

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

INTI DORACI CAVALCANTI MONTAÑO

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE MODELAGEM E SIMULAÇÃO PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

SÃO CARLOS/SP

2013

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE MODELAGEM E SIMULAÇÃO PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

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

INTI DORACI CAVALCANTI MONTAÑO

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE MODELAGEM E SIMULAÇÃO PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano
Co-orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr.

SÃO CARLOS/SP

2013

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

M765at

Montaño, Inti Doraci Cavalcanti.

Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração / Inti Doraci Cavalcanti Montaño. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
126 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia química. 2. Hidrólise enzimática. 3. Bagaço de cana. 4. Modelo metabólico. 5. Xilulose. 6. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE INTI
DORACI CAVALCANTI MONTANO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS EM 20 DE SETEMBRO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Roberto de Campos Giordano
Orientador / UFSCar



Ruy de Sousa Júnior
Coorientador / UFSCar



Antonio Carlos Luperni Horta
UFG



Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro
UFSCar



Edson Romano Nucci
UFSJ



Teresa Cristina Zangirolami
UFSCar



Adilson José da Silva
UFSCar

Dedico este trabalho a meu esposo Carlos, pelo amor e apoio incondicional durante todos esses anos, e a minha mãe, Maria Cristina, pela confiança e amor brindados ao longo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus por me acompanhar e dar proteção em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano pelos ensinamentos e apoio ao longo destes anos e sobre tudo pela confiança depositada na realização deste projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr. pelas orientações, pela paciência e dedicação e, sobretudo pela amizade.

À Prof. Dra. Isabel Rocha e ao Prof. Dr. Eugénio Campos Ferreira da Universidade do Minho (Portugal), que gentilmente colaboraram neste doutorado sanduíche. À Prof. Dra. Teresa Cristina Zangirolami e à Prof. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

A todos meus companheiros dos Laboratórios de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) e de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar pela amizade e ajuda oferecida. Agradeço especialmente ao Carlos, Adilson, Antonio Carlos, Ana Maria, Claudinha, Cíntia, Edson, Guilherme, Marcelo, Patrícia, Ursula, Agnes, Mayerlenis, Sandrinha, Cleiton, Felipe, Renata, Luciano, Cris pelos conselhos e amizade que foram muito importantes para a realização deste doutorado.

A meu esposo Carlos Alberto pelos conselhos, carinho e ajuda incondicional que serviram para me acalmar nos momentos difíceis. A minha mãe por sua confiança e apoio.

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

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A utilização de combustíveis fósseis tem um significativo impacto no meio ambiente, tornando os biocombustíveis uma alternativa renovável e ambientalmente amigável. O Brasil, por ser um dos principais produtores de açúcar e etanol, gera como principal subproduto dessa indústria, o bagaço de cana de açúcar, que é geralmente queimado para geração de energia. Entretanto, esta biomassa pode ser reaproveitada como matéria-prima para produção de bioetanol de segunda geração (2G).

A consolidação da produção industrial de bioetanol 2G baseia-se na melhoria econômica do processo. É importante, assim, o uso de ambas as frações fermentáveis presentes no bagaço de cana, de celulose (C6) e de hemicelulose (C5), para viabilizar economicamente o processo. Neste âmbito geral, o segundo capítulo desta tese de doutorado aborda um aspecto que impacta os custos da rota bioquímica para a produção de bioetanol 2G: definição de políticas operacionais ótimas para um reator de hidrólise enzimática da fração C6 do bagaço de cana de açúcar. Foi utilizado um modelo cinético de Michaelis-Menten pseudo-homogêneo, com inibição pelo produto, na modelagem dinâmica de um reator em batelada alimentada e duas políticas de alimentação foram implementadas e validadas em reatores de escala de bancada processando bagaço de cana pré-tratado.

A primeira política de alimentação foi definida com a finalidade de sustentar elevadas taxas de produção de glicose, adicionando enzima (Accellerase® 1500) e substrato simultaneamente durante o curso da reação. A segunda política aplica a teoria clássica de controle ótimo, para determinação de perfis ótimos de alimentação de substrato, a fim de maximizar o índice de desempenho proposto. Foram usados critérios econômicos para comparar o desempenho do reator operando em bateladas sucessivas e em modos de batelada alimentada. O modo batelada alimentada foi menos sensível a alterações no preço da enzima do que bateladas sucessivas. Intensificação do processo em batelada alimentada conduziu a concentrações finais de glicose de cerca de 200 g/L.

Já o terceiro capítulo foca na utilização da xilose, principal açúcar encontrado na fração C5, para fermentação a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Embora esta levedura seja incapaz de fermentar xilose, pode fermentar a D-xilulose obtida pela isomerização de xilose pela enzima glicose isomerase, gerando etanol e/ou xilitol como produtos principais. A otimização da produção de etanol requer a análise do metabolismo da xilulose. Neste contexto, o modelo metabólico em escala genômica iND750 foi utilizado e ajustado. Experiências *in silico* usando o software OptFlux foram realizadas e comparadas

com dados experimentais de cultivos em batelada de *S. cerevisiae*, com o propósito de validar o modelo e estabelecer relações entre os fluxos de assimilação de xilulose e de oxigênio e a seletividade na produção de etanol em relação a xilitol. Experimentos de isomerização e fermentação simultâneas da xilose (SIF) foram realizados em reator contínuo de leito fixo, contendo como biocatalisador pellets de alginato com enzima glicose isomerase e *S. cerevisiae* coimobilizadas. Concentrações finais de 6 g/L de etanol e 5 g/L de xilitol foram alcançadas em cultivo contínuo.

PALAVRAS-CHAVE: hidrólise enzimática, celulose, bagaço de cana, biorreator, batelada alimentada, xilose, xilulose, *S. cerevisiae*, modelo metabólico em escala genômica.

ABSTRACT

The use of fossil fuels has a significant impact on the environment, making biofuels a renewable and friendly alternative. Brazil, as one of the leading producers of sugar and ethanol, generates as main residue sugar cane bagasse, which is usually burned for power generation. However, this biomass can be reused as raw material for the production of second generation bioethanol (2G).

The consolidation of the industrial production of second-generation (2G) bioethanol relies on the improvement of the economics of the process. Thus, it is important the use of both the fermentable fractions present in sugarcane bagasse, cellulose (C6) and hemicellulose (C5), for the economically feasible process. Within this general scope, the second chapter of this thesis addresses one aspect that impacts the costs of the biochemical route for producing 2G bioethanol: defining optimal operational policies for the reactor running the enzymatic hydrolysis of the C6 biomass fraction. A simple Michaelis–Menten pseudo-homogeneous kinetic model with product inhibition was used in the dynamic modeling of a fed-bath reactor, and two feeding policies were implemented and validated in bench-scale reactors processing pre-treated sugarcane bagasse.

The first policy was defined with the purpose of sustaining high rates of glucose production, adding enzyme (Accellerase® 1500) and substrate simultaneously during the reaction course. The second approach applied classical optimal control theory, for determining optimal substrate feeding profiles, in order to maximize the performance index proposed. Economical criteria were used for comparing the reactor performance operating in successive batches and in fed-batch modes. Fed-batch mode was less sensitive to enzyme prices than successive batches. Process intensification in the fed-batch reactor led to final glucose concentrations around 200 g/L.

The third chapter, in turn, focuses on the xylose utilization, the main sugar found in the C5 fraction, for fermentation to ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Although this yeast is not capable of fermenting xylose, it is able to ferment D-xylulose obtained by isomerisation of xylose by glucose isomerase enzyme, generating ethanol and/or xylitol as the main products. The optimization of ethanol production requires the analysis of the metabolism of xylulose. In this context, the genome-scale metabolic model iND750 was adjusted.

In silico experiments were carried out using the software OptFlux and compared with experimental data of batch cultivation of *S. cerevisiae*, in order to validate the

model and establishing relationships between fluxes of assimilating xylulose and oxygen and selectivity in the production of ethanol compared to xylitol. Experiments of simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose were carried out in a continuous bioreactor containing alginate pellets as biocatalyst with enzyme glucose isomerase and *S. cerevisiae* co-immobilized. Final concentrations of 6 g/L of ethanol and 5 g/L of xylitol were achieved in continuous cultivation.

KEYWORDS: Enzymatic hydrolysis, cellulose, sugarcane bagasse, bioreactor, fed batch, xylose, xylulose, *S. cerevisiae*, genome-scale metabolic model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Parede celular de vegetais.....	27
Figura 1.2 – Fibrila de celulose	28
Figura 1.3 – Representação esquemática de uma xilana.....	29
Figura 1.4 – Representação esquemática da lignina.....	30
Figura 1.5 – Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose.....	33
Figura 1.6 – Rota de conversão de D-xilose em D-xilulose em leveduras.....	36
Figura 1.7 – Metabolismo de xilulose em leveduras.....	38
Figura 1.8 – Representação esquemática do processo de produção de etanol a partir de xilose. (a) Processo separado de isomerização e fermentação e (b) Processo de isomerização e fermentação simultâneas (SIF)	41
Figura 1.9 – Exemplo de modelo estequiométrico. (a) representação do sistema, (b) reações químicas, (c) matriz de incidência, (d) matriz estequiométrica e (e) vetor de velocidades de reação.....	48
Figura 1.10 – Interface do software OptFlux.	53
Figura 2.1 – Comparação dos dados experimentais e simulados de operação em batelada simples. Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten com inibição: $k_e = 0,112 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $k_m = 15,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $k_i = 4,5 \text{ g.L}^{-1}$. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C , pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 7,8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$	60
Figura 2.2 – Simulações da primeira política (P#1) para cada componente do vetor (r_{cte}). (a) velocidade de reação, (b) enzima total utilizada, (c) concentração de produto, (d) volume do reator.....	62
Figura 2.3 – Simulações da primeira política (P#1) para manter 60% ou mais da velocidade de reação inicial. (a) Concentração de substrato, (b) Perfil de alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Perfil de alimentação de enzima, (d) Concentração de produto.	63
Figura 2.4 – Esquema do algoritmo de simulação utilizado para resolver as equações da política de alimentação P#1	64
Figura 2.5 – Esquema do algoritmo de simulação utilizado para resolução das equações do controle ótimo.....	67

Figura 2.6 – Simulações da segunda política (P#2) (a) Perfil da variável de controle, (b) Perfil de alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Concentração de substrato, (d) Concentração de produto.....	68
Figura 2.7 – Configuração experimental para a hidrólise enzimática	72
Figura 2.8 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1. (a) Enzima alimentada, (b) alimentação de bagaço pré-tratado, (c) volume, (d) bagaço alimentado por unidade de volume, (e) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 7,8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial.L}_{\text{solução}}^{-1}}$	75
Figura 2.9 – Evolução da viscosidade aparente do meio para a política de alimentação P#1. (a) $t = 0\text{h}$, (b) $t = 30\text{h}$, (c) $t = 87\text{h}$	76
Figura 2.10 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1 para 7% de sólidos. (a) Enzima alimentada, (b) alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 13,05 \text{ g.L}^{-1} \equiv 1.409,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $77,77 \text{ g}_{\text{glicose_potencial.L}_{\text{solução}}^{-1}}$	78
Figura 2.11 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#2. (a) Alimentação de bagaço pré-tratado (b) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 13,05 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842.4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial.L}_{\text{solução}}^{-1}}$. Observação: barra de erro da dimensão dos símbolos.....	80
Figura 2.12 – Análise de sensibilidade ao preço da enzima.....	81
Figura 3.1 – Modificações realizadas ao modelo iND750. (a) utilização de xilulose como fonte de carbono e produção de xilitol a partir de xilulose, e (b) adição da via L-arabinose para produção de L-arabitol.....	90
Figura 3.2 – Comportamento dos metabólitos para o caso aeróbio ao subexpressar uma via metabólica. (a) Biomass_SC4_bal (biomassa), (b) XYLTD_D (xilitol desidrogenase) e (c) XYLTt (transporte de xilitol).	92
Figura 3.3 – Sistema para coagulação do biocatalisador composto por GI imobilizada e <i>S. cerevisiae</i> coimobilizadas em alginato de cálcio.....	101

Figura 3.4 – Pellets obtidos após coimobilização e coagulação.	101
Figura 3.5 – Sistema utilizado nos ensaios de isomerização e fermentação simultâneas de xilose em reator contínuo de leito fixo.	103
Figura 3.6 – Imagem do reator utilizado	104
Figura 3.7 – Micrografia dos pellets obtida após coimobilização. Células viáveis: não coradas e células não viáveis: coradas de azul. (a) tempo inicial e (b) após 18 dias (ampliação de 1000×).....	107
Figura 3.8 – Experimento #1: SIF de 65 g.L ⁻¹ de xilose em operação contínua, Temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador <i>S. cerevisiae</i> /enzima (6:20) e CaCO ₃ 0,5 %. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL ⁻¹ . Concentração inicial de células no reator: 30 g.L ⁻¹ . (a) Substratos e (b) Produtos.....	108
Figura 3.9 – Micrografia do acompanhamento do experimento 1. (a) t = 6h, (b) t = 82h e (c) t= 227h (ampliação de 1000×).....	109
Figura 3.10 – Experimento #2: SIF de 32,5 g.L ⁻¹ de xilose em operação contínua, Temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador <i>S. cerevisiae</i> /enzima (6:20) e CaCO ₃ 0,5 %. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL ⁻¹ . Concentração inicial de células no reator: 30 g.L ⁻¹ . (a) Tempo total de experimento, (b) 0 – 84h de experimento, (c) 72 – 150h de experimento, (d) 148 – 240h de experimento, (e) 148 – 240h de experimento.....	111
Figura C.1 – Superfície de resposta correlacionando as variáveis: fluxo de xilulose, fluxo de oxigênio e seletividade para etanol para simulações realizadas em OptFlux para o modelo anaeróbio ajustado.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.....	28
Tabela 1.2 – Modelos metabólicos em escala genômica para <i>S. cerevisiae</i> encontrados na literatura.....	51
Tabela 2.1 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.	70
Tabela 2.2 - Adição de enzima e substrato para P#1, P#2 e batelada simples.	73
Tabela 2.3 - Comparação de dados simulados e experimentais.	82
Tabela 3.1 – Comparação de dados experimentais (de crescimento e produção de metabólitos) e simulados com o modelo iND750 obtidos para a linhagem selvagem	91
Tabela 3.2 – Reações do metabolismo de <i>S. cerevisiae</i> a serem sub expressadas	91
Tabela 3.3 – Comparação dos fluxos experimentais e simulados (aeróbio).....	93
Tabela 3.4 – Comparação de dados experimentais e simulados (anaeróbio).	94
Tabela 3.5 – Simulações com vários níveis de fluxos de oxigênio e xilulose para o modelo anaeróbio ajustado.	95
Tabela 3.6 – Composição do meio de cura dos pellets, pH inicial ajustado para 5,6.....	102
Tabela 3.7 – Composição do meio SIF, pH inicial ajustado para 5,6.	103
Tabela 3.8 – Fluxos metabólicos de substratos e produtos calculados para cada intervalo de tempo do experimento contínuo #2 (concentração de xilose de 32,5 g.L ⁻¹).....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNTP	Condições normais de temperatura e pressão
C_x	Concentração celular, ($\text{g}_{\text{massa seca}} \cdot \text{L}^{-1}$)
D	Taxa de diluição (F_{feed}/V), (min^{-1})
DO	Densidade óptica
DWC	Peso de massa seca (g)
e	Concentração de enzima, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
$e_{\text{acumulada}}$	Enzima acumulada no reator, (FPU)
e_{alim}	Enzima a ser adicionada no reator, (FPU)
F_{alim}	fluxo de alimentação de substrato, ($\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)
f_i	Fluxo de caixa do processo, (US\$)
f_{i2}	Fluxo de caixa do processo por kg de bagaço tratado (US\$/kg de bagaço tratado)
H	Hamiltoniano
J	Índice de desempenho
k	Taxa constante da hidrólise de celulose, (min^{-1})
k_I	Constante de inibição competitiva, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
km	Constante de Michaelis-Menten, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
$M_{\text{acumulada}}$	Massa acumulada de bagaço consumido, (g)
m_x	Massa celular, (g)
m_s	Massa de substrato, (g)
m_p	Massa de produto, (g)
n_{CO2prod}	Mols de CO_2 produzidas ($\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$)
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidreto
P	Concentração de produto, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
P_0	Concentração inicial do produto, ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
PPP	Via das Pentose Fosfato
P_e	Pressão do gás de entrada, (atm)
P_s	Pressão do gás de saída, (atm)

Q_e	Vazão do gás de entrada, (L.h ⁻¹)
Q_s	Vazão do gás de saída, (L.h ⁻¹)
R	Constante dos gases ideais, (atm.L/mol.K)
r	Velocidade de reação, (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
$r_{inicial}$	Velocidade reação inicial, (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
r_{set}	Velocidade reação set, (g.L ⁻¹ .min ⁻¹)
S	Celulose (transformada na concentração de glicose potencial), (g.L ⁻¹)
S_0	Concentração inicial de glicose potencial, (g.L ⁻¹)
S_{alim}	Concentração de substrato no alimento, (g.L ⁻¹)
SIF	Fermentação e isomerização simultâneas
t	Tempo, (s, min ou h)
t_0	Tempo inicial, (s, min ou h)
t_f	Tempo final, (s, min ou h)
T_e	Temperatura do gás de entrada, (K)
T_s	Temperatura do gás de saída, (K)
u	Variável de controle
V	Volume de reação, (L)
V_0	Volume inicial de reação, (L)
x	Variável de estado
X	Conversão de substrato
y_{CO_2e}	Fração molar de CO ₂ na entrada
y_{CO_2s}	Fração molar de CO ₂ na saída
y_{N_2e}	Fração molar de N ₂ na entrada
y_{N_2s}	Fração molar de N ₂ na saída
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato a células, (g _{massa seca} .g ⁻¹ _{substrato})
$Y_{X/P}$	Fator de rendimento de células a produto, (g _{produto} .g ⁻¹ _{massa seca})
$Y_{X/M}$	Fator de rendimento de células a metabólito, (g _{metabolito} .g ⁻¹ _{massa seca})
λ	Multiplicador de Lagrange

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS	26
1	BIOCOMBUSTÍVEIS DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)26
2	COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS27
3	HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA30
3.1	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CELULOSE32
3.2	HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE34
4	ASSIMILAÇÃO DE PENTOSSES POR <i>S. cerevisiae</i>35
4.1	FERMENTAÇÃO DE D-XILOSE35
4.2	FERMENTAÇÃO DE D-XILULOSE37
5	PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE D-XILOSE VIA FERMENTAÇÃO E ISOMERIZAÇÃO SIMULTÂNEAS (SIF)40
6	FORMULAÇÃO DO PROBLEMA DO CONTROLE ÓTIMO42
6.1	PRINCÍPIO DO MÁXIMO DE PONTRYAGIN44
7	ANALISE DE FLUXOS METABÓLICOS APLICADA AO CONSUMO DE D-XILULOSE POR <i>S. cerevisiae</i>45
7.1	ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS (FBA)46
7.1.1	MODELOS METABÓLICOS EM ESCALA GENÔMICA47
7.1.2	ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS (FBA)49
7.2	MODELOS METABÓLICOS EM ESCALA GENÔMICA50
7.3	SOFTWARE OptFlux52

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE DIFERENTES POLÍTICAS DE ALIMENTAÇÃO DE UM REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO C6 DO BAGAÇO DE CANA.....54

1	MODELAGEM DO BIORREATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	54
1.1	PRIMEIRA POLÍTICA (P#1): ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E ENZIMA	56
1.2	SEGUNDA POLÍTICA (P#2): CONTROLE ÓTIMO.....	57
2	SIMULAÇÕES USANDO O SOFTWARE MATLAB.....	58
2.1	PRIMEIRA POLÍTICA (P#1): ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E ENZIMA	60
2.2	SEGUNDA POLÍTICA (P#2): CONTROLE ÓTIMO.....	65
3	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL.....	69
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1.1	Enzima e substrato.....	69
3.1.2	Procedimentos de Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar	70
3.1.3	Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	71
3.1.4	Quantificação de Açúcares	73
3.2	VALIDAÇÃO DA PRIMEIRA POLÍTICA (P#1): ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E ENZIMA.....	73
3.3	SEGUNDA POLÍTICA (P#2): CONTROLE ÓTIMO.....	79
3.4	SENSIBILIDADE AO PREÇO DA ENZIMA	81
4	CONCLUSÕES.....	83

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO METABOLISMO DE XILULOSE EM *S. cerevisiae* VISANDO À MELHOR PRODUÇÃO DE ETANOL EM SISTEMA SIF.84

1	ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS EM <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A PARTIR DE D-XILULOSE COMO FONTE DE CARBONO UTILIZANDO OPTFLUX.....	84
1.1	MATERIAIS E MÉTODOS	85
1.1.1	Modelo metabólico.....	85

1.1.2	Software.....	85
1.1.3	Dados experimentais.....	85
1.1.4	Metodologia de cálculo dos fluxos metabólicos.....	87
1.2	RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
1.3	CONCLUSÕES	96
2	PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE EM CULTIVOS SIF.....	97
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS	98
2.1.1	Microrganismo	98
2.1.2	Produção de levedura viável para coimobilização	98
	Preparação de Placas de Petri em meio com ágar:	98
	Preparação do inóculo:	99
2.1.3	Enzima glicose isomerase imobilizada em glutaraldeído-quitosana	99
2.1.4	Coimobilização de glicose isomerase imobilizada e <i>S. cerevisiae</i> em alginato de cálcio 100	
	Sistema de coimobilização:	100
2.1.5	Procedimento Experimental: Isomerização e fermentação simultâneas (SIF) de xilose em reator contínuo de leito fixo	102
2.1.6	Métodos Analíticos.....	105
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÕES	106
2.2.1	Experimento contínuo #1: xilose (65 g.L ⁻¹), sem suplementação de ar	107
2.2.2	Experimento contínuo #2: xilose (32,5 g.L ⁻¹) e oxigênio (3 e 7,5 ml.min ⁻¹)....	110
2.3	CONCLUSÕES	113
	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</u>	114
	<u>APÊNDICE A.....</u>	117
	<u>APÊNDICE B.....</u>	119
	<u>APÊNDICE C.....</u>	120
	<u>REFERÊNCIAS</u>	121

INTRODUÇÃO

A crise energética que começou nos anos 70 diminuiu a oferta do petróleo e elevou significativamente seu preço, criando a necessidade de desenvolver uma forma alternativa de energia para substituir a gasolina. Essa necessidade tornou o Brasil o pioneiro no uso de etanol combustível em larga escala. A produção de açúcar e etanol combustível gera como principal resíduo o bagaço de cana de açúcar, que é um resíduo lignocelulósico, geralmente queimado para geração de energia. Entretanto, esta biomassa pode ser reaproveitada como matéria-prima para produção de bioetanol de segunda geração (2G), que é um biocombustível renovável e ambientalmente seguro.

