápida conversão de xilobiose a xilose.
- O sistema deverá atuar tal que xilooligômeros sejam convertidos rapidamente a xilose, sem acúmulo de XOS, mantendo-se concentração baixa de xilose, com a velocidade do processo controlada pela fermentação. Poderá ainda ser utilizado conjuntamente outro dos complexos de xilanases testados que mostrou ação diferente do complexo selecionado, visando atingir 100% de conversão.

Está em produção no grupo a enzima β -xilosidase, a qual deverá estar brevemente disponível, o que permitirá continuidade dos estudos do processo SHIF. Uma vez que esse estudo não poderia continuar neste trabalho, passou-se a estudar o processo utilizando levedura recombinante. O estudo realizado permitiu se chegar às seguintes conclusões:

- A levedura recombinante GSE16-T18 destacou-se como uma excelente fermentadora de xilose, apresentando, quando imobilizada, uma velocidade de consumo elevada (imobilizada $0,2 \text{ g}_{\text{xilose}}/\text{g}_{\text{células}}\cdot\text{h}$) e sem a formação de subprodutos.

- O metabolismo da GSE16-T18 é fortemente inibido pela presença de ácido acético, entretanto o encapsulamento da levedura em gel de alginato de cálcio mostrou-se uma forma eficiente de proteção em frente ao inibidor, permitindo que a levedura fermentasse xilose eficientemente ($0,07 \text{ g}_{\text{xilose}}/\text{g}_{\text{células}}\cdot\text{h}$), em concentrações de 11 g/L de ácido acético.
- GSE16-T18 encapsulada foi reutilizada eficientemente em até 10 ciclos de fermentação em meio sintético com o mesmo desempenho, conversão (99%), rendimento ($0,440 \text{ g/g}$) e produtividade ($4,25 \text{ g/L}\cdot\text{h}$), mesmo na presença de etanol (6 g/L) e ácido acético (15 g/L) acumulados entre ciclos.
- As fermentações conduzidas com o hidrolisado hemicelulósico doado pelas Indústrias Praj (Índia) apresentaram rendimento de $0,47 \text{ g/g}$ e produtividade de $1,17 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, com concentração máxima de etanol de 28 g/L, na presença de 3,8 g/L de ácido acético, 0,15 g/L de furfural e 0,34 g/L de HMF. Esses resultados foram inferiores aos obtidos com o meio sintético, na presença de 4 g/L de ácido acético e 15,4 g/L de etanol ($1,93 \text{ g/L}\cdot\text{h}$). O desempenho inferior pode ser atribuído à presença dos inibidores no hidrolisado, evidenciando que a levedura necessita de melhorias como adaptação evolutiva para ser tolerante aos inibidores, ou ainda ao etanol e a presença de extrato de levedura no meio sintético. Entretanto, como o hidrolisado obtido pelo pré-tratamento hidrotérmico utilizado na SHIF possui uma concentração significativamente menor de inibidores, a utilização desse hidrolisado em futuros estudos proporcionará condições menos estressantes para as células, com resultados mais promissores.
- Decidiu-se dar continuidade aos estudos utilizando-se a levedura GSE16-T18 HAA1, uma vez que esta foi geneticamente modificada para ter maior tolerância a ácido acético, o qual é o inibidor em maior concentração no hidrolisado hidrotérmico.
- A presença da quitosana dentro dos *beads*, a qual é utilizada para imobilizar a enzima xilose isomerase, potencializou a ação protetora do gel de alginato para a levedura, conferindo maior robustez aos *beads*.

Finalmente, na última etapa do trabalho, foi avaliada a tecnologia de produção contínua de etanol a partir de xilose em um reator de leito fixo, contendo a levedura GSE16-T18 HAA1 imobilizada em gel de alginato, concluindo-se que:

- Durante o processo contínuo de produção de etanol a partir de 120 g/L de xilose, a viabilidade da levedura imobilizada diminuiu drasticamente após 96h de processo. A queda

na conversão observada pode ser atribuída à limitação de oxigênio e nutrientes e/ou à elevada concentração de etanol (~ 50 g/L) a qual as células foram expostas por 72 h. A adição de ergosterol e a introdução de aeração no sistema não foram efetivas na reversão da queda de viabilidade.

- A queda da viabilidade celular provavelmente não está relacionada com balanço redox, acúmulo de cofatores ou déficit de ATP uma vez que a adição de glicose não melhorou a conversão do processo. Porém, a adição de glicose mostrou ser efetiva na redução da produção de xilitol.
- Em concentrações acima de 30 g/L, o etanol causa inativação irreversível das células, uma vez que não houve recuperação das mesmas após lavagem do reator. A sensibilidade das células ao etanol parece ser influenciada pela limitação de oxigênio e nutrientes assim como pelo binômio concentração de etanol e tempo de exposição das células.
- Para uma alimentação contendo 60 a 65 g/L de xilose, utilizando o mesmo reator, meio e carga de levedura nos *beads*, a levedura geneticamente modificada apresenta conversão, rendimento e produtividade 11, 24 e 150 % superiores, respectivamente, aos valores obtidos com a levedura selvagem. Além disso, a maior velocidade de assimilação de pentose permitiu que o reator fosse operado por 15 dias sem ocorrência de contaminação por bactérias. Todos os experimentos realizados com a levedura selvagem foram interrompidos após 9 a 18 dias, devido à ocorrência de contaminação por bactérias.
- De acordo com os resultados obtidos, a operação por longos períodos do reator de leito fixo, sem perda de viabilidade, só seria possível em concentrações de xilose na alimentação entre 30 a 40 g/L, correspondendo a concentrações de etanol no efluente abaixo de 15 g/L, aparentemente toleradas pelas células da levedura recombinante. Já as leveduras selvagens mantiveram a viabilidade na presença de ~ 23 g/L de etanol (concentrações de xilose na alimentação maiores que 65 g/L não foram investigadas para a levedura selvagem). Em ambos os casos, a concentração de etanol no vinho é muito inferior aos valores usuais (80 a 120 g/L) do processo de etanol 1G, comprometendo a viabilidade econômica do processo. Desta forma, o estabelecimento de uma tecnologia escalonável de produção de etanol de 2G a partir da fração hemicelulósica depende essencialmente da operação estável do reator de leito fixo em concentrações de xilose acima de 120 g/L (ou o correspondente em XOS), utilizando hidrolisados, o que requer a adaptação da levedura recombinante aos inibidores presentes e, principalmente, ao etanol presente no meio em concentrações superiores a 60 g/L.

6. SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

- Realizar estudos da cinética de inibição da xilose isomerase por Ca^{2+} , xilobiose e xilotriose, de modo a se entender melhor o mecanismo de ação destes inibidores na enzima e consequente perda de atividade catalítica no processo SHIF.
- Inclusão de β -xilosidase no *pool* de enzimas da SHIF para aumentar a eficiência na conversão de xilana a xilose.
- Estudo da concentração de gel de alginato na composição dos beads do biocatalizador e sua ação protetora.
- Adaptação evolutiva da levedura GSE16-T18 HAA1 a concentrações de etanol acima de 60 g/L para melhoria da viabilidade celular no processo contínuo.
- Realização de ensaio contínuo utilizando meio de alimentação suplementado com extrato de levedura, o qual possui ergosterol em sua complexa composição, para amenizar a limitação de nutrientes no meio, melhorar a tolerância a etanol e viabilidade celular.
- Otimização da composição do meio de alimentação do processo contínuo para evitar a limitação de nutrientes.
- Realização de produção contínua de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por pré-tratamento hidrotérmico.
- Avaliar o processo em outras configurações de reatores que permitam condições mais adequadas de operação estéril e controle de pH. Reatores de leito fluidizado podem ser uma boa opção, pois permitem a recirculação do meio em níveis adequados para garantir condições ideais de mistura e adequado controle do pH.
- Estabelecimento da melhor relação xilanases:xilose isomerase utilizada nos *beads* para o processo SHIF.
- Realização de ensaios SHIF de modo contínuo após otimização de cada etapa do processo, hidrólise, isomerização e fermentação, utilizando levedura selvagem e recombinante.

7. REFERÊNCIAS

- ADITIYA, H.B.; MAHLIA, T.M.I.; CHONG, W.T.; NUR, H.; SEBAYANG, A.H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.66, p.631-653, 2016.
- ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v.9, p. 2170-2179, 2008.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v.344, p.660–666, 2009.
- ALLEN, K.N.; LAVIE, A.; GLASFELD, A.; TANADA, T.N.; GERRITY, D.P.; CARLSON, S.C.; FARBER, G.K.; PETSKO, G.A.; RINGE, D. Role of the Divalent Metal Ion in Sugar Binding, Ring Opening and Isomerization by d-Xylose Isomerase: Replacement of a Catalytic Metal by an Amino Acid. **Biochemistry**, v.33, p.1488-1494, 1994.
- ANDERSON, R.L.; GREENWELL, H.C.; SUTER, J.L.; COVENEY, P.V.; THYVEETIL, M. Determining materials properties of natural composites using molecular simulation. **Journal of Materials Chemistry**, DOI: 10.1039/b909110j, 2009.
- ANDREASEN, A.A.; STIER, T.J.B. Anaerobic Nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Comp Physiol**, v.41, n.1, p.23-36, 1953.
- ANTUNES, F.A.F.; MILESSI, T.S.S.; CHANDEL, A.K.; et al. Innovated approach to produce 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate by immobilized cells of a xylose-fermenting yeast isolated from Brazilian forest. **Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends**, ISBN: 978-90-8686-243-6, 2014.
- APEL, A.R.; OUELLET, M.; MIDDLETON, H.S.; KEASLING, J.D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose-xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v.6, p.19512, 2016.
- AQUINO, P.M. **Produção de etanol de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, 2013.
- ARAGON, C.C.; SANTOS, A.F.; RUIZ-MATUTE, A.I.; CORZO, N.; GUIBAN, J.M.; MONTI, R. MATEO, C. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xylanase from *Arpergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.98, p.8-14, 2013.
- ARATO, C.; PYE, E.K.; GJENNESTAD, G. The lignol approach to biorefinery of wood biomass to produce ethanol and chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, p.871-882, 2005.