O bagaço de cana de açúcar é constituído por partículas possuindo um tamanho médio de 20 mm, contendo em torno de 50% de umidade (SCHLITTLER, 2006). A composição do bagaço de cana depende das condições atmosféricas e do tipo de microrganismos aos quais a cultura foi exposta no campo. Banerjee e Pandey (2002) relatam que o bagaço de cana contém 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina e de 3,2 a 5,5% de cinzas. Para que o bagaço de cana possa ser aproveitado é preciso que o mesmo passe primeiramente por etapas de pré-tratamento, onde ocorre a separação da celulose, hemicelulose e lignina. A hidrólise ácida ou enzimática da celulose e da hemicelulose gera monossacarídeos que poderão então ser utilizados na produção de etanol. A glicose é o principal açúcar obtido a partir da fração de celulose e xilose considerado o açúcar mais abundante na hemicelulose.

A hidrólise enzimática da celulose presente no bagaço (a fração C6 da biomassa) exige a ação sinérgica de enzimas com diferentes especificidades chamadas celulasas, que trabalham juntas para hidrolisar ligações β -1,4-glicosídicas. Estas são divididas em três principais grupos, segundo o seu mecanismo de ação: as endoglucanases, as celobiohidrolases e as β -glicosidases. Este processo é extremamente complexo e é afetado por vários fatores como: efeitos inibitórios dos produtos, adsorção improdutiva da enzima, principalmente sobre a lignina ainda presente após o pré-tratamento, resistência ao transporte de massa e efeitos de "interferência" (superlotação das enzimas sobre a matriz de substrato), dentre outros (ROTHSCHILD, 1998; WILLIAMS, 2001). Assim, o modelo cinético do processo está longe de ser trivial, como descrito em Sousa Jr. et al. (2011).

Muitos modelos cinéticos foram desenvolvidos para a hidrólise enzimática da celulose, mas poucos são atualmente utilizados na otimização e/ou controle de processos. Frequentemente a otimização é baseada principalmente em diferentes abordagens empíricas e semi-empíricas (modelos não-mecanísticos e semi-mecanísticos), incluindo equações cinéticas simples. Modelos pseudo-homogêneos, com dois ou três parâmetros, são frequentemente aplicados. Eles descrevem de um modo muito simplificado os fenômenos que ocorrem neste sistema complexo, mas podem mostrar uma boa aderência aos dados experimentais (SOUSA JR. et al. 2011).

Hidrólise de celulose utilizando cargas elevadas de sólidos é uma alternativa atraente, reduzindo os custos de operação, a necessidade de água e aumentando a concentração de produto (HODGE et al., 2008). A utilização de reatores em batelada alimentada pode minimizar os custos do processo, aumentando os rendimentos e produtividades ao utilizar políticas de alimentação racionais de substratos e catalisadores para o reator. Gupta et al., (2012) realizaram a hidrólise enzimática em cargas de sólidos elevadas (até 20%, m/v), onde uma estratégia de batelada alimentada foi implementada para aumentar a concentração final de açúcar para 127 g/L.

Para aumentar a viabilidade econômica do processo de produção de bioetanol 2G, é importante que celulose (fração C6) e hemicelulose (fração C5) sejam fermentados. Nesse contexto, o microrganismo ideal seria aquele capaz de utilizar todos os açúcares gerados no processo de hidrólise (CHENG et al., 2008).

O principal microrganismo utilizado na produção industrial de álcool combustível é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (INGLEDEW, 1993), por reunir atributos como: alta tolerância ao etanol, tolerância à variação de temperatura, dentre outros, além da eficiente capacidade em converter açúcares rapidamente em etanol. Porém, infelizmente, este microrganismo é incapaz de fermentar xilose (CHU; LEE, 2007). No entanto, embora *S. cerevisiae* não utilize xilose, pode fermentar a xilulose obtida pela isomerização de xilose pela enzima glicose isomerase.

Embora glicose isomerase seja capaz de converter xilose a xilulose com atividade significativa, a relação de equilíbrio xilose/xilulose é elevada (5:1). Uma forma de aumentar a conversão de xilose é conduzir a isomerização frente à remoção de xilulose. Fermentação e isomerização simultâneas (SIF), onde a isomerização da xilose e a fermentação da xilulose a etanol ocorrem simultaneamente, é uma alternativa para aumentar o consumo de xilose. No entanto, o processo simultâneo tem limitações intrínsecas devido ao pH e temperatura mais adequados para executar a fermentação (pH 4-5; temperaturas entre 30 e 35

°C) serem muito menores do que os necessários para obter a atividade máxima da enzima (pH 7-8 , temperatura 70 °C), tornando-se um problema de otimização (SILVA et al., 2012).

A fermentação de xilulose por *S. cerevisiae* pode gerar etanol e/ou xilitol, dependendo das condições de cultivo e das características da linhagem empregada (FOGEL et al., 2005). Porém, a formação de ambos é de fato determinada pelos fluxos metabólicos que percorrem a complexa rede de reações intracelulares, em particular aqueles que integram as vias de assimilação de pentoses pela célula. Desta forma, o desenvolvimento de um processo para conversão eficiente de xilose/xilulose em etanol/xilitol por *S. cerevisiae* depende do entendimento detalhado da assimilação desses açúcares pela Via Pentose Fosfato (PPP – Pentose Phosphate Pathway) e da construção de modelos matemáticos representativos das reações intracelulares direta e indiretamente relacionadas à produção de etanol.

Técnicas experimentais disponíveis atualmente permitem o desenvolvimento e a validação de modelos mais complexos, representando mais fielmente o conjunto de reações intracelulares, com destaque para os modelos metabólicos. Os modelos metabólicos permitem efetuar simulações de sistemas celulares, viabilizando o estudo *in silico* das respostas celulares perante perturbações ambientais e genéticas. Assim, por meio desses modelos, é possível avaliar necessidades nutricionais e otimizar a produção de compostos alvo através de alterações direcionadas do metabolismo (OBERHARDT et al., 2009).

Neste contexto, no presente trabalho foram aplicadas técnicas de modelagem e simulação para a otimização do processo de conversão da fração C6 presente no bagaço de cana de açúcar em monossacarídeos a serem utilizados na produção de bioetanol de segunda geração. Além disso, foram utilizadas ferramentas da Biologia de Sistemas (experiências *in silico*) para a otimização da produção de etanol a partir de xilose (fração C5) pelo processo SIF. O trabalho está dividido da seguinte forma:

No capítulo 1, “REVISÃO BIBLIOGRÁFICA”, apresentam-se os conceitos mais importantes relacionados à produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos. Apresenta-se também a formulação do problema do controle ótimo, bem como os conceitos da biologia de sistemas mais utilizados neste trabalho.

No capítulo 2, “ESTUDO DE DIFERENTES POLÍTICAS DE ALIMENTAÇÃO DE UM REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO C6 DO BAGAÇO DE CANA”, são descritas duas políticas de alimentação diferentes, com base em equações cinéticas simples, as quais foram validadas usando reatores em escala de bancada. A primeira política fez uso da alimentação de substrato e enzima, para sustentar altas taxas de

produção de glicose. A segunda só considera a alimentação de substrato ao reator em batelada alimentada, e foi definida utilizando a teoria clássica do controle ótimo.

No capítulo 3, “ESTUDO DO METABOLISMO DE XILULOSE EM *S. cerevisiae* VISANDO À MELHOR PRODUÇÃO DE ETANOL EM SISTEMA SIF”, estudou-se o metabolismo da xilulose pela PPP de *S. cerevisiae* com o auxílio das metodologias da Biologia de Sistemas. O modelo metabólico em escala genômica iND750 foi ajustado e utilizado para estabelecer relações entre os fluxos metabólicos de xilulose e oxigênio, e a seletividade na produção de etanol ou xilitol. Estas relações foram utilizadas para planejamento de experimentos em reator contínuo de leito fixo em sistema SIF para produção de etanol.

No capítulo 4, “CONSIDERAÇÕES FINAIS”, apresentam-se as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1 BIOCOMBUSTÍVEIS DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

O uso mundial cada vez maior de combustíveis fósseis (petróleo, gás e carvão) leva ao aumento das emissões de dióxido de carbono (CO_2), causando aquecimento global. Estes combustíveis são substâncias de origem mineral formadas por compostos de carbono, que são originados pela decomposição da matéria orgânica (depósitos fósseis, etc.), tendo sido submetidas a condições com pouco oxigênio e elevadas condições de pressão e temperatura. Todavia, este processo leva milhões de anos. Logo, são considerados recursos naturais não renováveis (ZHANG, 2008).

Os biocombustíveis de primeira geração são fontes alternativas para substituir os combustíveis fósseis, por serem renováveis. Estes biocombustíveis são geralmente derivados da cana-de-açúcar, soja, milho, dentre outros, e sua produção ocorre através da fermentação. Por serem criados a partir de alimentos de consumo da população, podem desencadear riscos sociais, tais como: diminuição da produção alimentar para focar no mercado de combustíveis; impacto negativo nos preços dos produtos alimentares, tais como açúcar, beterraba e milho; maior utilização de agrotóxicos na agricultura (SIMAS, 2010).

Já os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de matérias-primas diversas que não são usadas na alimentação humana (palha, bagaço de cana, dentre outros). Estas matérias-primas são geralmente resíduos agrícolas, que são fontes diversas de materiais lignocelulósicos (SIMAS, 2010).

Os materiais lignocelulósicos como bagaço de cana e outros resíduos agrícolas podem ser convertidos a etanol e são constituídos basicamente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. Estes polímeros podem ser convertidos a açúcares fermentáveis por processos físicos, químicos e/ou biológicos.

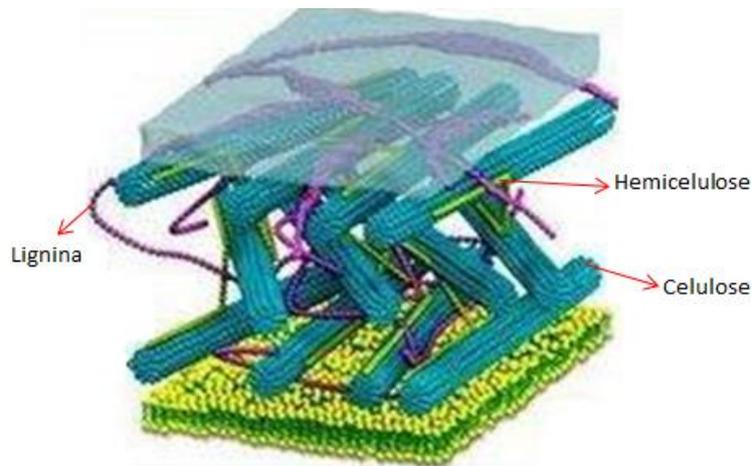
O bioetanol ou “etanol celulósico” produzido a partir do bagaço de cana de açúcar parte da mesma base de produção da cana de açúcar (sem necessidade de aumento da área plantada), e ainda sem concorrer com a produção do etanol convencional, que é extraído do caldo. Também não concorre com a produção de açúcar, produto que acaba sendo priorizado pelas usinas quando a demanda internacional é alta e os preços internos do etanol

estão baixos. No máximo, a concorrência direta é com o uso do bagaço para geração de energia elétrica (BRASILAGRO, 2013).

2 COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana e outros resíduos agrícolas são constituídos basicamente por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que são os principais constituintes da maioria das plantas, e estão fortemente interligados entre si por ligações covalentes e não-covalentes (ver Figura 1.1). Hemiceluloses estão associadas à celulose por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals e ligadas à lignina por ligações covalentes (WYMAN et al., 2005).

Figura 1.1 – Parede celular de vegetais.



Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito4.php>

A composição básica da biomassa lignocelulósica depende do vegetal de origem e, no caso de resíduos agrícolas, depende também da região, idade e período de coleta do material. A Tabela 1.1, mostra a composição de alguns materiais lignocelulósicos.

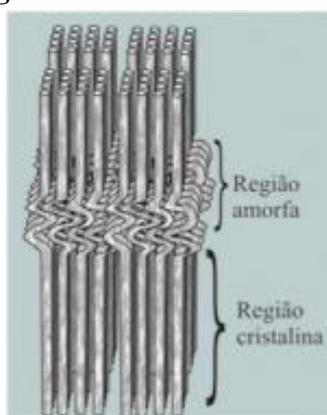
Conforme observado na Tabela 1.1, a composição destes materiais é muito variável; o maior componente é a celulose, seguido de hemicelulose e lignina. Cinzas e outros constituintes, denominados extrativos, compõem a fração remanescente destas biomassas vegetais (RABELO, 2007).

Tabela 1.1 – Composição química de alguns materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
Fibra de Bagaço	32 - 48	19 - 24	23 - 32	3,2 – 5,5
Forragem de milho	38 - 40	28 - 35	7 - 21	3,6 - 7
Fibra de coco	36 - 43	0,15 – 0,25	41 - 45	2,7 – 10,2
Fibra de Bananeira	60 - 65	6 - 8	5 - 10	4,7
Palha de arroz	28 - 36	23 - 28	12 - 14	14 - 20
Palha de trigo	33 - 38	26 - 32	17 - 19	6 - 8
Palha de cevada	31 - 45	27 - 38	14 - 19	2 - 7

Fonte: REDDY & YANG, 2005; BANERJEE & PANDEY, 2002.

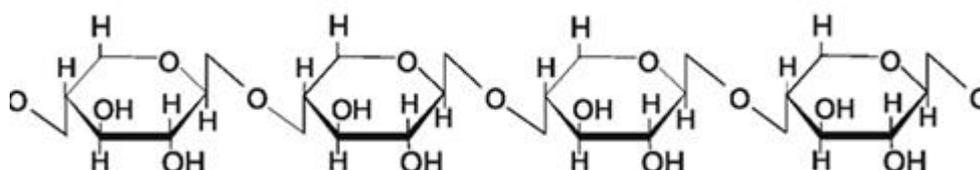
A celulose é o polímero linear mais abundante existente na natureza, composto por subunidades de D-glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, formando moléculas de celobiose. Estas, por sua vez, estão interligadas, formando longas cadeias chamadas de microfibrilas. A celulose pode apresentar-se na forma cristalina (celulose cristalina) ou em uma forma não-organizada (celulose amorfa) (ver Figura 1.2). Nesta última conformação, a celulose encontra-se mais suscetível à degradação enzimática (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1.2 – Fibrila de celulose

Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v32n3/a10fig02.jpg>

A hemicelulose, também chamada de poliose, é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza. Hemiceluloses diferem substancialmente da celulose por não serem quimicamente homogêneas, possuindo estruturas amorfas, com estruturas ramificadas e compostas pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e desoxiexoses) (SAHA, 2003). A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas, e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal (FENGEL; WEGENER, 1989). As hemiceluloses de madeira dura contêm principalmente xilanas, enquanto as madeiras moles contêm principalmente glicomananas (SAHA, 2003). Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar grande parte de uma estrutura molecular amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e mais fácil de ser degradada do que a celulose. A Figura 1.3 mostra a representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas.

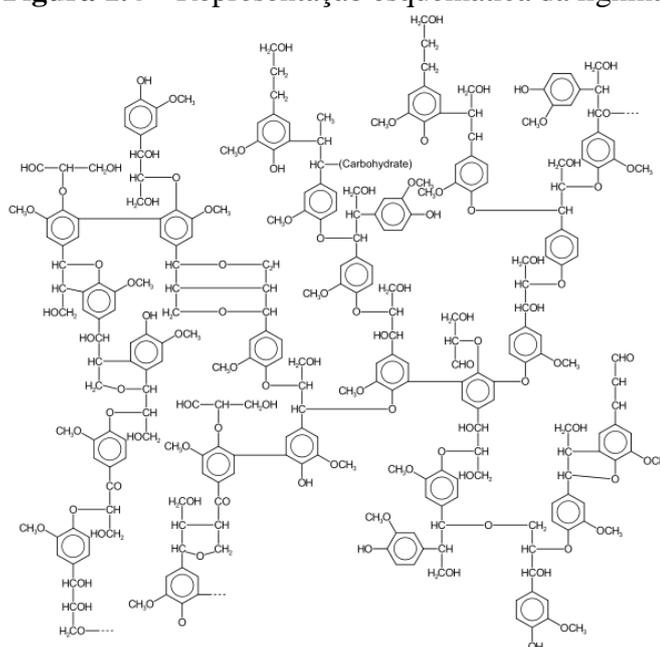
Figura 1.3 – Representação esquemática de uma xilana.



Fonte: http://www.biotek.com/assets/tech_resources/11087/figure3.jpg

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos. Estruturalmente, a lignina é um heteropolímero amorfo de natureza aromática muito complexa, não solúvel em água e opticamente inativo, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxicinamílicos p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (ver Figura 1.4). Consiste em unidades de fenilpropano unidos por ligações C-C e de aril-éter com aril-glicerol β -aril-éter. A lignina é responsável pelo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano da célula (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1.4 – Representação esquemática da lignina.



Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg

Os materiais lignocelulósicos podem conter também cinzas e outros constituintes, denominados extrativos. As cinzas representam basicamente os minerais, quanto maior o teor de cinzas, menor o poder calorífico dos materiais lignocelulósicos, pois os minerais não participam do processo de combustão (BRAND, 2010). Já os extrativos são definidos como compostos que podem ser extraídos de materiais lignocelulósicos, tanto por solventes polares quanto por apolares, e que não são componentes estruturais da parede celular. Dentre os extrativos mais comuns encontram-se alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água), ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas, esteróides, e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) (PINO et al., 2008).

3 HIDRÓLISE DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A presença da lignina reduz a eficiência da hidrólise de materiais lignocelulósicos, (por causa da adsorção ineficaz de enzima sobre a lignina) existe a necessidade de realizar inicialmente um processo de pré-tratamento, para promover a deslignificação do material. O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose a fim de torná-la suscetível ao ataque enzimático (e assim aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose) e aumentar a porosidade dos

materiais (WYMAN et al., 2005). Além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de outros produtos que possam inibir os microrganismos fermentadores. Com o pré-tratamento é possível, também, solubilizar alguns dos constituintes, como a hemicelulose, que é quebrada em seus monômeros (WHEALS et al., 1999).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos, sendo que os mais comumente utilizados são: Termohidrólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa, explosão a vapor, Afex (ammonia fiber explosion), explosão de CO₂, ozonólise e processo organosolv (SUN & CHENG, 2005).

Após o processo de pré-tratamento, o material lignocelulósico pode ser hidrolisado através de processos químicos, físicos, enzimáticos ou uma combinação destes. Duas técnicas têm sido principalmente empregadas para a realização de hidrólise de materiais lignocelulósicos: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida utiliza ácidos diluídos ou concentrados para quebrar as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos de um polissacarídeo. Devido às diferenças entre a hemicelulose e a celulose, a hidrólise ácida ocorre em duas etapas. Na primeira etapa a fração de hemicelulose hidrolisa-se mais rapidamente, deixando os açúcares expostos no meio reacional por muito tempo, o que ocasiona a degradação e perda desses açúcares. Na segunda etapa, temperaturas mais altas são aplicadas, buscando otimizar a hidrólise da fração de celulose (GRANDA et al., 2007).

Os processos que utilizam ácidos concentrados podem atacar os equipamentos, corroendo-os. Assim, estes devem ser resistentes ao pH ácido, o que tende a elevar o custo. Também, estes reagentes são tóxicos, corrosivos e favorecem a maior precipitação de lignina solubilizada e maior formação de hidroximetilfurfural e furfural, sendo estes compostos inibidores dos processos fermentativos para produção de etanol (FENGEL; WEGENER, 1989; WYMAN, 2003). Já os processos que utilizam ácidos diluídos requerem temperaturas relativamente altas provocando maior corrosão dos equipamentos e maior degradação dos açúcares hemicelulósicos. Por não apresentar os problemas anteriormente mencionados, o processo de hidrólise enzimática representa uma opção promissora. As principais vantagens incluem condições de reação mais brandas, maior rendimento, menor número de reações secundárias e menor demanda energética, além de eliminarem o descarte de resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Contudo, são necessárias altas concentrações de enzima para atingir altas conversões de celulose, aumentando o custo de produção (EKLUND et al., 1990).

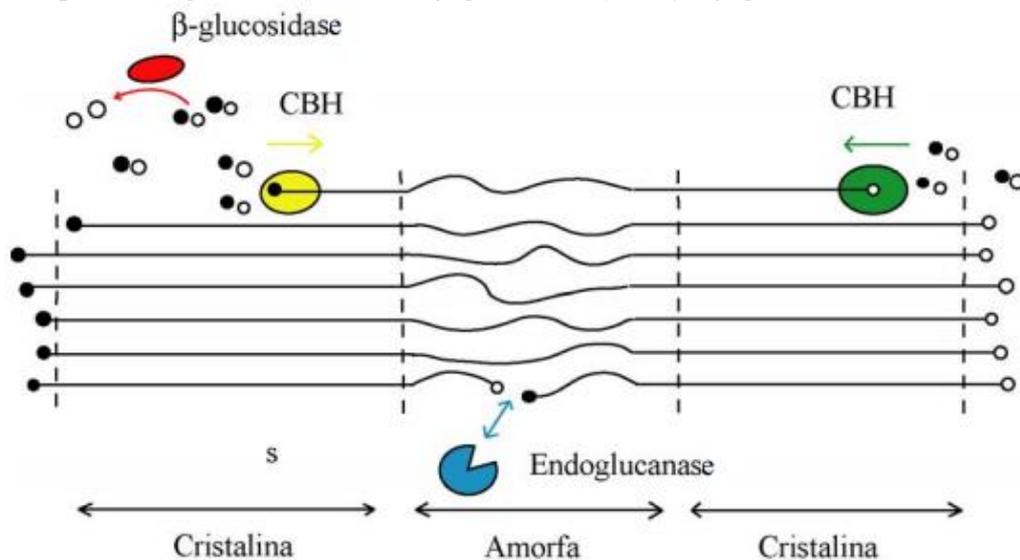
3.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE CELULOSE

Como já foi explicado anteriormente, o primeiro passo para realizar hidrólise da biomassa lignocelulósica é o pré-tratamento. O material insolúvel obtido após o pré-tratamento consiste essencialmente de celulose e lignina, uma vez que a maior parte dos açúcares da hemicelulose foram solubilizados durante esta etapa. A fim de quebrar as cadeias de celulose em monômeros de glicose, é necessário o uso de uma bateria de enzimas com diferentes especificidades chamadas celulasas, que trabalham juntas para hidrolisar ligações β -1,4-glicosídicas.