- ASBÓTH, B.; NÁRAY-SZABÓ, G. Mechanism of Action of D-Xylose Isomerase. **Current Protein and Peptide Science**, v.1, p.237-254, 2000.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p.89-105, 2008.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v.86, p.2273-2282, 2009.
- BANGRAK, P.; LIMTONG, S.; PHISALAPHONG, M. Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.676-684, 2011.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and its impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M.A.S. **Biofuels Production- Recent Developments and Prospects**, 2011, cap-5, p.85-100.
- BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; VIEIRA, R.S.; SANTOS, N.N. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalizes with histidine. **Journal of Membrane Science**, v.240, p.227-235, 2004.
- BETANCUR, G.J.V. **Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Picchia stipitis***. 123p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- BEZERRA, T.L.; RAGAUSKAS, A.J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, bioprod, bioref**, v. 10, p. 634-647, 2016.
- BLANCO, R.M.; GUISÁN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme Microb. Technol.**, v.11, p.360-366, 1989.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v 72, p.248-254, 1976.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2304-2311, 2009.
- BRENA, B.M.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of Enzymes. In: GUISAN, J.. **Immobilization of Enzymes and Cells**, 2006. cap-2, p.15-30.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.557-577, 2010
- BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; et al. Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v.3, p. 95–105, 2005.

CAICEDO, L.A.; CUENCA, M.M.; DÍAZ, M. Scale-up of ethanol production at pilot scale level using a reactor with immobilized cells. In: XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química, Bucaramanga, Colombia (in Spanish), 2003.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, doi: 10.1155/2012/989572

CANILHA, L.; CARVALGO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161, p.84-92, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.1467-1475, 2011.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.1087-1093, 2005.

CARDONA, C.A.; SÁNCHEZ, O.J.; GUTIÉRREZ, L.F. **Process Synthesis for fuel production**. New York: CRC Press, p.131-153, 2009.

CARVALHO, A.F.A.; NETO, P.O.; SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v.51, 75-85, 2013.

CARVALHO, W. **Estudo da imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2000.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v.23, p.60-10, 2006.

CASCAVAL, D.; GALACTION, A.I.; ROTARU, R. Effect of glucose internal diffusion on alcoholic fermentation in a stationary basket bioreactor with immobilized yeast cells. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, n.3, p.6200-6208, 2011.

CERQUEIRA-LEITE, R.C.; LEAL, M.R.L.V.; CORTEZ, L.A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?. **Energy**, v.34, p.655-661, 2009.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v.98, p.1947-1950, 2007.

CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SINGH, O.V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, p.11-20, 2011

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of “Biofuel”. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.1289-1303, 2011.

CHANDEL, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; ARRUDA, P.V.; MILESSI, T.S.S.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State-of-the-art. In: SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K.(eds), **D-Xylitol: fermentative production, application and commercialization**. Heidelberg: Springer, 2012. ISBN: 978-3-642-31886-3

CHEN, Y.; LIU, Q.; ZHOU, T.; LI, B.; YAO, S.; LI, A.; WU, J.; YING, H. Ethanol Production by Repeated Batch and Continuous Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in a Fibrous Bed Bioreactor. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.511-517, 2013

COELHO, T.C. **Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol**. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2007.

CONAB 2016/2017 – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>> Janeiro, 2017.

COP 21, 2015 – Conference of the Parties. Disponível em <<https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/109.pdf>>, Janeiro, 2017.

COVIZZI, L.G. **Seleção de um Suporte Sintético para imobilizar células do *Botryosphaera rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas**. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2007.

CTNBIO, 2005. Lei da Biossegurança. Disponível em <<http://ctnbio.mcti.gov.br/>> Fevereiro, 2017.

CUNHA, M.A.A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2006.

DAVIS, L.; JEON, Y. J.; SVENSON, C.; ROGERS, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v.29, p.49-59, 2005.

DEMEKE, M.M.; DUMORTIER, F.; LI, Y.; BROECKX, T.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial

Saccharomyces cerevisiae for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.120, 2013a.

DEMEKE, M.M.; DIETZ, H.; LI, Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; MUTTURI, S.; DEPREZ, S.; ABT, T.D.; BONINI, B.M.; LIDEN, G.; DUMORTIER, F.; VERPLARTSE, A. BOLES, E.; THEVELEIN, J.M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulosic hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p.89, 2013b.