Celulasas são complexos enzimáticos que podem ser produzidos por fermentação submersa em biorreatores utilizando fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses complexos têm sido usados para gerar xaropes de carboidratos a partir de biomassa lignocelulósica, dentro da chamada tecnologia de bioetanol de segunda geração (WYMAN, 2003).

As celulasas são divididas em três principais grupos, segundo o seu mecanismo de ação. As endoglucanases ou endo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.4, EG) são capazes de hidrolisar ligações internas, preferencialmente da região amorfa, liberando novos terminais, atacando interna e aleatoriamente a cadeia de carboidrato. Contudo, são menos efetivas contra celulose cristalina, como fibra de algodão ou AVICEL. As celobiohidrolases, também chamadas de exo-1,4- β -glucanases (EC 3.2.1.91, CBH), agem sobre as extremidades geradas pelas endoglucanases. Ambas as enzimas conseguem hidrolisar a celulose na região amorfa, entretanto, na região cristalina, as celobiohidrolases apresentam maior eficiência, produzindo celobiose (que é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose). As β -glicosidasas hidrolisam celobiose e outros celo-oligossacarídeos curtos produzidos pela enzima anterior, gerando glicose como produto (ver Figura 1.5) (THONGEKKAEW, 2008).

Figura 1.5 – Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose pela endoglucanase, exo-1,4- β -glucanase (CBH) e β -glicosidase (BG).



Fonte: <http://www.avt.rwth-aachen.de/AVT/index.php?id=888&L=1>

Hidrólise de celulose utilizando cargas elevadas de sólidos é uma alternativa atraente, reduzindo os custos de operação e as necessidades de água, e aumentando a concentração final de produto (HODGE et al., 2008). Além disso, a redução do impacto dos custos de enzimas é ainda uma questão importante para a viabilidade da rota 2G-bioquímica, apesar dos progressos recentes na obtenção de coquetéis enzimáticos mais baratos.

Reatores de hidrólise de celulose operados em regime batelada alimentada podem minimizar os custos do processo. Os rendimentos e produtividades podem ser maximizados utilizando políticas ótimas de alimentação de substratos e catalisadores para dentro do reator.

Em processos de hidrólise de celulose com alta concentração inicial de sólidos, agitação e mistura podem se tornar um problema. Devido a isto, Hodge et al., (2009) desenvolveram um perfil de alimentação para manter a concentração de sólidos insolúveis em níveis gerenciáveis durante todo o andamento do processo. Deste modo, a concentração de açúcar no reator pode ser aumentada sem o uso de um carregamento inicial elevado de sólidos insolúveis.

Em Chandra et al., (2011), foram realizados ensaios de hidrólise em batelada alimentada sob as mesmas condições da hidrólise em batelada, com a diferença de que quatro cargas de substrato pré-tratado foram adicionadas ao reator de hidrólise em diferentes tempos especificados de reação, em oposição à adição de todo o substrato no início da mesma. A acessibilidade é um fator-chave que regula a capacidade das celulasas de catalisar a hidrólise,

e a adição de uma xilanase resultou em melhorias significativas em rendimentos de hidrólise e acessibilidade. Os autores concluíram que a adição de enzimas auxiliares ou a utilização de pré-tratamentos criam substratos mais acessíveis, sendo necessários para uma hidrólise eficiente a baixas cargas de enzima e elevadas cargas de sólidos.

Mais recentemente, Gupta et al., (2012) realizaram a hidrólise enzimática em cargas de sólidos elevadas (até 20%, m/v), onde uma estratégia de batelada alimentada foi implementada para aumentar a concentração final de açúcar até 127 g/L. Hidrolisados enzimáticos obtidos em processos em batelada e batelada alimentada foram fermentados com *Saccharomyces cerevisiae*, e produções de etanol de 34,78 g/L e 52,83 g/L, respectivamente, foram alcançadas.

3.2 HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE

A hidrólise ácida de hemicelulose ocorre em condições menos drásticas quando comparadas com as da celulose, por ser um polímero amorfo, sem parte cristalina. Hemiceluloses podem ser facilmente hidrolisadas a açúcares monoméricos por ácido sulfúrico diluído. Contudo, o rendimento em açúcares depende de fatores como concentração do ácido, temperatura e tempo de residência da hidrólise (UM; BAE, 2011). A princípio, a hidrólise ácida apresenta vantagens importantes sobre o processo enzimático, em virtude da disponibilidade e menor custo dos reagentes, além de ser um processo já consolidado, com maturidade tecnológica e reduzidas restrições em termos de propriedade intelectual. Todavia existem desvantagens como redução do tempo de vida dos equipamentos, produção de resíduos tóxicos e compostos não fermentáveis (como furfural, hidroximetilfurfural e outros compostos inibidores), o que aumenta consideravelmente os custos do processo (MARTIN et al., 2007).

A hidrólise enzimática da hemicelulose exige a ação sinérgica de uma mistura de enzimas conhecidas como hemicelulases. Esta hidrólise é mais complicada que a da celulose, pois sua mistura de açúcares de cinco ou seis carbonos requer diferentes enzimas para quebrá-los, incluindo endoxilanase, betaxilanase e α -L-arabinofuranosidase, entre outras (JORGENSEN, 2007). A hemicelulose é biodegradada em pentoses, hexoses e ácido acético.

A xilana é o principal carboidrato encontrado em hemiceluloses. Possui estrutura mais complexa que a celulose. Contudo, não apresenta forma cristalina, sendo,

portanto, mais acessível à hidrólise enzimática. Dentre as enzimas hidrolíticas utilizadas para a sua degradação encontram-se a endo-1,4- β -xilânase (endoxilânase) e a 1,4- β -xilosidase. A primeira ataca internamente a estrutura polissacarídica, hidrolisando as ligações β -1,4 da molécula de xilana, resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato e gerando oligossacarídeos. A segunda age nestes xilooligossacarídeos curtos, produzindo xilose (SAHA, 2003).

Além das enzimas anteriores, várias outras enzimas complementares estão envolvidas na degradação de hemicelulose. As α -L-arabinofuranosidases hidrolisam os grupos α -L-arabinofuranosil terminais. As α -glucuronidases são requeridas para a hidrólise das ligações α -1,2 glicosídicas entre xilose e ácido glicurônico ou sua ligação 4-O-metilester. As acetil xilana esterases hidrolisam as ligações entre xilose e ácido acético e ácido ferúlico. As feruloil esterases, dentre elas a ácido ferúlico esterases, aumentam a acessibilidade das fibras da hemicelulose devido à remoção do ácido ferúlico das cadeias laterais e ligações cruzadas, hidrolisando ligações feruloil ester em xilanas.

4 ASSIMILAÇÃO DE PENTOSSES POR *S. cerevisiae*

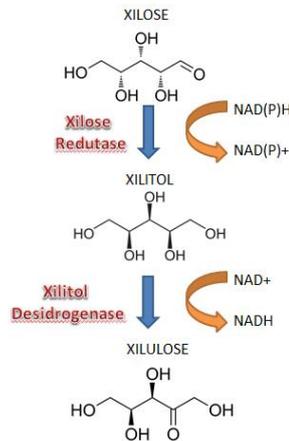
4.1 FERMENTAÇÃO DE D-XILOSE

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado industrialmente na produção álcool combustível (INGLEDEW, 1993), por apresentar alta tolerância ao etanol e à variação de temperatura, além da eficiente capacidade em converter açúcares rapidamente em etanol. Porém, infelizmente, este microrganismo é incapaz de fermentar xilose (CHU; LEE, 2007), que como já foi explicado anteriormente, é o principal açúcar obtido por hidrólise da fração de hemicelulose. Sua bioconversão é um passo importante para tornar viável a produção de etanol de segunda geração.

Em leveduras e demais organismos eucariotos, o metabolismo de D-xilose para D-xilulose ocorre num processo composto por duas etapas (ver Figura 1.6). Na primeira etapa, xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR). Já na segunda etapa, xilitol é secretado e/ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) (KOTTER e CIRIACY, 1993; PITKÄNEN et al., 2003). Estas enzimas (XR e XDH) possuem cofatores distintos (redutases com preferência por NADPH, enquanto desidrogenases utilizam apenas

NAD⁺), levando a um desequilíbrio redox (BRUINENBERG et al., 1986; JEPPSON et al., 2002).

Figura 1.6 – Rota de conversão de D-xilose em D-xilulose em leveduras.



Fonte: adaptado de Hahn-Hägerdal et al., 2004.

Em condições de anaerobiose com xilose como fonte de carbono, não há regeneração de NAD⁺ suficiente para a reação da XDH e, por outro lado, há excesso de NADPH para XR, gerando considerável produção de xilitol (MEINANDER et al., 1996). Por essa razão, o metabolismo de xilose em leveduras ocorre por respiração ou a fermentação deve ocorrer em condições micro-aeróbicas.

A incapacidade da *S. cerevisiae* em fermentar xilose tem sido estudada por vários autores. Hamacher et al., (2002) explicaram que ainda não foi descoberto um sistema de transporte específico para as pentoses, e acredita-se que a captação de xilose por leveduras seja mediada de forma não específica pelos transportadores de hexoses, sendo a absorção de xilose através destes transportadores significativamente menos eficiente em comparação à glicose. Em *S. cerevisiae* as hexoses entram na célula através da membrana citoplasmática, por difusão facilitada, sem gasto de energia, e o transporte desses açúcares é mediado por uma família de transportadores de monossacarídeos denominados HXT (VAN SUYLEKOM et al., 2007). A captação de açúcares é um dos problemas a ser resolvido para desenvolver leveduras capazes de fermentar eficientemente as pentoses (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Esta etapa é um passo-chave na regulação do metabolismo desses açúcares e a taxa de transporte é dependente do fluxo metabólico, disponibilidade de nutrientes e o número de proteínas presentes na membrana das células (KRUCKEBERG, 1996). Mesmo na levedura *P. stipitis*,

que é naturalmente capaz de fermentar xilose em etanol, a etapa limitante deste processo também é o transporte de xilose na célula (KIM et al., 1999).

Uma vez dentro da célula, xilose deve ser convertida a xilulose. Toivari et al., (2004) relataram que embora *S. cerevisiae* possua todos os genes necessários para a metabolização dessa pentose, XR e XDH apresentam baixas atividades.

A reação metabólica catalisada pela enzima xiluloquinase (XK), que converte D-xilulose a xilulose-5-fosfato, também é limitante na fermentação de xilose. Esse fenômeno tem sido atribuído a baixos níveis de atividade desta enzima na levedura. Toivari et al., (2001) construíram uma *S. cerevisiae* recombinante que superexpressa esta enzima e, quando comparada com a linhagem selvagem, o nível de assimilação de xilose aumentou, aumentando também a produção de etanol e diminuindo a produção de xilitol (este microrganismo recombinante continha também os genes das enzimas XR e XDH de *Pichia stipitis*, levedura fermentadora de xilose).

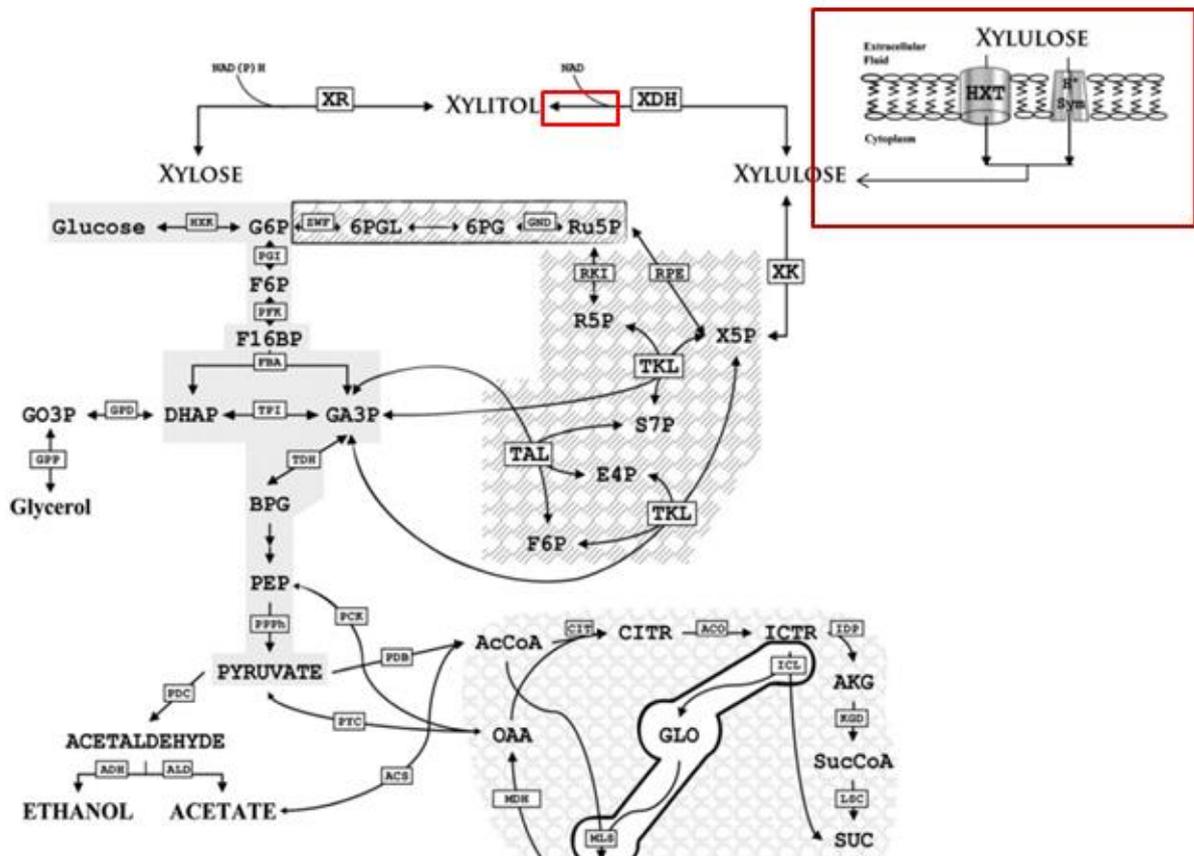
No entanto, embora *S. cerevisiae* não utilize xilose, pode fermentar a xilulose obtida pela isomerização de xilose pela enzima glicoseisomerase, como será descrito a seguir.

4.2 FERMENTAÇÃO DE D-XILULOSE

Pitkänen et al., (2003) descreveram que D-xilulose é fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK), a xilulose-5-fosfato (X5P). A D-xilulose-5-fosfato é convertida a gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e frutose-6-fosfato (F6P) através da via pentose fosfato não oxidativa, ingressando na via da glicólise e chegando a piruvato, o qual tem numerosos destinos dentro do metabolismo das leveduras. Em condições anaeróbicas, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase (PDC) a acetaldeído, que é então reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (ADH). Em condições aeróbicas, piruvato é oxidado em vários outros produtos através do ciclo de Krebs, na cadeia respiratória (ver Figura 1.7).

A via das pentoses fosfato não oxidativa é uma sequência de muitas reações reversíveis que operam perto do equilíbrio. Assim, esta etapa não tem reações irreversíveis, como quinases com grandes diferenças de energia livre de Gibbs, que conduzem as reações de forma eficiente para frente (Jeffries, 1990).

Figura 1.7 – Metabolismo de xilulose em leveduras.



Fonte: adaptado de CHU e LEE, 2007.

Abreviações: HXT, transportadores de hexoses; Sym, simporter; XR, xilose redutase (EC 1.1.1.21); XDH, xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9); XK, xiluloquinase (EC 2.7.1.17); X5P, xilulose-5-fosfato; TKL, transcetolase (EC 2.2.1.1); TAL, transaldolase (EC 2.2.1.2); S7P, sedoheptulose-7-fosfato; GA3P, gliceraldeído-3-fosfato; RPE, L-ribulose-5-fosfato 4-epimerase (EC 5.1.3.4); Ru5P, L-ribulose 5-fosfato; RKI, Ribose 5-Fosfato Isomerase (EC 5.3.1.6); R5P, ribose-5-fosfato; E4P, eritrose-4-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; GND, 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44); 6PG, 6-fosfo-D-gluconato; 6PGL, 6-fosfogliconolactona; ZWF, glicose-6-fosfato-desidrogenase (EC 1.1.1.49); G6P, glicose-6-fosfato; HXR, hexoquinase (EC 2.7.1.1); PFK, 6-fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.11); F6P, frutose-6-fosfato; F16BP, frutose 1,6-bifosfato, PGI, glicose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9); FBA, frutose-bisfosfato-aldolase; DHAP, Fosfato de di-hidroxiacetona; GPD, glicerol-3- fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.94); GO3P, glicerol-3-fosfato; GPP, glicerol-3-fosfatase (EC 3.1.3.21); TPI, Triose-fosfato isomerase (EC 5.3.1.1); TDR, gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.13); BPG, 1,3-bisfosfoglicerato; PEP, Fosfoenolpiruvato; PPPh, Fosfoenolpiruvato fosfatase (CE 3.1.3.60); PDC, piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1); ADH, álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1); ALD, acetaldeído desidrogenase (EC 1.2.1.10); ACS, acetil-CoA sintetase (EC 6.2.1.1); PYC, piruvato carboxilase (EC 6.4.1.1); PDB, piruvato desidrogenase subunidade beta (EC 1.2 .1.4); PCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (EC 4.1.1.49); AcCoA, acetil coenzima A; CIT, citrato sintase (EC 2.3.3.1); CITR, citrato; ACC, aconitase hidratase (EC 4.2.1.3); ICTR, isocitrato, AKG, alfa-cetoglutatarato; IDP, isocitrato desidrogenase quinase (EC 2.7.11.5); KGD, alfa-cetoglutatarato descarboxilase (EC 4.1.1.71); SucCoA, succinil CoA; LSC, succinil-CoA-ligase (EC 6.2.1.4) , SUC, succinato, SDH, succinato desidrogenase (EC 1.3.99.1); FUM, fumarato; FUMH, fumarato hidratase; MAL, malato, MDH, malato desidrogenase (EC 1.1.99.16); OAA, oxaloacetato, ICL, isocitrato liase (EC 4.1.3.1); GLO, glioxilato e, MLS, malato sintase (EC 2.3.3.9).

A reação metabólica catalisada pela enzima xiluloquinase (XK) é limitante na fermentação de xilulose. Esse fenômeno tem sido atribuído a baixos níveis de atividade desta enzima na levedura. Richard et al., (2000) relataram que o crescimento de *S. cerevisiae* utilizando xilulose como fonte de carbono é em torno de 6% da taxa de crescimento em glicose. Quando realizada a superexpressão de xiluloquinase nesta levedura, estimulou-se o crescimento em xilulose em torno de 20% da taxa de crescimento em glicose, enquanto sua deleção impediu o crescimento neste açúcar.

Estudos do metabolismo de xilulose consomem quantidades significativas de substrato e exigem que este se encontre o mais puro possível, mas a xilulose está disponível comercialmente apenas em pequenas quantidades e por um preço elevado, para contornar este problema, Chiang et al., (1981) implementaram um estratégia para a produção de um xarope contendo uma mistura de 30% de xilose e 70% de xilulose, usando a enzima glicose isomerase, seguida de uma extração com etanol. Este procedimento foi adotado nos trabalhos relatados a seguir.

Senac e Hahn-Hägerdal (1990) realizaram cultivos anaeróbios de *S. cerevisiae* em batelada usando xilose-xilulose como fonte de carbono, e encontraram como produto principal etanol, e como subprodutos glicerol, xilitol, e arabitól. Eles relataram que não conseguiram explicar em torno de 25% do carbono consumido (ou seja, não conseguiram fechar o balanço de carbono). A taxa de consumo de xilulose foi de 0,39 mmol. g de biomassa inicial⁻¹.h⁻¹. Nesse trabalho foram medidas as concentrações dos metabólitos intermediários de frutose-1,6-difosfato (F16BP), piruvato, sedoheptulose-7-fosfato (S7P), eritrose-4-fosfato (E4P), citrato (CITR), fumarato, malato, encontrando-se um significativo acúmulo do metabólito sedoheptulose-7-fosfato (S7P) durante a fermentação, o que sugere que as enzimas transcetolase (TKL) e transaldolase (TAL) (da via pentose fosfato não-oxidativa) são limitantes para a fermentação.

A enzima transcetolase (TKL) catalisa a conversão de xilulose-5-fosfato (X5P) e ribose-5-fosfato (R5P) para sedoheptulose-7-fosfato (S7P) e gliceraldeído-3-fosfato (GA3P), enquanto transaldolase (TAL) catalisa a conversão de S7P e GA3P para frutose-6-fosfato (F6P) e eritrose-4-fosfato (E4P) (WALFRIDSSON et al., 1995).

Chiang et al., (1981) estudaram a produção de etanol usando uma linhagem de *S. cerevisiae* comercial, utilizando como substrato uma mistura de xilose-xilulose. A fermentação de D-xilulose pela levedura resultou na produção de etanol como produto principal. Pequenas quantidades de xilitol e de glicerol foram também produzidas, sendo favorecidas em pH elevado (entre 6 e 7) e baixas temperaturas (menores que 35°C).

Ainda não foram reportados na literatura estudos mais aprofundados do metabolismo de xilulose em *S. cerevisiae* utilizando xilulose com carbono marcado (^{13}C -MFA), isto permitiria mapear os fluxos da via pentose fosfato, gerando informações valiosas que poderiam ser utilizadas para aprimorar os modelos estequiométricos disponíveis, e assim otimizar a produção de etanol.

Estudos sobre a influência da concentração do oxigênio dissolvido na fermentação de uma mistura de xilose-xilulose sem a presença de glicose por *S. cerevisiae* também não foram reportados, e fazem parte dos estudos realizados em este trabalho.

5 PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE D-XILOSE VIA FERMENTAÇÃO E ISOMERIZAÇÃO SIMULTÂNEAS (SIF)

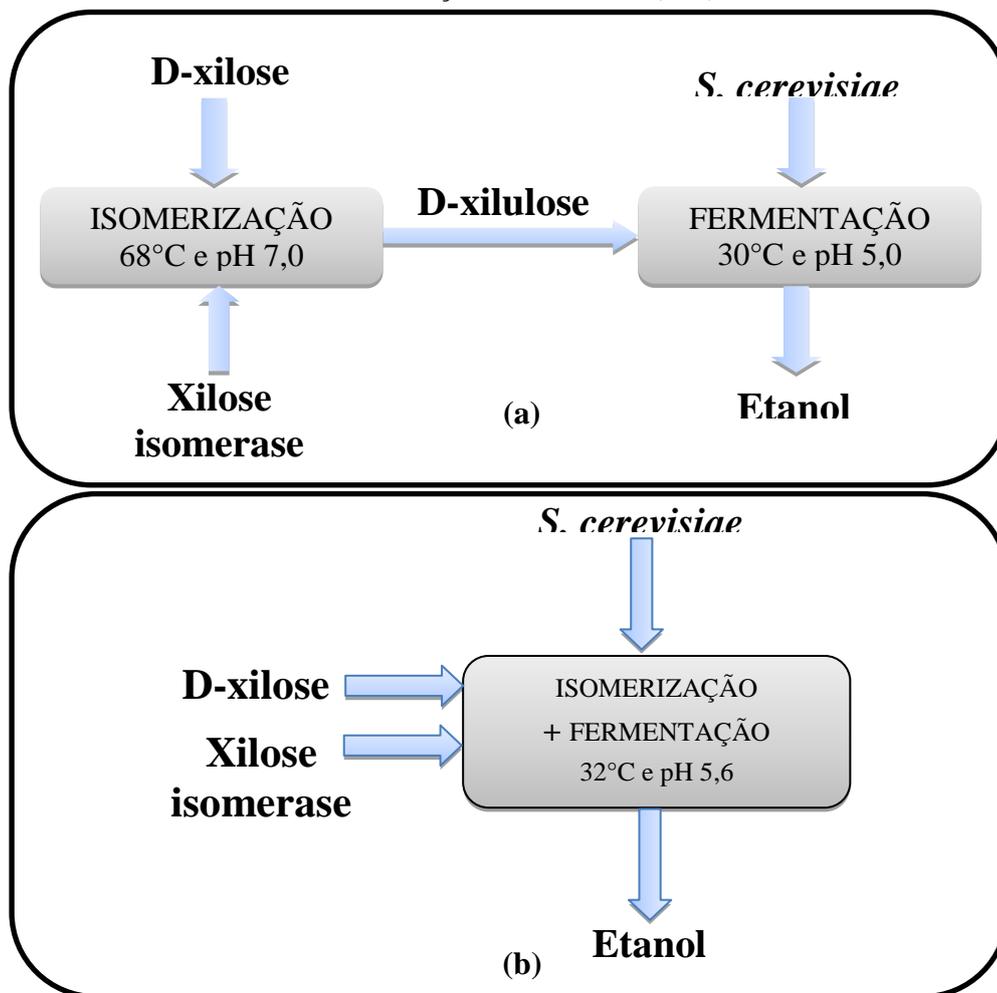
A produção de etanol de segunda geração a partir de xilose requer, como já explicado anteriormente, a isomerização deste açúcar para a obtenção de xilulose, para posterior fermentação pela levedura. Este processo pode ser realizado de duas formas. A Figura 1.8a mostra um processo em que a isomerização e a fermentação são realizadas separadamente, oferecendo condições de trabalho ótimas para a enzima e para a levedura. Já a Figura 1.8b mostra um processo no qual a isomerização e a fermentação são realizadas simultaneamente (processo SIF), de forma que a enzima e a levedura operam nas mesmas condições de temperatura e pH.

A abordagem apresentada na Figura 1.8a tem uma limitação: embora a enzima glicose isomerase seja capaz de converter xilose a xilulose, sob condições ótimas de temperatura e pH, com boa atividade, a relação de equilíbrio xilose/xilulose normalmente é elevada (da ordem de 5:1) (SILVA et al., 2012).

Por outro lado, a abordagem apresentada na Figura 1.8b (processo SIF) leva à remoção contínua de xilulose por parte da levedura, ocasionando o deslocamento do equilíbrio da isomerização no sentido da produção de xilulose, aumentando assim a conversão de xilose. Todavia, este processo também apresenta uma importante limitação: as condições de operação ótimas (pH e temperatura) são diferentes para enzima e levedura. No caso da enzima glicose isomerase, esta apresenta uma atividade ótima em pHs em torno de 7 a 8 e em temperatura em torno de 70 °C. Já no caso da levedura, o pH ótimo da fermentação está em pHs entre 4 e 5 e a temperatura entre 30 e 35°C (podendo variar segundo a linhagem).

Estudos realizados por Aquino (2013) e Silva (2013) apontaram como condições ótimas do processo SIF, temperatura de 32°C e pH 5,6.

Figura 1.8 – Representação esquemática do processo de produção de etanol a partir de xilose.
(a) Processo separado de isomerização e fermentação e (b) Processo de isomerização e fermentação simultâneas (SIF)



Fonte: arquivo pessoal.

Recentemente tem-se dado ênfase em estudos com imobilização de microrganismos, pois estes sistemas permitem o uso de alta concentração de biomassa, e por isso, obtêm-se taxas elevadas de produção, em pequenos tempos e com boa estabilidade de operação. Silva et al., (2012) prepararam um biocatalisador contendo uma linhagem de *S. cerevisiae* de panificação coimobilizada em gel de alginato de cálcio com a enzima glicose isomerase imobilizada para ser usado na SIF de xilose. Realizaram experimentos em batelada utilizando este biocatalisador (utilizando $32,5 \times 10^3$ U.I.L⁻¹ e 20 g.L⁻¹ de levedura) a 35 °C e pH inicial 5,3, o que resultou no consumo de 50 g.L⁻¹ de xilose em 48 horas, conseguindo

produzir 12 g.L^{-1} de etanol, $9,5 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol, $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol e $1,9 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético.

Na literatura relata-se a utilização de biorreatores de diferentes configurações para a realização de processos com enzima e/ou microrganismos imobilizados. O mais usado é o reator contínuo de leito fixo, por apresentar baixos custos de produção e operação e facilidade de automação do processo (GÖKSUNGUR; ZORLU, 2001).

Giordano et al., (2008) estudaram a produção contínua de etanol a partir de amido usando a enzima glicoamilase e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* co-imobilizadas em gel de pectina. Nesse estudo, foi utilizado um sistema composto por três reatores contínuos de leito fixo operando em série, alimentados com um xarope de farinha de mandioca ($163,0 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares redutores totais). Como resultado, a produtividade e o rendimento do etanol foram $5,8 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e 83 %, respectivamente, com conversão de 94 % de açúcares redutores totais.

6 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA DO CONTROLE ÓTIMO

Muitos experimentos em reator são operados em regime de batelada alimentada, levando a produtividades maiores do que a resultante a partir de operação em batelada.

O problema de otimização de reatores semi-contínuos usualmente consiste na determinação de perfil de alimentação de substrato, com o propósito de maximizar a produtividade do reator em termos do produto de interesse. Trata-se de sistema não-linear, e seu controle ótimo recai em um problema do tipo arco singular, uma vez que as variáveis de controle aparecem de forma linear no modelo e no índice de desempenho (TEBBANI et al., 2008). Esse é o caso quando o controle é a vazão mássica de substrato alimentado, como indicado nas equações de balanço mostradas no capítulo 2.

O controle ótimo em malha aberta consiste na determinação prévia de um perfil otimizado de alimentação de substrato suplementar, sem utilizar informações obtidas em tempo real durante o experimento. Esse enfoque pode ter, certamente, limitações quando no caso de sistemas biológicos, que apresentam grande incerteza no modelo cinético que representa o processo. De qualquer forma, esta abordagem é uma primeira etapa no estudo da otimização de processos reais e, nessa perspectiva, foi a metodologia empregada neste trabalho.

A determinação da trajetória ótima da variável de controle pode ser realizada mediante a aplicação do Princípio de Máximo de Pontryagin (RAMIREZ, 1994), que transforma o problema de otimização em um problema de valor de contorno em dois pontos (do inglês, TPBVP - two point boundary value problem). No entanto, resolver esse problema é numericamente difícil, pois o problema é sensível à inicialização (TEBBANI et al., 2008).

O primeiro passo no desenvolvimento da formulação matemática para a obtenção dos algoritmos de controle ótimo é a descrição, por meio das equações de estado, da dinâmica do sistema a ser controlado. A formulação apresentada aqui segue a nomenclatura de Ramirez (1994). As equações de estado são apresentadas geralmente como um conjunto de equações diferenciais de primeira ordem do tipo:

$$\frac{d\underline{x}}{dt} = \underline{f}(\underline{x}(t), \underline{u}(t), t) = \underline{\dot{x}} \quad (1.1)$$

$\underline{x}(t)$ é o vetor de variáveis de estado de dimensão n , no tempo t , $\underline{u}(t)$ é o vetor de controle de dimensão m , que especifica as variáveis de entrada no modelo do sistema, \underline{f} é o vetor de funções ($n \times 1$), e $\underline{\dot{x}}$ é o vetor das derivadas das variáveis de estado, calculadas pelas equações diferenciais que constituem o modelo.

Junto às equações de estado, temos um conjunto de condições de contorno e restrições sobre as variáveis de estado, no tempo inicial, final, e ao longo da trajetória (equações 1.2a). Nesta formulação, o modelo do sistema é reescrito como restrições de igualdade do problema de otimização (equação 1.2b):

$$\begin{aligned} \underline{x}(t_0) &= \underline{x}_0 \\ \underline{S}(\underline{x}(t), \underline{u}(t)) &\leq \underline{0} \end{aligned} \quad (1.2a)$$

$$\begin{aligned} \underline{T}(\underline{x}(t_f)) &\leq \underline{0} \\ \underline{g} = \underline{0} &= \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) - \underline{\dot{x}}(t) \end{aligned} \quad (1.2b)$$

Nas equações, \underline{x}_0 é o vetor de condições iniciais, que geralmente é conhecido, \underline{g} é o vetor de restrições de igualdade sobre a trajetória (o modelo), \underline{S} é o vetor de restrições de desigualdade sobre a trajetória, e \underline{T} é o vetor de restrições de desigualdade no estado final.

O propósito do problema de controle ótimo é determinar a política de controle que vai maximizar ou minimizar um índice específico de desempenho, sujeito a restrições impostas pela natureza física do problema. No problema de controle ótimo de sistemas dinâmicos, requer-se buscar o extremo de um índice de desempenho J , o qual é função de variáveis de estado, \underline{x} , e variáveis de controle, \underline{u} , as quais são funções do tempo t . Então, o funcional J é uma função de funções.

O índice de desempenho deve ser escolhido para que a otimização resulte em uma lei de controle implementável. A forma geral do índice de desempenho é:

$$J = h(\underline{x}(t_f), t_f) + \int_{t_0}^{t_f} F(\underline{x}, \underline{u}, t) dt \quad (1.3)$$

F é um escalar e o primeiro termo da equação (1.3) é a contribuição do estado final para o índice de desempenho, algo que acontece com frequência nos problemas de controle ótimo.

Uma vez que este é um problema de otimização com restrições, pode-se introduzir o Lagrangiano

$$L = F(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\lambda}^T (\underline{f} - \dot{\underline{x}}) \quad (1.4)$$

$\underline{\lambda}(t)$ é o vetor das variáveis adjuntas (também chamadas variáveis de co-estado) de dimensão n (multiplicadores dinâmicos de Lagrange). O funcional aumentado, se não se considerar na sua definição o termo relacionado ao estado final, h , fica:

$$J_A = \int_{t_0}^{t_f} L(\underline{x}, \dot{\underline{x}}, \underline{u}, \underline{\lambda}, t) dt \quad (1.5)$$

6.1 PRINCÍPIO DO MÁXIMO DE PONTRYAGIN

O Princípio do Máximo de Pontryagin (ou Mínimo, dependendo da formulação do problema) permitiu a inclusão de restrições sobre as variáveis de controle. Este problema pode ser transformado em um problema de dois pontos de valores de contorno através da

introdução de um vetor das variáveis adjuntas ($\underline{\lambda}(t)$). O problema, então, consiste em dois conjuntos de equações diferenciais, as equações dinâmicas do modelo matemático e as equações diferenciais das variáveis adjuntas, unidas por uma condição de otimização. Para um dos conjuntos são conhecidas somente condições iniciais e para o outro, somente condições finais. Uma dedução detalhada do equacionamento resultante pode ser encontrada em Ramirez (1994), pgs. 86-93. Aqui, reportam-se apenas as equações resultantes.

As condições necessárias para a otimização, na presença de restrições sobre $\underline{u}(t)$, são convenientemente expressas em termos do “Hamiltoniano” (H): o índice de desempenho é maximizado/minimizado, maximizando-se/minimizando H :

$$\max_{\underline{u}(t), t_f} H = F(\underline{x}, \underline{u}, t) + \underline{\lambda}^T \underline{f}(\underline{x}, \underline{u}, t) \quad (1.6)$$

Aplicando o Princípio do Máximo de Pontryagin, um conjunto de condições necessárias para maximizar ou minimizar o funcional são definidas como:

$$\text{Equação de Euler-Lagrange:} \quad \underline{\dot{\lambda}} = -\frac{\partial H}{\partial \underline{x}} \quad (1.7)$$

$$\text{Relações de Restrição:} \quad \underline{\dot{x}} = \underline{f} = \frac{\partial H}{\partial \underline{\lambda}} \quad (1.8)$$

$$\text{Transversalidade:} \quad \left[\frac{\partial h}{\partial \underline{x}}(t_f) - \underline{\lambda}(t_f) \right]^T \delta \underline{x}_f + \left(H(t_f) + \frac{\partial h}{\partial t}(t_f) \right) \delta t_f = 0 \quad (1.9)$$

$$\text{Controle Ótimo (arco singular):} \quad \varphi = \frac{\partial H}{\partial \underline{u}} = \underline{0} \quad (1.10)$$

$$\text{Controle Ótimo (bang-bang para o mínimo):} \quad \begin{aligned} u &= u_{\min} && \text{quando } \varphi > 0 \\ u &= u_{\max} && \text{quando } \varphi < 0 \end{aligned} \quad (1.11)$$

7 ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS APLICADA AO CONSUMO DE D-XILULOSE POR *S. cerevisiae*

A modelagem de sistemas biológicos vem sendo largamente empregada em bioprocessos. No entanto, até recentemente, descrições simplificadas das reações biológicas por meio de modelos não estruturados caixa branca (abordagem fenomenológica) a modelos

caixa preta (tais como redes neurais artificiais) têm sido aplicados para otimização e controle de bioprocessos.

Todavia, as técnicas experimentais disponíveis atualmente permitem o desenvolvimento e a validação de modelos mais complexos, representando mais fielmente o conjunto de reações intracelulares, com destaque para modelos metabólicos estruturados. Os modelos metabólicos permitem efetuar simulações de sistemas celulares, viabilizando o estudo *in silico* das respostas celulares perante perturbações ambientais e genéticas. Assim, por meio desses modelos, é possível avaliar necessidades nutricionais e otimizar a produção de compostos alvo através de alterações direcionadas do metabolismo (LLANERAS; PICÓ, 2008; KOLODKIN et al., 2012).

S. cerevisiae conta com vários modelos metabólicos em escala genômica. Estes modelos têm se mostrado úteis para estimar crescimentos ótimos em várias condições de cultivo, além de estimar bem a produção de subprodutos como o etanol. Uma das técnicas mais usadas para o estudo destes modelos metabólicos é a análise de balanço de fluxos metabólicos (do inglês, FBA- Flux Balance Analysis), a qual é abordada a seguir (FÖRSTER et al., 2003).

7.1 ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS (FBA)

É uma abordagem matemática que permite simular o metabolismo em escala genômica de diferentes microrganismos. Para isto, o FBA utiliza modelos biológicos baseados em reconstruções de redes metabólicas com o fim de prever o comportamento do microrganismo quando exposto a diferentes condições ambientais, como por exemplo a concentração de substrato, a concentração de nutrientes e a concentração de oxigênio, dentre outras, tornando o FBA uma ferramenta muito útil principalmente na engenharia de bioprocessos, onde é possível identificar sistematicamente alterações das vias metabólicas de leveduras, que são usadas em processos de fermentação. Isto permite melhorar os rendimentos de produtos industrialmente importantes, tais como etanol e ácido succínico (RANGANATHAN, et al., 2012).

O FBA também permite avaliar genes essenciais ou não essenciais para o crescimento, o que pode levar à identificação de objetivos para o desenvolvimento de medicamentos usados no tratamento de doenças, como é o exemplo da tuberculose (RAMAN et al., 2005). O FBA, juntamente com os modelos em escala genômica, também pode ser

usado na predição da resposta dos microrganismos após a deleção ou “*under/over expression*” de uma ou mais enzimas, o que pode ser utilizado na engenharia metabólica com o fim de obter bioprodutos de interesse (MANICHAIKUL et al., 2009).

A Análise de Balanço de Fluxos Metabólicos (FBA) é baseada no estudo de modelos estequiométricos, os quais são obtidos a partir das reconstruções em escala genômica (KAUFFMAN et al., 2003; RAMAN; CHANDRA, 2009; ORTH et al., 2010). Esta metodologia é de grande interesse, pois não requer informações da dinâmica do sistema, tornando mais simples o seu uso (KAUFFMAN et al., 2003). No entanto, o FBA requer uma função que represente de forma robusta o comportamento biológico do sistema.

7.1.1 MODELOS METABÓLICOS EM ESCALA GENÔMICA

Nos modelos estequiométricos, a variação na quantidade de um composto com o tempo, $\frac{dC_i}{dt}$, é definida como uma combinação linear da forma:

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_{j=1}^N S_{i,j} v_j, \quad (1.12)$$

onde v_j é a velocidade de reação j , $S_{i,j}$ é o coeficiente estequiométrico do composto i na reação j e N é o número de reações no sistema. Do mesmo modo, o conjunto de variações de todos os compostos C_i , onde $i = 1, \dots, M$, é representando pelo sistema de equações lineares:

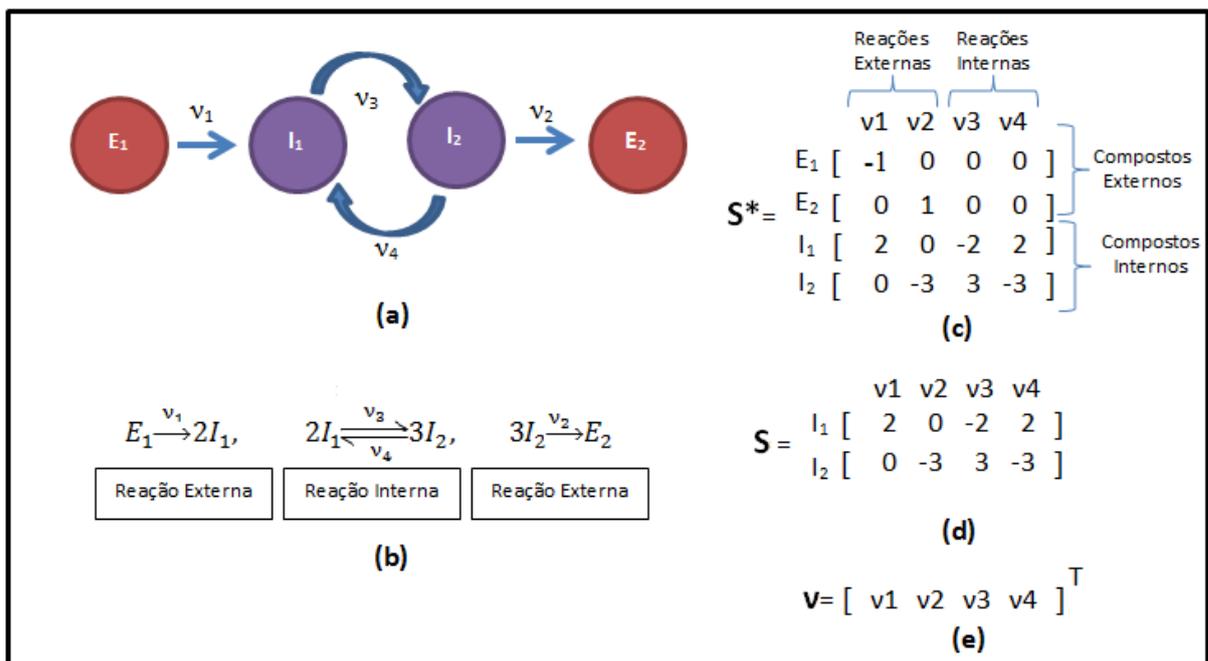
$$\frac{dC}{dt} = S\mathbf{v}, \quad (1.13)$$

onde $C = [C_1 \quad \dots \quad C_M]^T$ é o vetor de quantidades dos compostos do sistema em estudo, S é uma matriz de dimensão $M \times N$, a qual se conhece como a matriz estequiométrica, e $\mathbf{v} = [v_1 \quad \dots \quad v_N]^T$ é o vetor das velocidades de reação (vetor de distribuição dos fluxos ou vetor de fluxos). Em todo modelo metabólico o número de compostos é menor que o número de reações, ou seja, $M < N$.

A Figura 1.9 apresenta um exemplo de um modelo estequiométrico. O sistema está composto por quatro compostos cujas quantidades são: E_1 , E_2 , I_1 , I_2 e quatro reações,

cujas velocidades são: v_1 , v_2 , v_3 e v_4 . E_1 e E_2 são respectivamente a entrada e a saída do sistema, e se conhecem como compostos externos. Já os compostos internos são representados por I_1 e I_2 . Este sistema pode ser representado mediante um esquema (ver Figura 1.9a) no qual os círculos correspondem aos compostos E_1 , E_2 , I_1 e I_2 , e as setas às reações v_j (PALSSON, 2006).

Figura 1.9 – Exemplo de modelo estequiométrico. (a) representação do sistema, (b) reações químicas, (c) matriz de incidência, (d) matriz estequiométrica e (e) vetor de velocidades de reação.



Fonte: arquivo pessoal.

O conjunto de reações descrevendo o sistema é mostrado na Figura 1.9b. Neste sistema uma reação é um processo que afeta um conjunto de compostos. As reações podem ser classificadas como internas e externas. As reações internas incluem só compostos internos, já as reações externas envolvem compostos internos e externos. A quantidade de cada um dos compostos envolvidos em cada reação também é apresentada na Figura 1.9b. Por exemplo, a reação que ocorre à velocidade v_1 : por cada unidade utilizada do composto E_1 , são produzidas duas unidades do composto I_1 .

Para construir a matriz S é usada a matriz de incidência S^* de dimensões $(W + M) \times N$, como mostra a Figura 1.9c. As primeiras W linhas de S^* correspondem aos compostos externos (E_w), e as restantes correspondem aos componentes internos (C_i). As colunas de S^* correspondem às reações com velocidades v_j .