DEMEKE, M.M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; DUMORTIER, F.; THEVELEIN, J.M. Rapid Evolution of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* for Xylose Fermentation through formation of extra-chromosomal circular DNA. **Plos**, DOI:10.1371/journal.pgen.1005010, 2013c

DEMIRBAS, M.F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Applied Energy**, v.86, p.s151-s161, 2009.

DERVAKOS, G.A.; WEBB, C. On the merits of viable-cell immobilization. **Biotechnology Advertisements**, v.9, p.559-612, 1991.

DODD, D; CANN, I.K.O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v.1, p.2-17, 2009.

DOMÍNGUEZ, J.M.; CHENG, S.G.; TSAO, G.T. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.49-56, 1996.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XYS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3381-3386, 2000.

FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood** – Chemistry Ultrastructure Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.

FERRAZ, F.O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol**. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2010.

FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian Forest. **Yeast**, v.28, p.547-554, 2011.

FUXREITER, M.; BOCSKEI, Z.; SZEIBERT, A.; SZABÓ, E.; DALLMANN, G.; NÁRAY-SZABÓ, G.; ASBÓTJ, B. Role of Electrostatics at the Catalytic Metal Binding Site in Xylose Isomerase Action: Ca²⁺ - Inhibition and Metal Competence in the Double Mutant D254E/D256E. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v.28, p.183-193, 1997.

GALACTION, A.; BALTARU, R.; TURNEA, M.; CASCAVAL, D. Ethanol production in a basket bioreactor with immobilized yeasts cells 2. Study on the mixing efficiency in the outer region of basket for a double Rushton turbine impeller. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, n.4, p.6344-6353, 2011.

GALAZZO J.L.; SHANKS, J.V.; BAILEY J.E. Comparison of suspended and immobilized yeast metabolism using ³¹P Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. **Biotechnol Tech**, v.1, p. 1-6, 1987.

GILSON, C.D.; THOMAS, A. Ethanol production by alginate immobilised yeast in a fluidised bed bioreactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.62, p.38–45, 1995.

GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C.; ZANGIROLAMI, T.C.; TARDIOLI, P.W.; KOPP, W.; MILESSI, T.S.S; SILVA, C.R. et al. Sistema Catalítico e Processo de Obtenção de Bioetanol 2G a Partir de Xilana/Oligômeros de Xilose. Patente: Privilégio de Inovação. BR102014023394, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/09/2014

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

GIORDANO, R. L. C.; TROVATI, J.; SCHMIDELL, W. Continuous production of ethanol from starch using glucoamylase and yeast co-immobilized in pectin gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, n. 1-3, p. 47–61, 2008.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresouce Technology**, v.101, p.4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v.36, p.2086-2097, 2008. Goldman, 2009;

GOLDSTEIN, I.S. **Organic Chemicals from Biomass**. USA: CRS Press, 1981.

GONÇALVES, D.L.; MATSUSHIKA, A.; SALES, B.B.; GOSHIMA, T.; BON, E.P.S.; STAMBUK, B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**. v.63, p.13-20, 2014.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 469-474, 2006.

GRAY, M.C.; CONVERSE, A.O.; WYMAN, C.E. Solubilities of Oligomer Mixtures Produced by the Hydrolysis of Xylans and Corn Stover in Water at 180°C. **Ind. Eng. Chem. Res.**, vol46, p.2383-2391, 2007.

GREETHAM, D. Presence of low concentrations of acetic acid improves fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioprocessing and Biotechniques**, v.5, 2014.

GRZENIA, D. L.; SCHELL, D. J.; WICKRAMASINGHE, S. R. Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. **Journal of Membrane Science**, v.322, p.189-195, 2008.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K.S. Lignocelluloic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Eng. Life. Sci.**, v.16, p.1-16, 2016.

GUIDONI, I.; CHLAPANIDAS, T.; BUCCO, M.; CROVATO, F.; MARAZZI, M.; VIGO, D.; TORRE, M.L.; FAUSTINI, M. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. **Cytotechnology**, v.58, p.49-56, 2008.

GUISÁN, J. (1988). Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, 10, 375–382. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102298890018X>

GUISAN, J.M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2nd edition, New Jersey: Humana Press, 2006, 465p.

GULDFELDT, L.U.; ARNEBORG, N. Measurement of the Effects of Acetic Acid and Extracellular pH on Intracellular pH of Nonfermenting, Individual *Saccharomyces cerevisiae* Cells by Fluorescence Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 530-534, 1998.

GUO, X.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M. Immobilization of *Rhodococcus sp.* AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1-5, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.16, p.933-942, 1994.

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

HARUN, R.; JASON, W.S.Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M.K. **Microalgal biomass as cellulosic fermentation feedstock for bioethanol production**. Disponível em <www.elsevier.com/locate/rser>. Acesso em: Nov. 2010.

HECTOR, R.E.; MERTENS, J.A.; BOWMAN, M.J.; NICHOLS, N.N.; COTTA, M.A.; HUGHES, S.R. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast**, v.28, p.645-660, 2011.