Na Figura 1.9c a coluna 1 da matriz \mathbf{S}^* corresponde à reação com velocidade v_1 . Esta coluna foi construída tendo em consideração os coeficientes que estão na Figura 1.9b. Não participam desta reação os compostos I_2 e E_2 , e portanto $S^*_{2,1} = S^*_{4,1} = 0$. O composto E_1 é consumido na reação v_1 e, portanto, o valor de $S^*_{1,1}$ é igual ao coeficiente do composto E_1 com sinal negativo, ou seja $S^*_{1,1} = -1$. Já o composto I_1 é formado na reação v_1 e, portanto, $S^*_{3,1}$ é igual ao coeficiente do composto I_1 com sinal positivo, ou seja $S^*_{3,1} = 2$.

A matriz \mathbf{S} se obtém eliminando-se as primeiras W linhas de \mathbf{S}^* , que correspondem a compostos externos. A Figura 1.9d mostra a matriz \mathbf{S} , que é resultado da eliminação das linhas $w=1,2$ de \mathbf{S}^* , que correspondem aos compostos E_1 e E_2 . A matriz \mathbf{S} atende $M < N$ ($M=2$ e $N=4$). Finalmente, a Figura 1.9e apresenta o vetor de velocidades de reação, \mathbf{v} .

7.1.2 ANÁLISE DE BALANÇO DE FLUXOS METABÓLICOS (FBA)

Para estimar o comportamento de um sistema usando o modelo metabólico estequiométrico, deve-se assumir o estado estacionário do sistema, garantindo que não vai existir mudança dos fluxos ao longo do tempo, o qual é representado pela equação a seguir (PALSSON, 2006):

$$\frac{dC}{dt} = \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0}_M, \quad (1.14)$$

onde $\mathbf{0}_M$ é um vetor de magnitude M , no qual os elementos são todos zero. A equação matricial (1.14) define um sistema de equações lineares subdeterminado com infinitas soluções. Para delimitar o espaço solução da equação (1.14), definem-se os limites para cada uma das velocidades de reação v_j do sistema, através de:

$$\alpha_j \leq v_j \leq \beta_j, j = 1, \dots, N, \quad (1.15)$$

Na qual, α_j e β_j são os limites inferior e superior de v_j . Finalmente, se estabelece uma função objetivo:

$$f = \mathbf{c}^T \mathbf{v}, \quad (1.16)$$

onde $\mathbf{c}=[c_1, \dots, c_N]$ é o vetor que define o objetivo do sistema. Se a reação v_j está na função objetivo f , então $c_j \neq 0$. Caso contrário, $c_j = 0$.

Dada a matriz \mathbf{S} , os vetores $\boldsymbol{\alpha}=[\alpha_1, \dots, \alpha_N]$, $\boldsymbol{\beta}=[\beta_1, \dots, \beta_N]$ e \mathbf{c} , é possível achar um vetor \mathbf{v} que seja a solução do problema de programação linear:

$$\begin{aligned} \max_{\mathbf{v}} \quad & f = \mathbf{c}^T \mathbf{v} \\ \text{s.a.} \quad & \\ & \mathbf{S}\mathbf{v} = \mathbf{0}_M, \\ & v_j \geq \alpha_j, \\ & v_j \leq \beta_j \end{aligned} \tag{1.17}$$

Analisando os vetores $\boldsymbol{\alpha}$, $\boldsymbol{\beta}$ e \mathbf{c} biologicamente dentro de um sistema, é possível dizer que um valor negativo de α_i indica que a direção da reação com velocidade v_j pode ser em qualquer sentido: consumo do composto E_1 (vide Figura 1.9a) com um valor máximo β_i , ou produção deste com um valor mínimo α_i . Em geral, se $\alpha_j < 0$ então a reação com velocidade v_j denomina-se reversível. Se pelo contrário, $\alpha_j \geq 0$, então v_j é irreversível (RAMAN; CHANDRA, 2009). Assim, a procura de soluções ao problema (1.17) é conhecido como FBA.

7.2 MODELOS METABÓLICOS EM ESCALA GENÔMICA

Uma forma de armazenar informação estrutural de microrganismos é através de modelos estequiométricos, obtidos a partir de reconstruções em escala genômica. Estas reconstruções têm melhorado nos últimos anos, aumentando o nível de detalhe na descrição desses microrganismos. Este nível de detalhe está representado pela quantidade de genes, reações, componentes e compartimentos inclusos na reconstrução.

Na literatura podem ser encontradas várias reconstruções de modelos metabólicos em escala genômica para a levedura *S. cerevisiae*. As mais importantes se encontram na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Modelos metabólicos em escala genômica para *S. cerevisiae* encontrados na literatura

MODELO	REFERÊNCIA
iFF708	FÖRSTER et al., 2003
iND750	DUARTE et al., 2004
iLL672	KUEPFER et al., 2005
iMM904	MO et al., 2009

Saccharomyces cerevisiae é o primeiro eucariota cujo genoma foi totalmente sequenciado. Esta espécie, desde então, tem sido o foco de muitos esforços de reconstrução em escala genômica. Forster et al., (2003) reconstituiu o primeiro modelo metabólico em escala genômica multi-compartimentado da levedura (ou seja, iFF708). O modelo é composto por 708 genes e 1.175 reações metabólicas. As reações metabólicas para este modelo foram compartimentadas entre citoplasma e mitocôndria. Mecanismos de transporte entre estes dois compartimentos, bem como entre o meio extracelular e o citosol foram incluídos no modelo. Logo em seguida, o modelo iND750 foi introduzido. Este modelo metabólico em escala genômica é totalmente compartimentado e conta com 750 genes. Todas as reações das 1.149 incluídas foram atribuídas a um dos oito locais celulares (espaço extracelular, citosol, mitocôndria, peroxissoma, núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi ou vacúolo) (DUARTE et al., 2004).

Num estudo paralelo, a capacidade de previsão do iFF708 foi melhorada através de uma série de modificações na equação de biomassa e à remoção de reações bloqueadas, dando origem ao modelo iLL672 (KUEPFER et al., 2005). Posteriormente, uma outra versão do modelo metabólico da levedura *S. cerevisiae*, com uma melhor descrição do metabolismo lipídico, contendo 800 genes e 1.446 reações (ou seja, iIN800), foi introduzida por Nookaew et al., 2008. Estas melhorias para modelos desta levedura culminaram no modelo iMM904 (MO et al., 2009), o qual é baseado no modelo iND750, mas com 904 genes e 1.412 reações.

Todos esses esforços de reconstrução de modelos metabólicos para *S. cerevisiae* foram realizados em grande parte de forma independente um do outro, usando fontes de dados diferentes ou, em alguns casos, diferentes interpretações da mesma evidência da literatura. Essa falta de consistência motivou o agrupamento de todos os modelos metabólicos disponíveis em uma única reconstrução consenso (HERRGARD et al., 2008). Este modelo foi atualizado regularmente desde que foi publicado e a versão mais recente (Yeast 4.0) contém, de forma não compartimentada, 924 genes e 1.102 reações, este modelo

não foi utilizado neste trabalho por não estar disponível no momento em que foram realizados os estudos *in silico*.

Concluindo, a partir dos modelos iFF708, iND750 e iMM904 têm sido realizadas novas reconstruções de *S. cerevisiae*, tais como: iLL672 (KUEPFER et al., 2005), iIN800 (NOOKAEW et al., 2008), e Yeast 4.0 (HERRGARD et al., 2008). O modelo metabólico utilizado neste trabalho foi o iND750 que foi disponibilizado pela Profa. Isabel Rocha da Universidade do Minho.

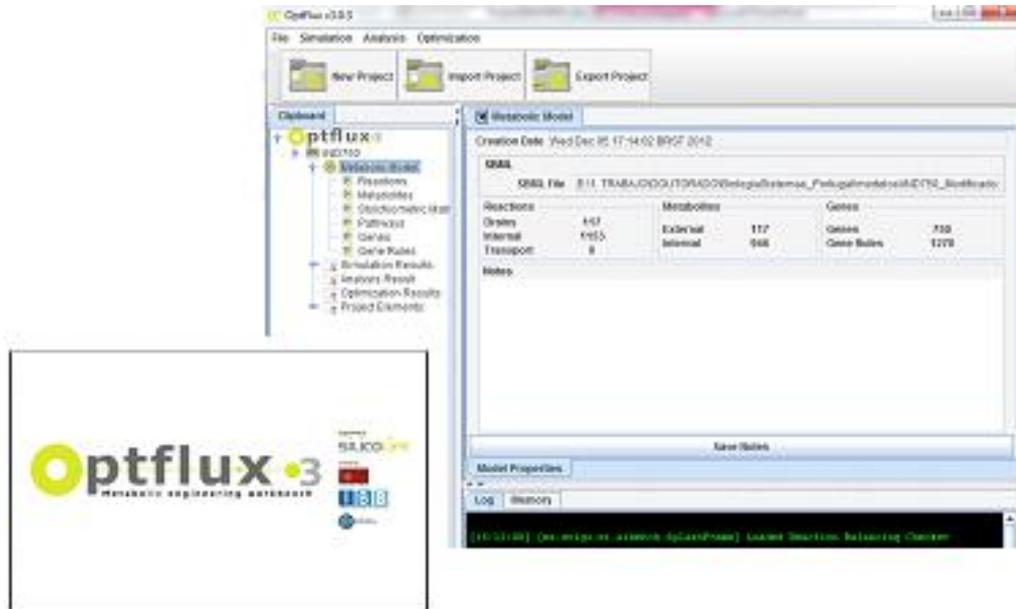
7.3 SOFTWARE OptFlux

Optflux é um software modular e de fonte aberta, desenvolvido pelo grupo de pesquisadores de Bioinformática e Biologia de Sistemas da Universidade do Minho (Braga, Portugal). É uma ferramenta que pretende ser referência computacional para Engenharia Metabólica em aplicações *in silico* (ver Figura 1.10).

Este software utiliza modelos metabólicos de diversos microrganismos e permite efetuar simulações de sistemas celulares (linhagens selvagens e mutantes), viabilizando o estudo *in silico* das respostas celulares perante perturbações ambientais e genéticas. Assim, por meio desses modelos, é possível avaliar necessidades nutricionais e otimizar a produção de compostos alvo através de alterações direcionadas do metabolismo, como por exemplo *knock out* de reações e/ou genes e sub/super expressão de genes para a produção de um produto metabólico de interesse (ROCHA et al., 2010).

Uma das técnicas mais usadas para o estudo destes modelos é a metodologia de Análise de Balanço de Fluxos Metabólicos (do inglês, FBA- Flux Balance Analysis), que tipicamente otimiza a produção de biomassa. Mais recentemente, foi proposto o método “parcimonious FBA” (pFBA), que trabalha no espaço de soluções ótimas do FBA, selecionando a resposta que minimiza a soma de todos os fluxos (GONÇALVES et al., 2012). Como para o propósito deste estudo a melhor opção não é maximização da biomassa e sim produção de etanol, este método tende a estimar melhor os fluxos metabólicos do microrganismo, ao refletir melhor a situação de estresse vivida pela célula ao ter xilulose como fonte de carbono.

Figura 1.10 – Interface do software OptFlux.



Outros métodos de simulação, também disponíveis neste software são: MOMA (do inglês, Minimization of metabolic adjustment) ou ROOM (do inglês, Regulatory on/off minimization of metabolic flux changes). Há também diferentes métodos de otimização, como Algoritmos Evolucionários e Recozimento Simulado (SA) (do inglês, *Simulated Annealing*) para alcançar o melhor conjunto de deleções de genes, dada uma determinada função objetivo.

Este software também apresenta diversas funcionalidades, como métodos para simplificação de modelos e um módulo de visualização para análises da estrutura do modelo, tendo uma interface amigável para usuários que não sejam especialistas em bioinformática, mas que desejam fazer uso de métodos de bioinformática para aplicações em Engenharia Metabólica (ROCHA et al., 2010).

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE DIFERENTES POLÍTICAS DE ALIMENTAÇÃO DE UM REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO C6 DO BAGAÇO DE CANA.

Neste capítulo são descritas duas políticas de alimentação diferentes, com base em equações cinéticas simples, validadas usando reatores em escala de bancada. A primeira política fez uso da alimentação de substrato e enzima, para sustentar altas taxas de produção de glicose. A segunda, só alimenta substrato ao reator em batelada alimentada, e foi definida utilizando a teoria clássica do controle ótimo.

Na primeira parte deste capítulo será apresentado o desenvolvimento do modelo matemático para um biorreator operado em batelada alimentada. O equacionamento dinâmico inclui um modelo cinético de Michaelis-Menten pseudo-homogêneo, com inibição pelo produto. Será apresentado também o desenvolvimento matemático das duas políticas de alimentação mencionadas acima. Na sequência, serão apresentados os resultados simulados obtidos no software MATLAB após a implementação dos modelos matemáticos. Os perfis de alimentação obtidos foram utilizados na última parte deste capítulo, referente à validação das políticas de alimentação propostas, utilizando reatores em escala de bancada processando bagaço de cana pré-tratado.

1 MODELAGEM DO BIORREATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os modelos matemáticos têm um papel fundamental no desenvolvimento de sistemas de controle, pois fornecem uma relação funcional entre as variáveis envolvidas no processo. Neste trabalho, é proposto um modelo simplificado não estruturado (por exemplo, não considerando a adsorção da enzima na lignina) e não segregado (considera o conjunto de enzimas celulasas como se fosse um só catalizador), composto por um conjunto de equações diferenciais ordinárias não lineares, de primeira ordem, para a descrição do processo.

Foi aplicado um modelo cinético simples de Michaelis-Menten (MM) com inibição pelo produto, baseado em Carvalho et al., 2013, para a modelagem dinâmica de um reator semi-contínuo (conforme apresentado nas equações 2.1a a 2.1d). Em todo o equacionamento que segue, admite-se que o biorreator semi-contínuo, operado em batelada alimentada, é de mistura ideal. Neste ponto, deve ser salientado que a velocidade de reação usada para descrever o comportamento cinético do sistema (equação 2.1d) não considera

todos os mecanismos que contribuem para a redução da concentração das enzimas ativas no sistema.

A adsorção ineficaz de enzima sobre a lignina, os efeitos de interferência (superlotação de enzimas na matriz do substrato), inibição por celobiose, inativação térmica das enzimas, nenhum destes fenômenos estão considerados explicitamente no modelo cinético. Mais do que isso, todas as enzimas do conjunto estão agrupadas num único pseudo-catalisador. Todos esses fenômenos são, mesmo assim, aglomerados nas constantes da equação (2.1d) (modelo de Michaelis-Menten), e o ponto importante é que esta abordagem simplificada forneceu uma boa aderência aos dados experimentais, conforme apresentado no item 3 deste capítulo.

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

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

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

Onde

$$r = \frac{k \cdot e \cdot S}{k_m \cdot \left(1 + \frac{P}{k_i}\right) + S} \quad (2.1d)$$

Os parâmetros do modelo foram reajustados utilizando-se dados experimentais de ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado executados em batelada. A boa precisão das previsões do modelo para os ensaios da batelada alimentada (veja a seção 3 deste capítulo) pôde ser considerada um teste de validação positivo para esta abordagem.

Duas políticas de alimentação foram definidas neste trabalho e validadas utilizando-se reatores em escala de bancada.

1.1 PRIMEIRA POLÍTICA (P#1): ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E ENZIMA

A lógica por trás da primeira política de alimentação, P#1, era procurar elevadas taxas de produção de glicose ao longo do ensaio, com a adição simultânea de enzima e de substrato durante o curso da reação (equações 2.2a-2.3). Quantidades extras de enzima precisaram ser adicionadas ao reator de modo a compensar a inibição da enzima já presente no meio reacional durante o curso da reação.

A política P#1 é definida pelas seguintes equações:

$$e_{alim} = e.V.108 - e_{acumulada} \quad (2.2a)$$

$$e = \frac{r_{inicial}.km.(1 + \frac{P}{ki}) + S_0}{k.S_0} \quad (2.2b)$$

$$F_{alim} = \frac{r.V}{S_{alim} - S_0} \quad (2.3)$$

As equações (2.2a) e (2.2b) apresentam o perfil de alimentação de quantidades adicionais de enzima, e_{alim} , para manter uma velocidade de reação elevada (perto de $r_{inicial}$, como será explicado no item 2 deste capítulo) enquanto a reação prossegue, apesar da presença do inibidor da enzima (o produto P).

Nas equações (2.2a) e (2.2b), a dimensão da concentração de enzima dentro do reator (necessária para manter r perto do $r_{inicial}$), e , tem unidades de g/L, enquanto a dimensão da enzima a ser adicionada ao reator, e_{alim} , tem unidades de FPU (do inglês, Filter Paper Unit). Portanto, “ e ” deve ser multiplicada pelo volume do reator, V , e por 108 (1 g do nosso complexo de enzima é equivalente a 108 FPU). Além disso, do termo “ $e.V.108$ ” na equação (2.2a), é necessário subtrair a enzima já introduzida no momento em consideração, ou seja, a enzima que está acumulada dentro do reator ($e_{acumulada}$), para obter a quantidade de enzima a ser alimentada.

A equação (2.3), por sua vez, mostra a vazão de alimentação de substrato, F_{alim} . Ela é calculada como uma função da taxa de consumo de substrato, r , a partir da equação (2.1a) (visando a que $dS/dt = 0$, isto é, o substrato é repostado conforme é consumido).

1.2 SEGUNDA POLÍTICA (P#2): CONTROLE ÓTIMO

O problema de otimização para os reatores operados em regime de batelada alimentada geralmente consiste na determinação de perfis de alimentação de substrato, a fim de maximizar algum índice de desempenho. Segundo a teoria de controle ótimo (RAMIREZ, 1994), quando o índice de desempenho e a dinâmica do sistema são lineares em relação à variável de controle, o problema de controle recai numa solução do tipo bang-bang ou em um arco singular (intermediário).

A segunda política, P#2, prevê a alimentação do substrato, mas não da enzima (para efeitos de comparação, a quantidade de enzima total utilizada na primeira política é adicionada no tempo inicial da segunda política). Esta política foi definida aplicando-se a teoria clássica de controle ótimo, levando ao seguinte conjunto de equações:

$$\frac{dx}{dt} = f(\underline{x}(t), \underline{u}(t), t) = \dot{\underline{x}} = \underline{f}'(\underline{x}) + \underline{g}(\underline{x}) \cdot u \quad (2.4a)$$

Onde,

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

$$\underline{g} = \begin{bmatrix} (S_{a\text{lim}} - S) \\ -P \\ V \end{bmatrix}$$

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

$$u = D = F_{a\text{lim}}/V$$

As restrições de desigualdade são:

$$u_{min} \leq u \leq u_{max} \text{ (com } u_{min} = 0 \text{ e } u_{max} = F_{alimmax} / V \text{)}.$$

As condições iniciais são:

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

O índice de desempenho é minimizado no tempo final fixo:

$$J = -P(tf) - X(tf) \tag{2.4b}$$

Em que $X(tf)$ representa a conversão do substrato no tempo final. Ver o Apêndice A para a formulação do problema.

No presente caso, o arco singular não existe e, então, a solução do controle ótimo é do tipo bang-bang, onde a variável de controle vai do valor mínimo ao máximo. Resolvendo numericamente o problema de valor de contorno em dois pontos (do inglês, TPBVP - two point boundary value problem), que englobam as equações diferenciais ordinárias (no tempo) para o estado (equações 2.1a - 2.1c) e as variáveis de co-estado (equações A.9), é possível determinar o momento de mudar o fluxo de alimentação de substrato $u(t)$ entre u_{min} e u_{max} .

2 SIMULAÇÕES USANDO O SOFTWARE MATLAB

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Roberto de Campos Giordano (LaDABio) tem implementado diferentes algoritmos para estimativa de parâmetros, entre eles se encontra o algoritmo de Recozimento Simulado (SA) (do inglês, *Simulated Annealing*) que é um método global estocástico para otimização. O algoritmo SA “escapa” de mínimos locais em direção ao mínimo global, desde que haja número suficiente de iterações (MONTERA et al., 2008). Esses algoritmos, assim como os algoritmos desenvolvidos durante este trabalho para cálculos das diferentes políticas de alimentação, foram implementados no software MatLab.

Carvalho et al., (2013), utilizando este algoritmo de *Simulated Annealing* (SA), e o clássico Levenberg Marquardt (LM), ajustaram um modelo de Michaelis-Menten, com inibição pelo produto, para a hidrólise de bagaço de cana pré-tratado (mesmo tipo do pré-tratamento usado para realizar as validações neste trabalho; ver item 3 deste capítulo). Vale ressaltar que os parâmetros de Michaelis-Menten ($k_e = 0.105 \pm 0.015 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $k_m = 8.78 \pm 4.89 \text{ g.L}^{-1}$ e $k_i = 3.34 \pm 1.30 \text{ g.L}^{-1}$) a partir de Carvalho et al., (2013), foram obtidos a partir de ensaios utilizando frascos agitados.

Neste trabalho, os modelos (ver item 1 deste capítulo) são usados para a otimização da operação de reatores em escala de bancada com sistemas de agitação mecânica. Portanto, foram realizados experimentos em triplicata de hidrólise enzimática em reator de bancada operando em batelada simples. Os resultados experimentais obtidos foram comparados com dados simulados utilizando o seguinte conjunto de equações:

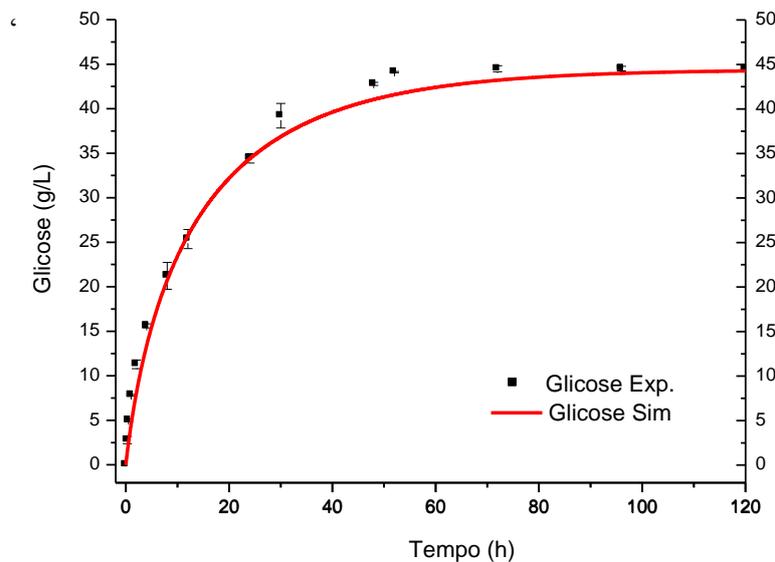
$$\frac{dS}{dt} = -r \quad (2.5a)$$

$$\frac{dP}{dt} = r \quad (2.5b)$$

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (2.5c)$$

A velocidade de reação utilizada foi apresentada na equação (2.1d). Partindo dos parâmetros de Carvalho et al., (2013), foi realizado um ajuste manual fino (*'fine-tuning'*) nos parâmetros do modelo de Michaelis-Menten (a Figura 2.1 apresenta os resultados). Embora os parâmetros de Carvalho et al., (2013) tenham sido obtidos a partir de experimentos em frascos agitados, um bom ajuste foi obtido com parâmetros muito semelhantes.

Figura 2.1 – Comparação dos dados experimentais e simulados de operação em batelada simples. Parâmetros do modelo de Michaelis-Menten com inibição: $k_e = 0,112 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $k_m = 15,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $k_i = 4,5 \text{ g.L}^{-1}$. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C , $\text{pH } 4,8$, concentração inicial de enzima $e(0) = 7,8 \text{ g.L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}}.\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$



2.1 PRIMEIRA POLÍTICA (P#1): ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E ENZIMA

O modelo dinâmico proposto para esta política de alimentação está dado pelas equações (2.1), (2.2) e (2.3). Para a realização das simulações, foram utilizados os parâmetros apresentados na Figura 2.1. Embora os parâmetros do modelo tenham sido reajustados utilizando-se bateladas simples, a precisão das previsões do modelo para os ensaios em batelada alimentada foi boa (veja item 3: *Validação Experimental*), podendo ser considerado como um teste de validação positivo para esta abordagem.

O algoritmo começa pela definição dos valores iniciais das variáveis de estado, assim como das magnitudes dos parâmetros cinéticos. Posteriormente, é definido um vetor, denominado r_{set} , que contém diferentes porcentagens da velocidade inicial ($r_{inicial}$) (equação 2.6). O objetivo de utilizar o vetor r_{set} é avaliar qual a mínima porcentagem da velocidade de reação inicial que deve ser mantida de modo a minimizar o gasto de enzima e a obter elevadas taxas de produção de glicose ao longo do experimento. Quando $r < r_{set}$, enzima deve ser adicionada para retomar $r = r_{inicial}$.

$$r_{set} = \begin{bmatrix} 1,0 \cdot r_{inicial} \\ 0,9 \cdot r_{inicial} \\ 0,8 \cdot r_{inicial} \\ 0,7 \cdot r_{inicial} \\ 0,6 \cdot r_{inicial} \\ 0,5 \cdot r_{inicial} \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

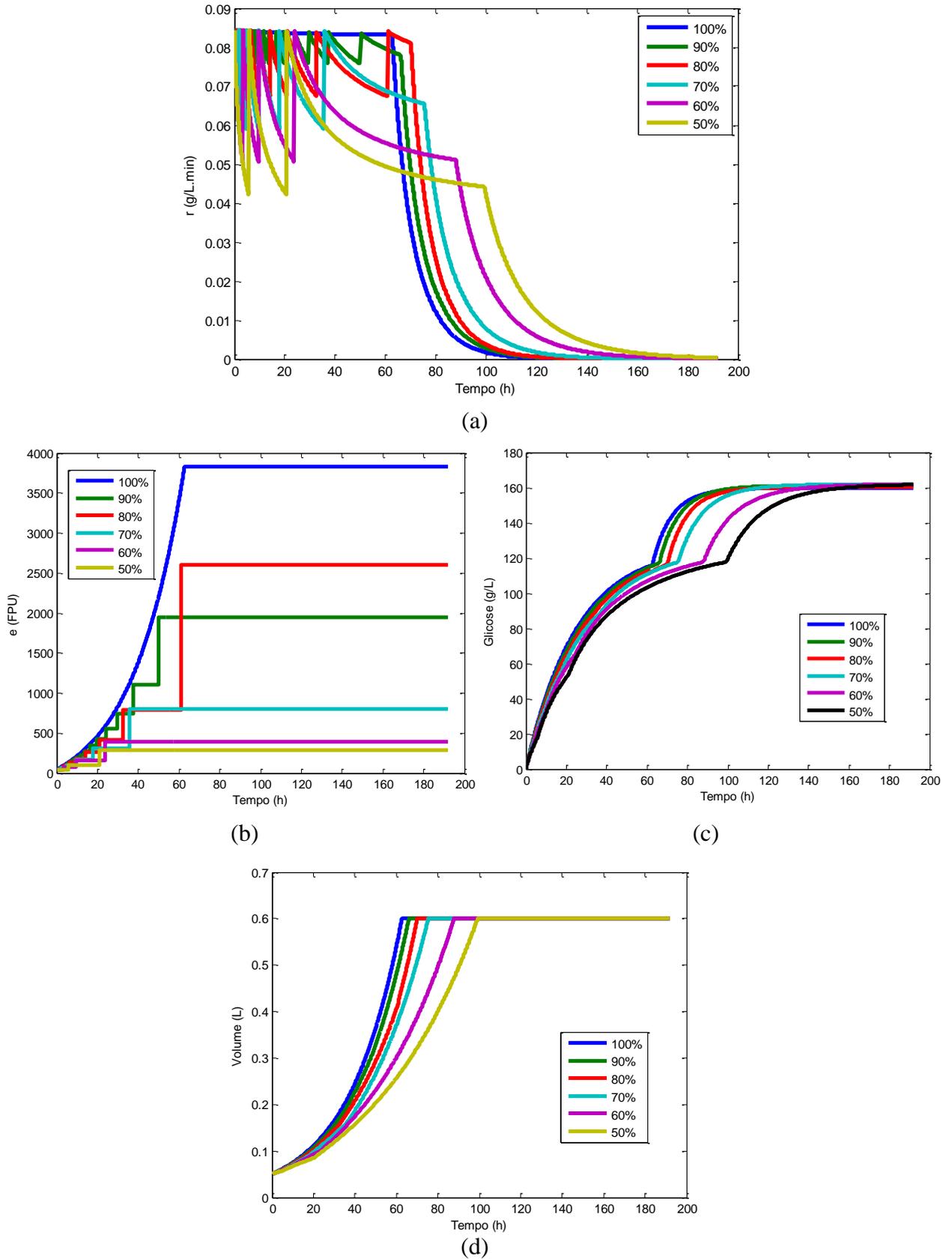
As equações do modelo matemático e as políticas de alimentação de enzima e substrato foram simuladas para cada elemento do vetor (r_{set}), utilizando o método numérico de Runge-Kutta de 4ª ordem com passo constante. No algoritmo, o critério de parada da alimentação foi: capacidade máxima do reator atingida. A alimentação de enzima era realizada unicamente quando a velocidade de reação calculada no momento em consideração atingia um valor inferior ao estipulado no vetor r_{set} .

A Figura 2.2 mostra as simulações da primeira política de alimentação (P#1) para cada componente do vetor (r_{set}). A Figura 2.2a apresenta a variação da velocidade de reação com o tempo e com a alimentação de enzima. Para o caso do primeiro elemento de r_{set} (manter 100% da velocidade de reação inicial), existe uma alimentação de enzima contínua (ver Figura 2.2b), portanto, a velocidade de reação não cai ao longo do tempo. Já para o último elemento de r_{set} , a alimentação de enzima é realizada unicamente quando velocidade de reação cai até um valor de 50% da velocidade inicial, gerando uma alimentação de enzima com um perfil de pulso ao longo do experimento. Nota-se que neste caso, ao longo das primeiras 100h de experimento a velocidade de reação caiu duas vezes para 50% do $r_{inicial}$, fazendo-se necessária a alimentação de dois pulsos de enzima; já após desse tempo, a velocidade de reação também caiu, mas a condição de parada da alimentação (capacidade máxima do reator atingida) já tinha sido atendida (ver Figura 2.2d).

Analisando a Figura 2.2b podemos observar que existe uma grande diferença entre a quantidade de enzima utilizada para manter 100% da velocidade inicial (≈ 3.850 FPU) e a quantidade utilizada para manter 50% da velocidade inicial (≈ 290 FPU). Para tornar o processo economicamente viável foram descartados os valores de 100, 90, 80 e 70% da velocidade inicial por precisar de altas quantidades de enzima.

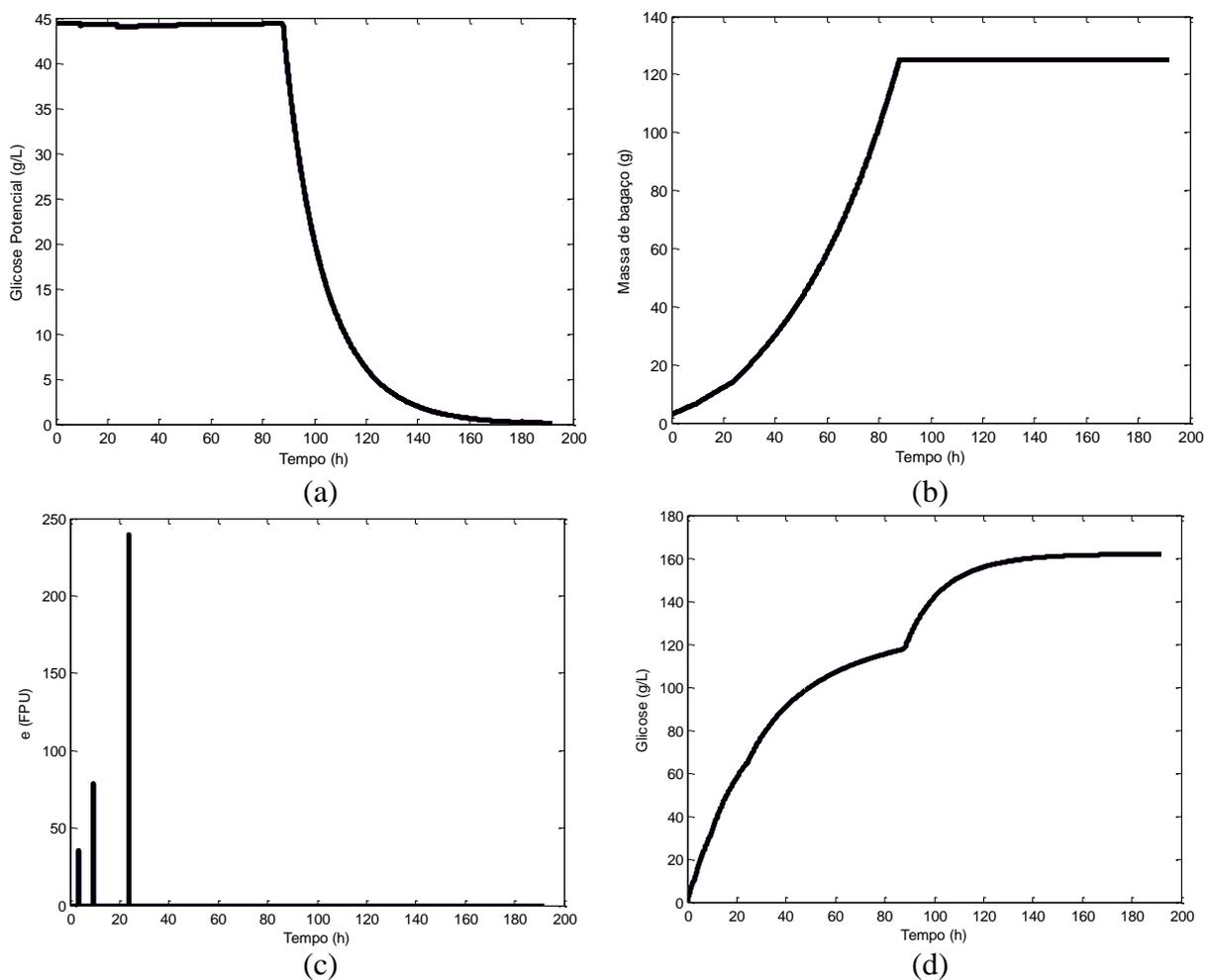
Já quando comparamos os valores de enzima utilizada para 60 e 50% na Figura 2.2b, fica claro que as quantidades calculadas para os dois casos são próximas, sendo que os 60% utilizam em torno de 20% a mais de enzima, o que leva a uma diminuição de 20h no tempo de produção da mesma concentração de produto (ver Figura 2.2c).

Figura 2.2 – Simulações da primeira política (P#1) para cada componente do vetor (r_{cte}). (a) velocidade de reação, (b) enzima total utilizada, (c) concentração de produto, (d) volume do reator.



Por esta razão, foi escolhida a estratégia de alimentar a quantidade de enzima necessária para manter a velocidade de reação em um valor igual ou maior aos 60% da velocidade de reação inicial, para realizar os experimentos de validação, resultados apresentados na Figura 2.3 (seguindo a metodologia representada na Figura 2.4).

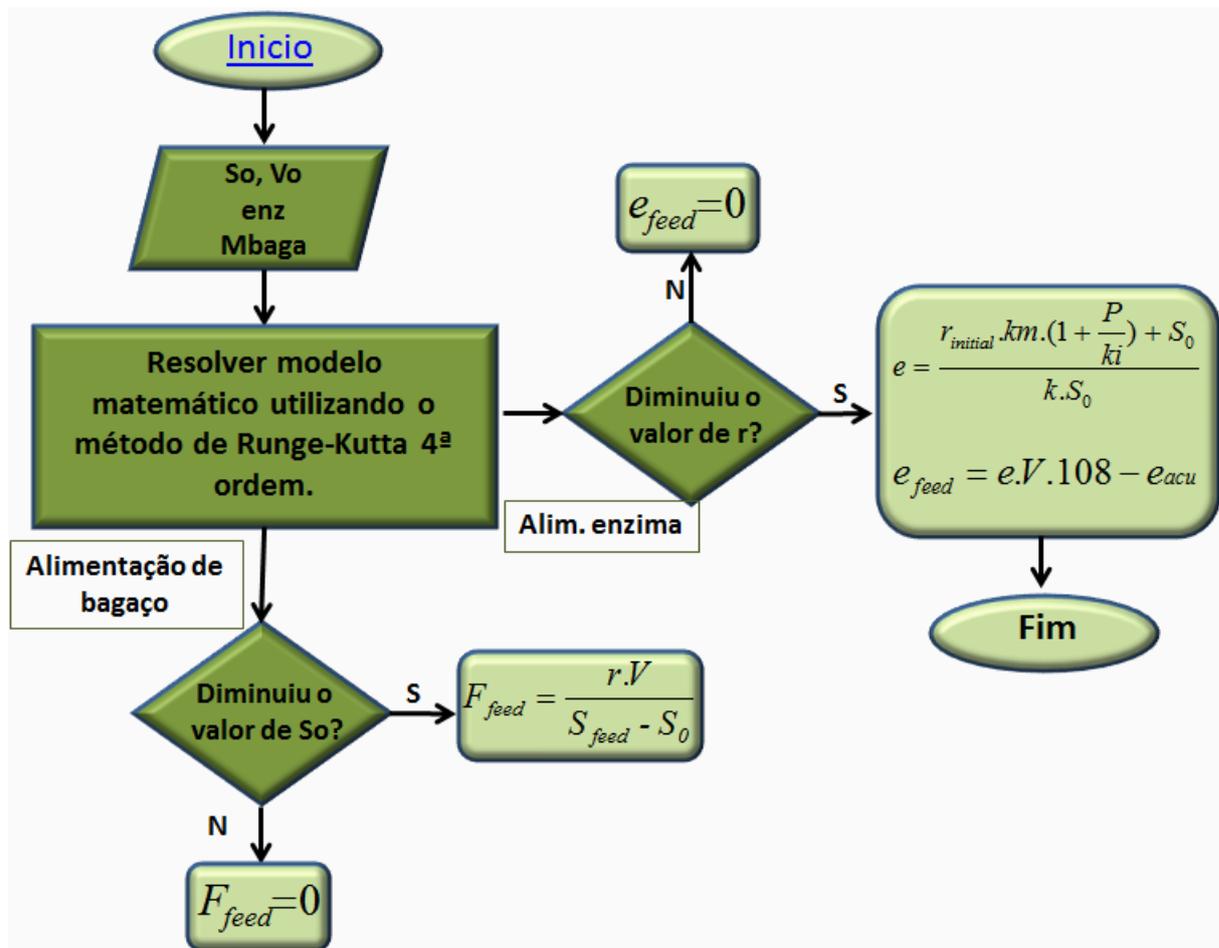
Figura 2.3 – Simulações da primeira política (P#1) para manter 60% ou mais da velocidade de reação inicial. (a) Concentração de substrato, (b) Perfil de alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Perfil de alimentação de enzima, (d) Concentração de produto.



A Figura 2.3 mostra a estratégia proposta nas equações (2.2 e 2.3), onde o perfil de alimentação de substrato é calculado para manter a concentração de substrato constante dentro do reator. Na Figura 2.3a podemos observar que é possível manter a concentração de substrato em valores muito próximos aos da concentração de substrato inicial ($44,44 \text{ g.L}^{-1}$) durante as primeiras 90h de experimento em batelada alimentada, momento no qual o volume máximo do reator é atingido (condição de parada da alimentação), sendo

necessário finalizar a alimentação e começar a operar o reator em regime de batelada simples. A simulação termina com o esgotamento da fonte de substrato às 190h.

Figura 2.4 – Esquema do algoritmo de simulação utilizado para resolver as equações da política de alimentação P#1



Fonte: arquivo pessoal.

O perfil de alimentação de substrato calculado na simulação utilizando a equação (2.3) apresenta um comportamento exponencial, como é mostrado na Figura 2.3b. É importante ressaltar que os valores numéricos apresentados nessa figura correspondem à quantidade de bagaço pré-tratado “seco” e, portanto, para a utilização desses dados experimentalmente deve ser feita uma correção pela umidade do substrato no momento da adição ao reator.

A Figura 2.3c mostra o perfil simulado de alimentação de enzima, calculado utilizando a equação (2.2). São alimentados três pulsos de enzima ao longo da simulação, sendo adicionados antes das primeiras 30h. No primeiro pulso são adicionados 35,6 FPU às 3,3h de experimento, no segundo, são adicionados 78,8 FPU às 9,7h de experimento e no último pulso 239,1 FPU às 24h. É importante lembrar que no tempo inicial a simulação já começa com um valor inicial de enzima igual a 42,5 FPU, totalizando 396 FPU ao final da simulação.

Na Figura 2.3d apresenta-se o comportamento da concentração de produto. Por volta das 90h de experimento, a tendência da curva muda devido ao fim da batelada alimentada e ao começo da batelada simples, como já explicado anteriormente. Em resumo, com as políticas de alimentação de substrato e enzima implementadas, foram alcançadas elevadas taxas de produção de produto, chegando a concentrações de glicose de 162 g.L^{-1} (ver Figura 2.3d).

2.2 SEGUNDA POLÍTICA (P#2): CONTROLE ÓTIMO

Para a resolução do problema de controle ótimo, tradicionalmente são usados dois tipos de métodos: os métodos diretos e os métodos indiretos. Os métodos diretos têm sido mais usados para a resolução de problemas de controle ótimo devido a sua facilidade de implementação e por não demandar a geração das condições de otimalidade e posterior resolução de um problema de valor de contorno, ou seja, não é necessária a diferenciação analítica das equações de estado e não há variáveis adjuntas a serem integradas (equações 1.1 e 1.7) (LOGSDON; BIEGLER, 1989).

Por outro lado, os métodos indiretos consistem na transformação do problema de otimização original em um problema de valor de contorno algébrico-diferencial, resultante da aplicação das condições de otimalidade (Princípio do Mínimo ou Máximo de Pontryagin, ver item 6.1 do capítulo 1). Geralmente, esta abordagem pode resultar em um arco singular, em uma política de controle tipo bang-bang, ou na combinação dos dois. Os principais problemas deste método são: dificuldade de obtenção das condições de otimalidade para sistemas de grande dimensão e dificuldade na resolução do problema de valor de contorno resultante (BRENAN et. al., 1996). Apesar de apresentar maior dificuldade, a abordagem

indireta foi a escolhida neste trabalho por ter sido muito aplicada em bioprocessos para obtenção de estratégias ótimas de alimentação de substrato.

O modelo dinâmico proposto para esta política de alimentação esta dado pelas equações (2.4) e (A.1 – A.10). Nas simulações foram utilizados os valores dos parâmetros apresentados na Figura 2.1. Como já foi dito no item 2.1 deste capítulo, embora os parâmetros do modelo tenham sido reajustados utilizando-se bateladas simples, a precisão das previsões do modelo para os ensaios em batelada alimentada foi boa (veja item 3: *Validação Experimental*), podendo ser considerado como um teste de validação positivo para esta abordagem.

Para efeitos de comparação de resultados entre as políticas P#1 e P#2, o valor inicial de enzima utilizada em P#2 foi igual à quantidade total de enzima utilizada em P#1 para manter no mínimo 60% da velocidade de reação inicial, ou seja, 396 FPU (ver figuras 2.2b e 2.3c).

O algoritmo do controle ótimo começa pela definição de: valores iniciais das variáveis de estado, magnitudes dos parâmetros cinéticos, limites inferior e superior da variável de controle ($u_{min} \leq u \leq u_{max}$) e tempo final da simulação (problema com tempo final fixo, t_f).

Posteriormente, foi executado o seguinte algoritmo para determinar a política de controle ótimo (segundo a metodologia representada na Figura 2.5):

Passo 1: Assumir um valor da variável de controle (chute inicial).

Passo 2: Integrar as equações do modelo matemático (equações 2.1) para diante no tempo até alcançar o tempo final. As condições iniciais de integração estão dadas no vetor $x(0)$ (ver item 1.2 deste capítulo). O perfil calculado das variáveis de estado em relação ao tempo é guardado para ser posteriormente utilizado na integração das equações de co-estado.

Passo 3: Calcular o valor do índice de desempenho para a primeira iteração J_k (equação 2.4b).

Passo 4: Calcular o valor das variáveis adjuntas no tempo final utilizando a equação A.10.

Estas variáveis são as condições iniciais de integração das equações de co-estado.

Passo 5: Integrar as equações dinâmicas de co-estado para trás no tempo desde t_f até t_0 (equação A.9). O perfil das variáveis adjuntas em relação ao tempo obtido ($\lambda(t)$) é utilizado para calcular o Hamiltoniano (equação A.6) e o vetor de controle no tempo ($u(t)$).