- HERNÁNDEZ, R.M.; ORIVE, G.; MURUA, A.; PEDRAZ, J.L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. **Advanced Drug Delivery**, v.62, p.711-730, 2010.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane ad agave bagasse. **Bioresource Technology**, v.100, p.1238-1245, 2009
- HOHENSCHUH, W.; HECTOR, R.; MURTHY, G.S. A dynamic flux balance model and bottleneck identification of glucose, xylose, xylulose co-fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v.188, p.153-160, 2015.
- HROMADKOVA, Z.; KOVACIKOVA, J.; EBRINGEROVA, A. Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corncob xylan. **Industrial Crops and Products**, v.9, p.101-109, 1999.
- JANIS, J.; PASANEN, S.; ROUVINEN, J.; et al. Characterization of the pH-dependent dissociation of a multimeric metalloprotein *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase by ESI FT-ICR mass spectrometry, **J. Mass Spectrom.**, v. 43, p. 1376–1380, 2008.
- JIN, Y.S.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6816-6825, 2004.
- JIRKU, V. Whole cell immobilization as a means of enhancing ethanol tolerance. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 3, p. 147-151, 1999.
- JO, S.E.; SEONG, Y.J.; LEE, H.S.; KIM, S.J.; PARK, K.; PARK, Y.C. Microaerobic conversion of xylose to ethanol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SX6^{MUT} expressing cofactor-balanced xylose metabolic enzymes and deficient in ALD6. **Journal of Biotechnology**, v.227, p.72-78, 2016.
- JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v.102, p.186-193, 2011.
- JUNTER, G.A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome em leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v.22, p.633-658, 2004.
- KAMALIAN, N.; MIRHOSSEINI, H.; MUSTAFA, S.; MANAP, M.Y.A. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. **Carbohydrate Polymers**, v.111, p.700-706, 2014.
- KASUMI, T.; HAYASHI, K.; TSUMURA, N. Roles of Magnesium and Cobalt in the Reaction of Glucose Isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41. **Agric. Biol. Chem.**, v.46, p.21-30, 1982.

- KEWELOH, H.; HEIPIEPER, H.J.; REHM, H.J.. Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. *PPL. Microbiol. Biotechnol.*, v.31, p.383-389, 1989.
- KO, J.K.; UM, Y.; WOO, H.M.; KIM, K.H.; LEE, S.M. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. *Bioresource Technology*, v.209, p.290-296, 2016.
- KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, v.21, p.377-397, 2004.
- KRAHULEC, S.; PETSCHACHER, B.; WALLNER, M.; LONGUS, K.; KILMACEK, M.; NIDETZKY, B. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xilose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial cell factories*, v. 9, p.16, 2010.
- KRISCH, J.; SZAJÁNI, B. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. *Biotechnology Letters*, v. 19, p. 525-528, 1997.
- KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: new insights. *Applied Energy*, v.88, p.1999-2012, 2011.
- KUYPER, M.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research*, v.4, p.655-664, 2004.
- LADISCH, M.R.; EMERY, A.; RODWELL, V. W. Economic implications of purification of glucose isomerase prior to immobilization, *Industrial & Engineering Chemistry: Process Design & Development*, v. 16, p. 309-313, 1977.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p.680 – 685, 1970
- LAMA, L.; CALANDRELLI, V.; NICOLAUS, B. Purification and characterization of thermostable xylanase and beta-xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Res. Microbiol.*, v.155, p.283-289, 2004.
- LANZA, R.P.; KUHTREIBER, W.M.; ECKER, D.; STARUK, J.E.; CHICK, W.L. Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation*, v.59, p.1377-1384, 1995.
- LAOPAIBOON, P.; THANI, A; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology*, v.101, p.1036-1043, 2010.
- LASTICK, S.M.; TUCKER, M.Y.; BEYETTE, J.R.; NOLL, G.R; GROHMANN, K. Simultaneous fermentation and isomerization of xylose. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 30, p. 574-579, 1989.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v.23, p.367-380, 2002.

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Alginate: properties and biomedical applications. **Prog Polym Sci**, v.37, n.1, p.106-126, 2012.

LI, Y.; LI, G.; GOU, M.; XIA, Z.; TANG, Y.; KIDA, K. Functional expression. Of xylose isomerase in flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.121, n.6, p.685-691, 2016.

LI, C.; TAN, T.; ZHANG, H.; FENG, W. Analysis of the conformational stability and activity of *Candida Antarctica* lipase B in organic solvents. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.37, p.28434-28441, 2010.

LIM, L. H.; SAVILLE, B. A. Thermoinactivation Mechanism of Glucose Isomerase, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115 p. 136–140, 2007.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.449-467, 2012.

LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Cost evaluation of cellulose enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v.39, p.133-140, 2016.

LIU, Z.; WU, J.C. Ethanol Production by *In situ* Xylose Isomerization Using Recombinant *Escherichia coli* and Fermentation Using Conventional *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 961-985, 2012.