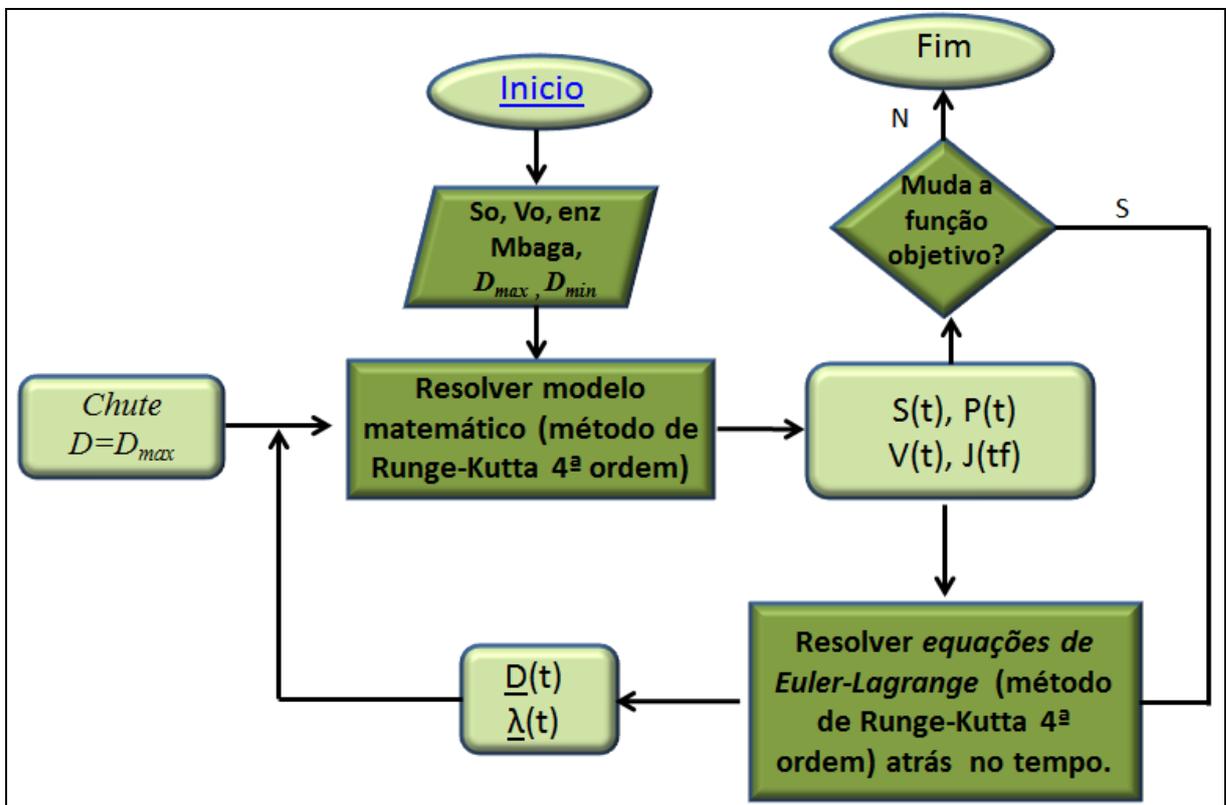
Passo 6: Utilizando o vetor $u(t)$ calculado no passo 5, repetir o passo 2.

Passo 7: Calcular o valor do índice de desempenho J_{k+1} . Verificar a convergência:

$$|J_k - J_{k+1}| \leq \textit{tolerância}$$

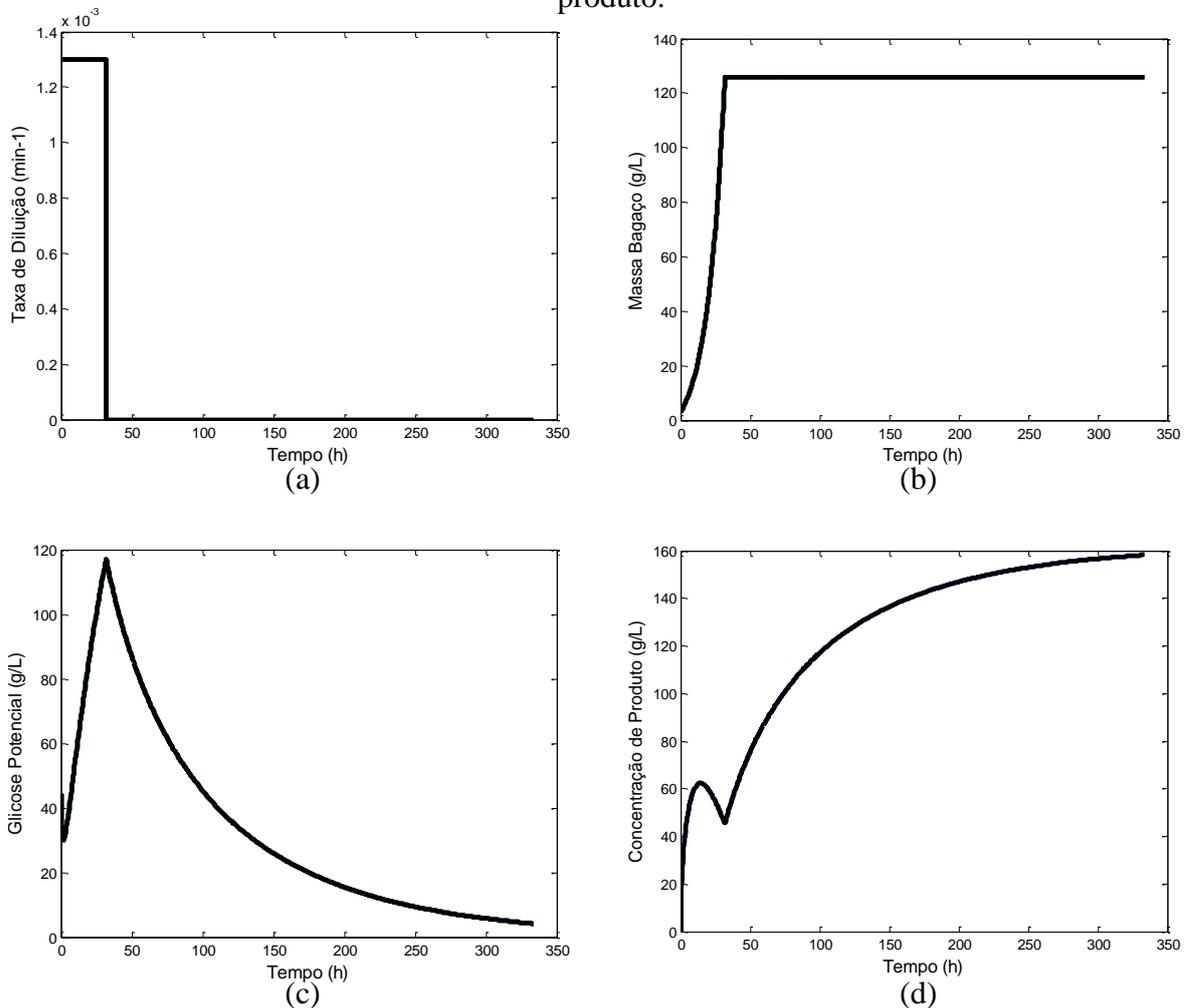
Passo 8: Repetir os Passos 4-7 até a convergência ser alcançada no Passo 7.

Figura 2.5 – Esquema do algoritmo de simulação utilizado para resolução das equações do controle ótimo



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 2.6 – Simulações da segunda política (P#2) (a) Perfil da variável de controle, (b) Perfil de alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Concentração de substrato, (d) Concentração de produto.



A Figura 2.6 mostra as simulações da segunda política de alimentação (P#2), implementando a teoria do controle ótimo. Na Figura 2.6a podemos observar que a solução do problema do controle ótimo é do tipo bang-bang, onde a variável de controle vai do valor máximo ao mínimo. O perfil de alimentação de bagaço pré-tratado calculado na simulação é apresentado na Figura 2.6b. Igualmente ao perfil obtido na política P#1, a alimentação apresenta um comportamento exponencial, mas quando comparado com a Figura 2.3b, a alimentação da estratégia do controle ótimo é aproximadamente duas vezes mais rápida, atingindo o volume máximo do reator às 32h de simulação. Vale a pena lembrar que os valores numéricos apresentados nessa figura correspondem à quantidade de bagaço pré-tratado “seco”. Portanto, para a utilização desses dados experimentalmente deve ser feita uma correção pela umidade do substrato no momento da adição ao reator.

Na Figura 2.6c podemos observar que a concentração de substrato inicial é de $44,44 \text{ g.L}^{-1}$ e aumenta durante as primeiras 32h de experimento em batelada alimentada até um valor de 117 g.L^{-1} , momento no qual o volume máximo do reator é atingido, sendo necessário finalizar a alimentação e começar a operar o reator em regime de batelada simples. Levando em consideração que neste caso a quantidade total de enzima é adicionada no começo do processo e que a velocidade de reação (equação 2.1d) não possui nenhum termo de inibição pelo substrato, a produção de glicose não se vê afetada pela alta concentração de substrato nas primeiras horas de simulação. A diminuição na concentração do produto das 15 às 35h (ver Figura 2.6d) é atribuída a efeitos de diluição por parte da umidade do bagaço de cana pré-tratado na alimentação. O fato de adicionar toda a enzima no começo do processo e o perfil exponencial acentuado da alimentação, levaram a que no final da simulação (200h) o substrato não fosse esgotado totalmente e a que o aumento na concentração de produto seja muito lento no final da simulação. Elevadas taxas de produção de produto foram alcançadas, chegando a concentrações de glicose de 147 g.L^{-1} (ver Figura 2.6d), embora quando comparado com a política P#1, tenha produzido 15 g.L^{-1} a menos.

3 VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

A validação experimental das estratégias de alimentação descritas neste capítulo foi realizada em parceria com o doutorando em Engenharia Química do PPG-EQ/UFSCar, Carlos Alberto Galeano Suarez.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Enzima e substrato

Utilizou-se o complexo comercial de celulasas Accellerase[®] 1500 de *Trichoderma reesei* doado pela Genencor[®] (Palo Alto, CA). Esse complexo possui melhor estabilidade entre 50 a 65°C, e numa faixa de pH de 4,0 a 5,0. Todavia, em ensaios longos considera-se que 50°C é uma melhor escolha visto que a temperaturas mais altas o tempo de eficiência (devido à inativação) desse complexo fica comprometido. É considerado que 1g de complexo enzimático equivale a 108 FPU.

Para determinar a atividade global do complexo, aplicou-se o método de Açúcares Redutores Totais (ART), fazendo-se uso do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) e papel de filtro Whatman No. 1 (MILLER, 1959; ADNEY e BAKER, 1996).

O material celulósico utilizado nos experimentos de hidrólise foi bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor, doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC - Piracicaba / SP).

3.1.2 Procedimentos de Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço explodido a vapor foi lavado utilizando-se uma razão sólido líquido 1:20 (bagaço seco : H₂O fervente). Em seguida, iniciou-se a etapa de deslignificação, e para isso utilizou-se uma razão sólido líquido 1:20 (bagaço seco : solução NaOH 4%); a suspensão contendo bagaço foi autoclavada por 30 min, em 1 atm e a 121°C. Após a remoção da lignina o sólido remanescente foi exaustivamente lavado com água quente, sendo a última lavagem feita com solução tampão citrato 50 mM a pH 4,8, deixando o material tratado no pH da etapa de hidrólise. A Tabela 2.1 mostra a caracterização das amostras do bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor antes e depois do pré-tratamento com NaOH.

Tabela 2.1 - Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

AMOSTRAS	Celulose %	Hemicelulose %	Lignina %	Cinzas %
Bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor	52,24	4,23	34,36	5,88
Bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor, tratado com 4% NaOH	70,12	3,79	19,32	4,25

3.1.3 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em reatores de bancada de 200 mL com agitação mecânica (impulsor Rushton). Os experimentos foram realizados no modo de batelada simples (Figura 2.1) e batelada alimentada (com as políticas de alimentação detalhadas neste capítulo no item “Modelagem do Biorreator de Hidrólise Enzimática”). Uma descrição do procedimento experimental é detalhada a seguir:

Batelada Simples e Batelada Alimentada (P#1):

Inicialmente, o reator foi carregado com 0,39g do extrato enzimático Accellerase® 1500, juntamente com 37,3 mL de tampão de citrato de sódio, 50 mM, a pH 4,8. O experimento começou com a adição de 15,56g de bagaço pré-tratado úmido (82% de umidade, ou seja, 12,7g de fase líquida), contendo 70% de celulose (Tabela 2.1), correspondente a uma concentração de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solução}}$ (no reator). Hidrólises foram realizadas em triplicata, a uma temperatura de 50 °C. Experimentos em bateladas simples (ver Figura 2.1) tiveram uma duração de 120h. Já nos experimentos em batelada alimentada (P#1) enzima e substrato foram alimentados conforme as Figuras 2.3b e 2.3c e tiveram uma duração de 210h. Amostras foram coletadas a partir do sobrenadante para análise de glicose (com adição em NaOH 0,2 M para inativação da enzima). A Figura 2.7 apresenta a configuração experimental.

Batelada Alimentada (P#2):

Para ensaios em batelada alimentada para validação da teoria do controle ótimo (neste caso, somente alimentação de substrato), o procedimento seguido experimentalmente foi o mesmo explicado para os casos anteriores, com a diferença de que inicialmente foram adicionados ao reator 3,67g do extrato enzimático Accellerase® 1500. Substrato foi alimentado conforme a Figura 2.6b e os ensaios tiveram uma duração de 210h. A Figura 2.7 apresenta a configuração experimental.

A Tabela 2.2 resume a enzima e o substrato adicionados para os três casos (P#1, P#2 e batelada simples). Como se pode ver, os volumes finais de P#1 e P#2 foram maiores do que a capacidade total de um único reator na escala laboratorial, neste caso o meio de reação foi dividido homogeneamente em mais de um reator (para evitar transbordamento).

Figura 2.7 – Configuração experimental para a hidrólise enzimática



Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 2.2 - Adição de enzima e substrato para P#1, P#2 e batelada simples.

Política de alimentação	Enzima	Total	Substrato	Total	Volume inicial (L)	Volume final (L)
	inicial adicionada (g)	enzima adicionada (g)	inicial de adicionado (celulose transformada em glicose potencial, g)	substrato adicionado (celulose transformada em glicose potencial, g)		
P#1 ^a	0,39	3,67	2,2	54,4	0,05	0,25
P#2 ^a	3,67	3,67	2,2	77,5	0,05	0,36
Batelada ^b	0,39	3x0,39	2,2	3x2,2	0,05	3x0,05

a. Oito dias de operação do reator.

b. Três bateladas simples de dois dias e dois dias para limpeza; total: 8 dias de operação.

3.1.4 Quantificação de Açúcares

A glicose e a celobiose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, HPLC - High Performance Liquid Chromatography) utilizando um cromatógrafo Shimadzu SCL-10AVP com detecção de índice de refração Shimadzu RID-10A, coluna Aminex HPX-87H (300×7,8 mm, Bio-Rad) com 0,005 mol.L⁻¹ de H₂SO₄ como fase móvel, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 45°C.

3.2 VALIDAÇÃO DA PRIMEIRA POLÍTICA (P#1): ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E ENZIMA

Neste trabalho, modelos dinâmicos foram usados para a otimização da operação de reatores em escala de bancada com agitação mecânica. É importante lembrar que, partindo dos parâmetros de Carvalho et al., (2013), foi realizado um ajuste manual fino (*'fine-tuning'*) nos parâmetros do modelo de Michaelis-Menten (Figura 2.1) para obtenção dos parâmetros cinéticos usados nas simulações.

Nesta parte do trabalho, foram validados experimentalmente os perfis de alimentação obtidos nas simulações do item 2.1 (Figuras 2.3b e 2.3c). As Figuras 2.8a - 2.8e

mostram os resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1 (adição simultânea de enzima e de substrato durante o curso da reação).

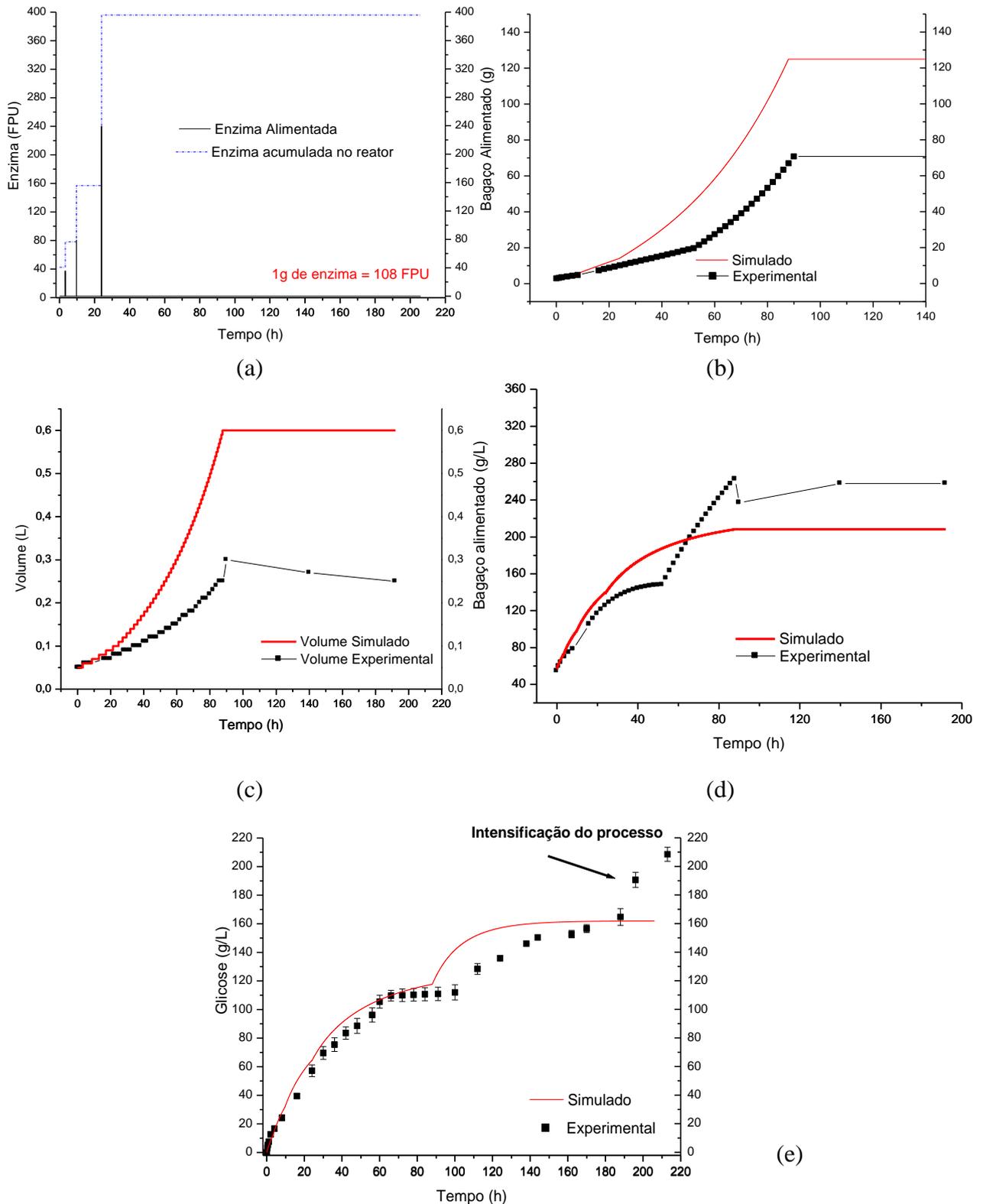
A Figura 2.8a mostra o perfil de alimentação de enzima. Como já foi dito no item 2.1 deste capítulo, são alimentados três pulsos de enzima, antes das primeiras 30h. No primeiro pulso são adicionados 35,6 FPU às 3,3h de experimento, no segundo, são adicionados 78,8 FPU às 9,7h de experimento e no último pulso 239,1 FPU às 24h. É importante lembrar que no tempo inicial a simulação já começa com um valor inicial de enzima igual a 42,5 FPU, totalizando 396 FPU ao final da simulação.

A Figura 2.8b apresenta os dados simulados e experimentais da alimentação de bagaço pré-tratado. A alimentação de substrato foi interrompida por volta das 87 horas de experimento, momento no qual finalizou a alimentação e começou a operação do reator em regime de batelada simples.

Experimentalmente, a alimentação de substrato foi realizada manualmente, pela falta de um sistema automático de alimentação contínua para esse tipo de material. No procedimento adotado, a alimentação foi realizada a cada 1 hora, e a quantidade de substrato alimentado foi equivalente à soma da quantidade simulada de bagaço alimentada durante esse período de tempo. Esta abordagem permitiu a alimentação de quantidades consideráveis de substrato de uma vez só (principalmente na parte mais exponencial), contribuindo para o aumento da viscosidade aparente do meio (ver Figura 2.9). Devido ao aumento dessa viscosidade aparente, não foi possível experimentalmente seguir o perfil de alimentação de bagaço simulado, como pode ser visto na Figura 2.8b. Outro experimento onde a alimentação foi realizada a cada 15 minutos (ver Figura 2.10) apresentou melhores resultados (no que diz respeito ao controle da viscosidade aparente do meio).

A variação do volume do reator ao longo do tempo é apresentada na Figura 2.8c (resultados experimentais e simulados). A principal razão para a diferença entre os volumes experimental e simulado foi a menor adição de bagaço de cana (e, conseqüentemente, de água a partir da umidade do bagaço) nos ensaios experimentais. Além disso, durante o curso da reação, ocorreu evaporação de água no sistema, provocando um aumento na concentração de glicose devido a duas contribuições: reação de hidrólise e evaporação da água. A evaporação contribuiu para diminuição do volume experimental (e, conseqüentemente, para a intensificação da concentração de glicose). Este efeito foi mais evidente a partir de 90 h, quando a alimentação do substrato já havia sido encerrada. A redução total de volume durante a fase final de batelada foi de aproximadamente 50 ml, devido à evaporação, fenômeno desprezado na modelagem.

Figura 2.8 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1. (a) Enzima alimentada, (b) alimentação de bagaço pré-tratado, (c) volume, (d) bagaço alimentado por unidade de volume, (e) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 7,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.