LIU, Z.; TYO, K.E.J.; MARTÍNEZ, J.L.; PETRANOVIC, D.; NIELSEN, J. Different Expression Systems for Production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v.109, n.5, p.1259-1268, 2012.

LUONG, J.H.T. Cell immobilization in κ -carrageenan for ethanol production. **Biotechnol Bioeng**, v.27(12), p.1652-1661, 1985.

LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. **Annual Review of Energy and Environmental**, v.21, p.403–465, 1996.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D.K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **Journal of Nanobiotechnology**, v.9, p.55, 2011.

MANRICH, A. **Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas**. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Fevereiro de 2012.

- MANRICH, A., KOMESU, A., ADRIANO, W. S., TARDIOLI, P. W., GIORDANO, R. L. C. (2010). Immobilization and stabilization of xylanase by multipoint covalent attachment on agarose and on chitosan supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 161(1-8), 455–67. doi:10.1007/s12010-009-8897-0
- MARIS, A.J.A.; WINKLER, A.A.; KUYPER, M.; LAAT, W.T.A.M.; DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. In: SCHEPER, T. **Biofuels**. Berlin: Springer, 2007. cap-7, p.179-204.
- MARQUES, F. Bagasse is the Target. **Pesquisa FAPESP**, Special Issue, p.32-36, 2011. Martani et al (2013)
- MARTIN, C. Biorrefinaria Industrial. **O Papel**, p.30-36, 2011
- MATEO, C., ABIAN, O., BERNEDO, M., CUENCA, E., FUENTES, M., FERNANDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J.M., GRAZU, V., PESSELA, B.C.C., GIACOMINI, C., IRAZOQUI, G., VILLARINO, A., OVSEJEVI, K., BATISTA-VIERA, F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUIÁN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, 37 (4), pp. 456-462, 2005.
- MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1451-1463, 2007..
- MEIJNEN, J.; RANDAZZO, P.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R. et al. Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v.9, p.5, 2016.
- MILESSI, T.S.S.; KOPP, W.; ROJAS, M.J.; MANRICH, A.; BAPTISTA-NETO, A.; TARDIOLI, P.W.; GIORDANO, R.C.; LAFUENTE, R.F.; GUIAN, J.M.; GIORDANO, R.L.C. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v.259, p.130-139, 2016.
- MILESSI, T.S.S. **Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of Rhizomucor, Mucor in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, n.4, p.1020-1029, 2004.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, 426-428, 1959.
- MONTAÑO, I.D.C. **Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2013.

- MORAES, G.S. **Influência da linhagem da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da xilose**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2013.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673-686, 2005.
- MOYSÉS, D.N.; REIS, V.C.B.; ALMEIDA, J.R.M.; MORAES, L.M.P.; TORRES, F.A.G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.207, 2016.
- MURAKAMI, M. T., RULLER, R., WARD, R. J., & ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the mesophilic xylanase A from *Bacillus subtilis* 1A1. **Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications**, 61(Pt 2), 219–20. doi:10.1107/S1744309105000904, 2005
- MUSSATO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CAMEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, p.817-830, 2010.
- NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.578-597, 2010.
- NAKATA, T.; MIYAFUJI, H.; SAKA, S. Ethanol production with β -xylosidase, xylose isomerase, and *Saccharomyces cerevisiae* from the hydrolysate of Japanese beech after hot-compressed water treatment. **J Wood Sci**, v. 55, p. 289-294, 2009.
- NIGAM, J.N.; MANDAL, S.K.; SINGH, R. Continuous ethanol production from D-xylose II using immobilized cells of *Clavispora opuntiae*. **Energy sources part A**, v.37, p.1629-1636, 2015.
- NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.37, p.52-68, 2011.
- NITSOS, C.K.; MATIS, K.A.; TRIANTAFYLLIDIS, K.S. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. **Chem. Sus. Chem.**, v.6, p.110-122, 2013.
- NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M.T.; KHUTORYANSKIY, V.V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v.90, p.1281-1287, 2012.
- ÖHGREN, K.; BENGTTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of Biotechnology**, v.126, n.4, p.488-498, 2006.

- OLIVEIRA, F.B.; BRAS, J.; PIMENTA, T.B.; CURVELO, A.A.S.; BELGACEM, M.N. Production of cellulose nanocrystals from sugarcane bagasse fibers and pith. **Industrial Crops and Products**, v.93, p.48-57, 2016.
- PANDEY, A.; SOCOOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66, p.25-40, 1998.
- PARK, J.Y.; PARK, D.J.; CHUNG, B.W.; MIN, J. Expression of bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* under galactose supplemented condition. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.18, p.528-532, 2013.
- PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-19, 2000.
- PENG, F.; REN, J.; XU, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6305–6317, 2009.
- PEREIRA, S.C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C.M.M.; FARINAS, C.S. 2G ethanol from whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels*, v.8, p.44, 2015.
- PINPHANICHAKARN, P.; TANGSAKUL, T.; THONGNUMWON, T.; TALAWANICH, Y.; THAMCHAIPENET, A. Purification and characterization of beta-xylosidase from *Streptomyces sp* CH7 and its gene sequence analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.7 p.727-733, 2004.
- PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (eds) **Biociencia Industrial** – Editora Edgard Blucher LTDA, 2001. v.2.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21,p.124-9, 1997.
- RABANEL, J.; BANQUY, X.; ZOUAOU, H.; MOKHTAR, M. Progress Technology in Microencapsulation Methods for Cell Therapy. **Biotechnology Progress**, v.25, n.4 p.946-963, 2009.
- RAMAKRISHNA, S.V.; PRAKASHAM, R.S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, v.77, n.1, 1999.
- RAZMOVSKI, R.; VICUROVIC, V. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. **Fuel**, v.92, p.1-8, 2012.

REIS, V.R.; BASSI, A.P.G.; SILVA, J.C.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.4, p.1121-1131, 2013.

RIANSA-NGAWONG, W.; SUWANSAARD, M.; PRASERTSAN, P. Application of palm pressed fiber as a carrier for ethanol production by *Candida shehatae* TISTR5843. **Electronic Journal of Biotechnology**, DOI: 10.2225/vol15-issue6-fulltext-1, 2012.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; SILVA, S.S. An Evaluation of different bioreactor configurations with immobilized yeast for bioethanol production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v.6, 2008.

ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSEL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, p.274-279, 2012

RODRIGUES, R.C.L.B.; ROCHA, G.J.M.; RODRIGUES JR. D.; FILHO, H.J.I., FELIPE, M.G.A.; PESSOA JR., A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v.101, p.1247-1253, 2010.

RODRIGUES, R.C., ORTIZ, C., BERENQUER-MURCIA, A., TORRES, R., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, 42 (15), pp. 6290-6307, 2013.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; FARINAS, C.S.; CARNEIRO, R.L.; SILVA, G.M.; CRUZ, A.J.G.; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C.; RIBEIRO, M.P.A. Fast Determination of the Composition of Pretreated Sugarcane Bagasse Using Near-Infrared Spectroscopy. **Bioenerg. Res.**, v. 7, p. 1441-1453, 2014.

ROMO-SANCHEZ, S.; CAMACHO, C.; RAMIREZ, H.L./ ARÉVALO-VILLENA, M. Immobilization of comercial celulase and xylanase by diferente methods using two polymeric supports. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.5, p.517-526, 2014.

ROWELL, R.M. **Handbook of chemistry and wood composites**. USA: Taylor & Francis, 2005.

SANDA, T.; HASUNUMA, T.; MATSUDA, F.; KONDO, A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, v.102, p.7917-7924, 2011.

SANTOS, J.C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 212 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.

SARASWAT, V.; BISARIA, V.S. Purification, Characterization and Substrate Specificities of Xylanase isoenzymes from *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Biosci. and Biotechnol. Biochem.** v.64, n.6, p.1173-1180, 2000

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v.37, p.19-27, 2012.

SARROUH, B.F. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leite fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: Avaliação de Parâmetros operacionais e viabilidade econômica.** 185 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2009.

SARTHY, A.V.; MCCONAUGHY, B.L.; LOBO, Z.; SUNDSTROM, J.A.; FURLONG, C.E.; HALL, B.D. Expression of the *Escherichia coli xylose isomerase* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1996-2000, 1987.

SCHELLENBERGER, A., ULBRICH, R. Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus (1989) **BiomedicaBiochimicaActa**, 48 (1), pp. 63-67.

SEMENCENKO, V.V.; MOJOVIC, L.V.; PETROVIC, S.D.; OCIC, O.J. Novi trendovi u proizvodnji bioetanol. **Hem. Ind.**, v.65, n.2, p.103-114, 2011.

SEMENOVA, M.V.; DRACHEVSKAYA, M.I.; GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of extracellular beta-xylosidases from fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei*. **Biochemistry (Mosc)**, v.74, p.1002-1008, 2009.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: the quest for optimum performance. **Adv. Synth. Catal.**, v.349, p.1289-1307, 2007.

SHOBAYASHI, M.; MITSUEDA, S.; AGO, M.; FUJII, T.; IWASHITA, K.; IEFUJI, H. Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2381-2388, 2005.

SHULER, M.L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts.** 2nd edition. Prentice Hall Inc., 2002. 576p.

SILVA, V.F.N.; NAKANISHI, S.C.; DIONÍSIO, S.R.; ROSSEL, C.E.V.; LENCZAK, J.L.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Using cell recycling batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.91, p.1853-1859, 2016.

SILVA, G.M. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol 2G.** 142p. Tese de Doutorado – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2015.

SILVA, C.R. **Produção de etanol a partir de xilose e de hemicelulose de bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae*.** Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

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

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.38, p.809-817, 2011

SILVA, N.A.; SRIKRISHNAN, S. Intrduction and expression. Of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v.12, p.197-214, 2012.

SILVA, V.F.N. **Estudo de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** 116 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, EEL-USP, 2009.

SILVA, S.S.; MUSSATO, S.I.; SANTOS, J.C.; SANTOS, D.T.; POLIZEL, J. Cell Immobilization and Xylitol Production using sugarcane bagasse as raw material. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.141, p. 215-227, 2007.

SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **Europeam jornal of pharmaceutical sciences**, v. 29, p. 148-159, 2006.

SIMS, R.E.H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technology. **Bioresource Technology**, v.101, p.1570-1580, 2010

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications.** 2nd ed. USA: Academic Press, 1993.

SLININGER, P.J.; BRANSTRATOR, L.E.; LOMONT, J.M.; DIEN, B.S.; OKOS, M.R.; LADISCH, M.R. Stoichiometry an kinetics of xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.589, p.25-40, 1990

SMITH, S.J.; CROWLEY, J.H.; PARKS, L.W. Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, p.5427-5432, 1996.

SOARES, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.1-18, 2011.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; STANLEY, G.A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.13-24, 2010.

SUAREZ, C.A.G. **Otimização da produção de etanol 2G a partir de hexoses e pentoses.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2013.

- SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicellulose. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.195-204, 2004.
- SUN, Z.J.; LV, G.J.; LI, S.Y.; XIE, Y.B.; YU, W.T.; WANG, W.; MA, X.J. Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **J Biotechnol**, v. 128, p. 150–161, 2007.
- SWINNEN, S.; GOOVAERTS, A.; SCHAERLAEKENS, K.; DUMORTIER, F.; VERDYCK, P. SOUVEREYNS, K. ZEEBROECK, G.V.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Auxotrophic Mutations reduce tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to very high levels of ethanol stress. **Eukaryotic Cell**, v.14, 2015.
- SWINNEN, S.; FERNÁNDEZ-NIÑO, M.; GONZÁLEZ-RAMOS, D.; MARIS, A.J.A.; NEVOUGT, E. The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast RES.** v.14, p.642-653, 2014.
- SWINNEN, S.; SCHAERLAEKENS, K.; PAIS, T.; CLAESEN, J.; HUBMANN, G.; YANG, Y.; DEMEKE, M.M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; GOOVAERTS, A.; SOUVEREYNS, K.; CLEMENT, L.; DUMORTIER, F.; THEVELHEIN, J.M. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. **Genome Research**, v.22, p.975-984, 2012.
- TOIVARI, M.H.; SALUSJARVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v.70, p.3681-3686, 2004.
- TROVATI, J.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. Improving the Performance of a Continuous Process for the Production of Ethanol from Starch. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.156, p.506-520, 2009.
- TSIGIE, Y.A.; WANG, C.Y.; TRUONG, C.T.; JU, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Polg grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.102, p.9216-9222, 2011
- TUBINO, L.O.; ZAMORA, M.A.M. O bioetanol é a melhor opção? Uma avaliação das novas tecnologias do bioetanol e suas implicações sócio-ambientais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE TECNOLOGIA E SOCIEDADE, 2009. **Anais do III Simpósio Nacional de Tecnologia e Sociedade**, Pato Branco, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.
- VÁZQUEZ, M.J.; ALONSO, J.L.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.387-393, 2000.
- VILELA, L.F.; ARAUJO, V.P.G.; PAREDES, R.S.; BOM E.P.S.; TORRES, A.G.; NEVES, B.C.; ELEUTHERIO, E.C.A. Enhanced xylose fermentation and ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **AMB Express**, v. 15, p. 16, 2015.

- WANG, T.; LU, S. Production of xylooligosaccharide from wheat bran by microwave assisted enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v.138, 1531-1535, 2013.
- WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86 (1), p.1-14, 1998.
- WOLF, L.D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- ZABED, H.; SAHU, J.N.; BOYCE, A.N; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.66, p. 751-774, 2016.
- ZAKARIA, M.R.; HIRATA, S.; HASSAN, M.A. Hydrothermal pretreatment enhanced enzymatic hydrolysis and glucose production from oil palm biomass. **Bioresource Technology**, v.176, p.142-148, 2015.
- ZHAN, W.; GENG, A. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. **Biotechnology for Biofuels**. v.5, p.56, 2012
- ZHANG, J.; SIIKA-AHO, M.; PURANEN, T.; TANG, M.; TENKANEN, M.; VIKARI, L. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p.1-12, 2011.
- ZHANG, T.; CHII, Z.; ZHAO, C.H.; CHI, Z.M.; GONG, F. Bioethanol production from hydrolysate of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces sp.* W0. **Bioresource Technology**, v.101, p.8166-8170, 2010.
- ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass forenzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-827, 2009.
- ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.49, p.28-32, 2010.
- ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v.21, p.1577, 2016.