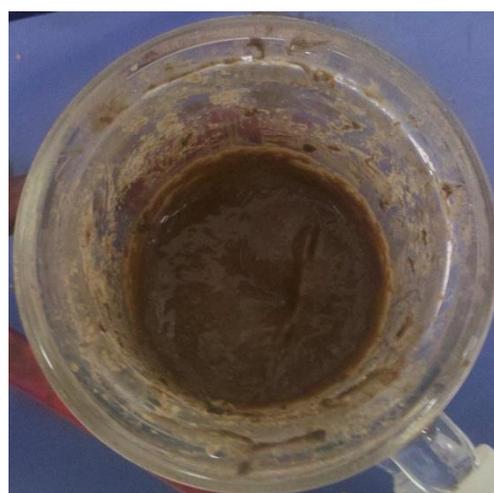
A Figura 2.8d mostra que quando dividimos o bagaço alimentado pelo volume do reator, os comportamentos experimentais e simulados se tornam parecidos. Os efeitos combinados da evaporação e sobreestimação do volume do reator teórico compensaram a menor alimentação de substrato sólido, e elevadas concentrações de glicose puderam ser alcançadas (como mostrado na Figura 2.8e).

A interrupção da alimentação de substrato (fim do processo em batelada alimentada e começo da batelada simples) ocorreu por volta de 87 h. Isto gerou uma descontinuidade na primeira derivada da curva da glicose (Figura 2.8e), o que pode ser explicado pela redução instantânea do efeito de diluição provocado pela alimentação de novo substrato. Concentrações de glicose de aproximadamente 200 g.L^{-1} foram alcançadas.

Figura 2.9 – Evolução da viscosidade aparente do meio para a política de alimentação P#1.
(a) $t = 0\text{h}$, (b) $t = 30\text{h}$, (c) $t = 87\text{h}$.



(a)



(b)



(c)

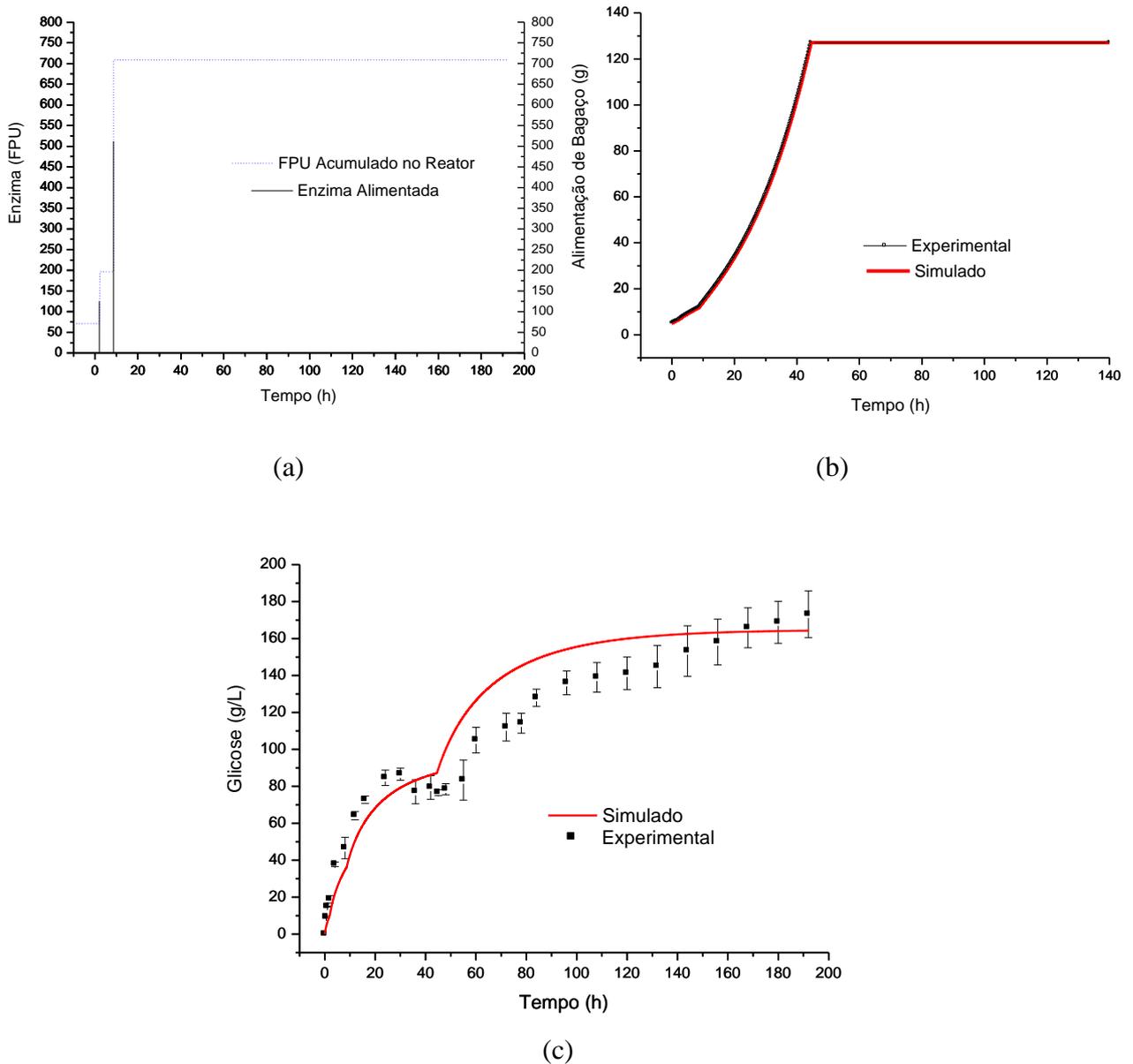
Fonte: arquivo pessoal.

Novas simulações foram realizadas utilizando a política de alimentação (P#1), mas com carga inicial de sólidos igual a 7% (ver Figura 2.10), ou seja, correspondente a uma concentração de glicose potencial de $77,77 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{solução}}$ (no reator). Foi escolhida a estratégia de alimentar a quantidade de enzima necessária para manter a velocidade de reação em um valor igual ou maior aos 40% da velocidade de reação inicial para realizar os experimentos de validação. A validação experimental destas novas simulações foi realizada pelo aluno de doutorado do DEQ/UFSCar Carlos Alberto Galeano Suarez, juntamente com os alunos da disciplina “10606-2 - Desenvolvimento de Processos Químicos 2 (DPQ2) (turma J)”, supervisionada pelo Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr., durante o segundo semestre do ano 2012. O procedimento experimental utilizado foi o mesmo descrito no item 3.1.3 deste capítulo, com as seguintes variações: 0,66g do extrato enzimático Accellerase® 1500, 29,54 mL de tampão citrato de sódio, 50 mM, a pH 4,8 e 25,46g de bagaço pré-tratado úmido (com 80,36% de umidade, ou seja, 20,46g de fase líquida), contendo 70% de celulose. A alimentação foi realizada a cada 15 minutos.

As Figuras 2.10a - 2.10c mostram os resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1 com carga inicial de sólidos igual a 7%. A Figura 2.10a mostra o perfil de alimentação de enzima. São alimentados dois pulsos de enzima ao longo do experimento, sendo adicionados antes das primeiras 10h. No primeiro pulso são adicionados 125,87 FPU às 2h de experimento e no último pulso 512 FPU às 8,6h. É importante lembrar que no tempo inicial o experimento já começa com um valor inicial de enzima igual a 70,83 FPU, totalizando 708,7 FPU ao final do ensaio.

A Figura 2.10b apresenta os dados simulados e experimentais da alimentação de bagaço pré-tratado. Neste experimento, a alimentação foi realizada a cada 15 minutos, sendo que a quantidade de substrato alimentado era equivalente à soma do bagaço alimentado simulado durante esse período de tempo. Fica claro que, alimentando em curtos intervalos de tempo, é possível validar o perfil simulado sem contribuir com o aumento da viscosidade aparente do meio, dando tempo à enzima para processar a quantidade de bagaço adicionada. Durante o período de alimentação de bagaço, a variação do volume reacional foi acompanhada pelo aluno de doutorado Carlos Alberto Galeano Suarez, juntamente com os alunos de graduação envolvidos na disciplina de DPQ, constatando-se que o volume experimental acompanhou perfeitamente o volume simulado.

Figura 2.10 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#1 para 7% de sólidos. (a) Enzima alimentada, (b) alimentação de bagaço pré-tratado, (c) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C, pH 4,8, concentração inicial de enzima $e(0) = 13,05 \text{ g.L}^{-1} \equiv 1.409,4 \text{ FPU.L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $77,77 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$.



Nas simulações a umidade que acompanha o bagaço é constante, o que não acontece em experimento de aproximadamente 8 dias. Os efeitos combinados da sobreestimação do volume do reator teórico e evaporação permitiram que elevadas concentrações de glicose pudessem ser alcançadas (como mostrado na Figura 2.10c).

A interrupção da alimentação de substrato (fim do processo em batelada alimentada e começo da batelada simples), da mesma forma que no experimento anterior, gerou uma descontinuidade na curva da glicose, como mostra a Figura 2.9c, devido a não existir mais o efeito de diluição provocado pela alimentação de novo substrato.

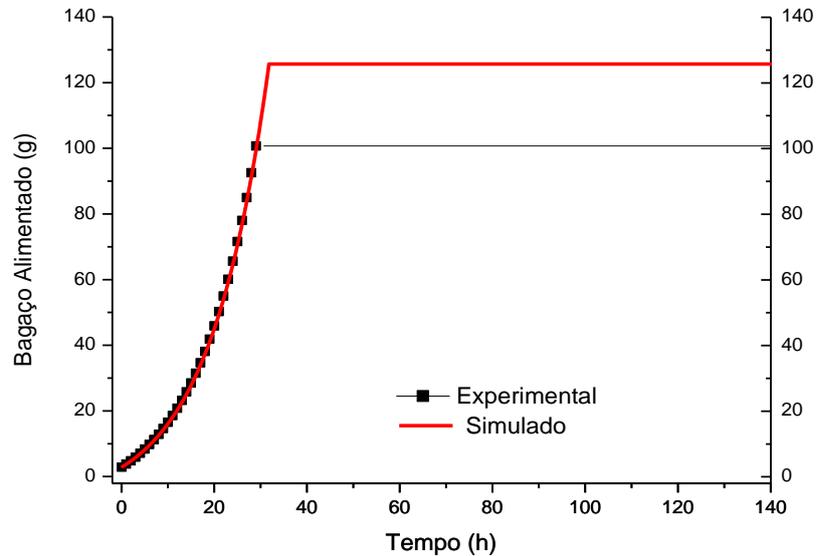
Comparando os dois experimentos (Figuras 2.8 e 2.9), pode-se concluir que para uma melhor validação dos dados simulados, a alimentação de bagaço de cana pré-tratado deve ser o mais próxima possível ao perfil obtido nas simulações, ou seja, no caso de alimentação manual, esta deve ser realizada em períodos curtos de tempo. Ressalte-se que as longas séries mostradas nestas figuras (quase 10 dias) certamente podem ser reduzidas, caso sejam utilizadas cargas maiores de enzimas. Evidentemente, a decisão final sobre a carga enzimática deve ser baseada na economia do processo – custos operacionais do reator versus o preço da enzima. No entanto, a metodologia é imediatamente aplicável a qualquer caso. Tendo-se modelos confiáveis da dinâmica do sistema, trata-se apenas de uma questão de simular diferentes condições de inicialização, a fim de se poder discriminar qual estratégia operacional se encaixa melhor em cada caso.

3.3 SEGUNDA POLÍTICA (P#2): CONTROLE ÓTIMO

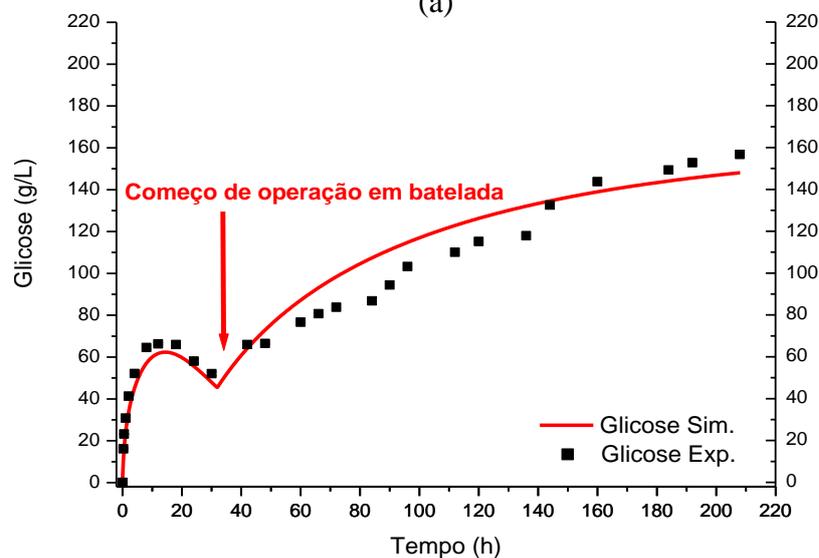
As Figuras 2.11a e 2.11b mostram a comparação entre os dados experimentais e simulados para a política do controle ótimo (P#2).

Neste experimento de validação, embora a alimentação de substrato fosse realizada de uma em uma hora, foi possível seguir mais proximamente o perfil de alimentação calculado na simulação. Isto foi devido à adição do coquetel enzimático no começo do ensaio. Por outro lado, o acúmulo de resíduo sólido no reator ao final da fase de alimentação impediu concluir o perfil alimentar projetado (a adição do bagaço teve que ser interrompida 3 h antes do esperado). Apesar da menor quantidade de substrato adicionada ao reator, a concentração de glicose seguiu de perto a curva simulada. E novamente, a intensificação do processo devido à evaporação da água (e da menor adição de água, a partir da umidade do bagaço) compensou a privação de substrato ao final da fase de alimentação.

Figura 2.11 – Resultados simulados e experimentais para a política de alimentação P#2. (a) Alimentação de bagaço pré-tratado (b) Concentração de produto. As barras de erro referem-se a desvios padrões de experiências independentes em triplicata. As condições de operação são 50°C , $\text{pH } 4,8$, concentração inicial de enzima $e(0) = 13,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \equiv 842,4 \text{ FPU}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$ e concentração inicial de glicose potencial de $44 \text{ g}_{\text{glicose_potencial}}\cdot\text{L}_{\text{solução}}^{-1}$. Observação: barra de erro da dimensão dos símbolos.



(a)



(b)

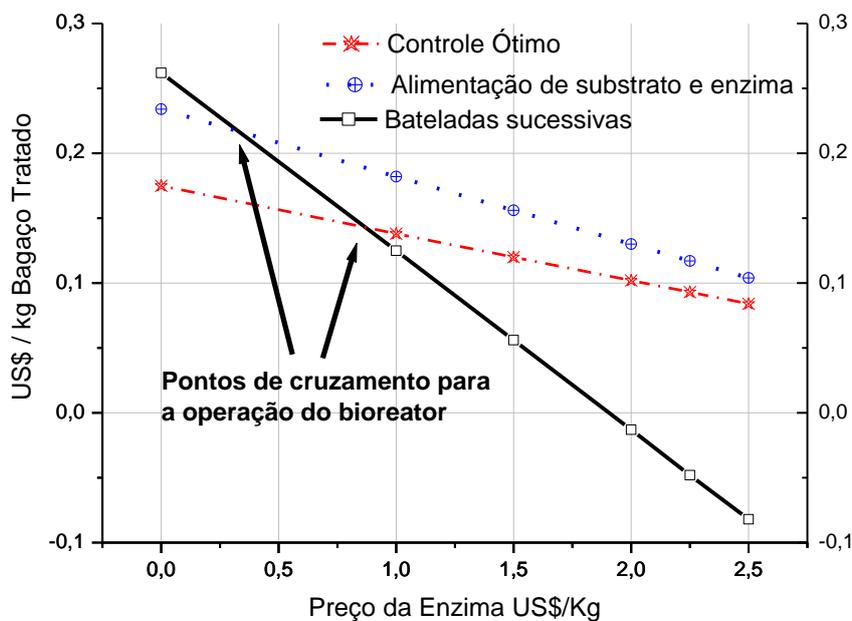
A diminuição na concentração do produto das 15 às 35h (ver Figura 2.11b) é atribuída a efeitos de diluição provocados pela alimentação. O fato de adicionar toda a enzima no começo do processo e ao perfil exponencial acentuado da alimentação, elevou as taxas de produção de produto, chegando a concentrações de glicose de $160 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Lembrando que os

experimentos foram realizados simultaneamente com umidade do ambiente não controlada, onde as variações encontradas se devem às variações de umidade.

3.4 SENSIBILIDADE AO PREÇO DA ENZIMA

A Figura 2.12 apresenta uma comparação da sensibilidade em relação ao preço da enzima entre as políticas de alimentação de batelada alimentada anteriormente e bateladas sucessivas.

Figura 2.12 – Análise de sensibilidade ao preço da enzima.



Na Figura 2.12, a função objetivo, f_{i2} , foi calculada de acordo com as equações 2.7a e 2.7b:

$$f_i = [\text{PreçoEnzima} \cdot (0.001) \cdot (0.46) \cdot P.V] - [\text{PreçoEnzima} \cdot (0.001) \cdot \frac{e_{acumulada}}{108}] \quad (2.7a)$$

$$- [\text{PreçoBagaço} \cdot (0.001) \cdot M_{acumulada}]$$

$$f_{i2} = \frac{f_i}{[(0.001) \cdot M_{acumulada}] } \quad (2.7b)$$

O termo 0,46 na equação (2.7a) transforma a massa de glicose em massa de etanol. O termo 0,001, por sua vez, é utilizado apenas para converter a unidade de massa de gramas para quilogramas. O termo 108 é para converter FPU de enzima em g de enzima. Ambas políticas de batelada alimentada, P#1 e P#2, são menos sensíveis aos preços da enzima do que as bateladas sucessivas. Para P#1, o limite inferior para o preço inicial da enzima foi em torno de 0,35 US\$/kg. Esta é uma informação valiosa para a operação do processo. Exceto por uma pequena parte da faixa de preço da enzima, a batelada alimentada (P#1) é melhor do que as bateladas sucessivas.

A Tabela 2.3 mostra a comparação dos dados simulados e experimentais para P#1, P#2 e batelada simples (Figura 2.1).

Tabela 2.3 - Comparação de dados simulados e experimentais.

	P#1^a		P#2^a		Batelada^b	
	Simul.	Exp.	Simul.	Exp.	Simul.	Exp.
Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	161.9	190.6	145.6	152.8	41.7	42.8
Enzima/Glicose (g.g ⁻¹)	0.038	0.076	0.042	0.067	0.189	0.184
Produtividade (g _{glucose} .L ⁻¹ .h ⁻¹)	0.843	0.992	0.758	0.794	0.217	0.223
Produtividade específica (g _{gluc} .g _{enz} ⁻¹ .h ⁻¹)	0.138	0.068	0.124	0.078	0.028	0.028
Fluxo de caixa (US\$/kg _{bagasse})	0.209	0.117	0.173	0.093	-0.056	-0.048

a. Oito dias de operação do reator.

b. Três bateladas simples de dois dias e dois dias para limpeza; total: 8 dias de operação.

A política P#1 (adição de enzima e substrato) levou a elevadas concentrações de glicose e fluxos de caixa. Entretanto, as produtividades específicas experimentais para P#1 e P#2 foram menores do que as previstas nas simulações. Isto se deve ao fato de que menos bagaço foi alimentado durante os experimentos para os dois casos, quando comparado com as simulações. Finalmente, é importante dizer que os balanços de massa global para a batelada alimentada (P#1) e para batelada (Figura 2.1) na Tabela 2.3, levando em consideração que as

medições de glicose, apresentaram erros de ~5%. Para a política de alimentação P#2, porém, a quantificação da glicose e celobiose não foi suficiente para fechar o balanço de massa global, uma vez que ~22% de celulose não-convertida e oligossacarídeos ainda estavam presentes no final do experimento (que é mais um indicativo de que P#1 é a melhor política de alimentação).

4 CONCLUSÕES

Foram comparadas três estratégias distintas para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado: operação batelada alimentada adicionando enzima e substrato, com o objetivo de sustentar altas taxas de reação (P#1); operação batelada alimentada adicionando apenas o substrato, de acordo com a teoria de controle ótimo (P#2); bateladas sucessivas. As estratégias baseadas em modelos (P#1 e P#2) usaram uma cinética pseudo-homogênea simples para descrever a taxa de hidrólise. Todas as estratégias foram validadas com experimentos em reatores em escala de bancada. As análises de sensibilidade foram realizadas utilizando o preço da enzima como parâmetro, com o objetivo de avaliar o melhor modo de operação para o reator em diferentes cenários. A política de alimentação P#1 (adição de enzima e substrato), seguida pela política de controle ótimo P#2 forneceram melhores receitas do que as bateladas sucessivas para os valores atuais do mercado para a enzima, bagaço e etanol no Brasil (em Setembro de 2012). No entanto, houve um limite em que as bateladas sucessivas se tornaram vantajosas, valores de enzima inferiores a 0.35 US\$/kg_{enzyme}. É claro que estes resultados são baseados apenas em um estudo de caso, e têm o propósito de demonstrar a utilidade da ferramenta. O processo de intensificação num reator semi-contínuo (adicionando enzima e substrato, enquanto água evapora naturalmente) conduziu a concentrações de glicose de aproximadamente 200 g.L⁻¹.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DO METABOLISMO DE XILULOSE EM *S. cerevisiae* VISANDO À MELHOR PRODUÇÃO DE ETANOL EM SISTEMA SIF.

Neste capítulo foca-se na utilização de xilose, principal açúcar encontrado na fração C5, para ser fermentado a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Na primeira parte, o modelo metabólico para *S. cerevisiae* iND750 foi adequado para representar o metabolismo da xilulose. Experiências *in silico* usando o software OptFlux foram realizadas e comparadas com os dados experimentais de cultivos em batelada de *S. cerevisiae*, com o propósito de avaliar/validar o modelo assim como estabelecer relações entre o fluxo de assimilação de xilulose e a seletividade na produção de etanol em relação a xilitol.

Já na segunda parte deste capítulo, experimentos de isomerização e fermentação simultâneas da xilose (SIF) foram realizados em reator contínuo de leito fixo, contendo como biocatalisador pellets de alginato com enzima glicose isomerase e *S. cerevisiae* coimobilizadas para produção de etanol.

1 ANÁLISE DOS FLUXOS METABÓLICOS EM *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DE D-XILULOSE COMO FONTE DE CARBONO UTILIZANDO OPTFLUX

A viabilidade econômica da produção de etanol 2G depende da eficiente fermentação da fração hemicelulósica por *S. cerevisiae*. A D-xilulose, isômero da xilose (principal componente da hemicelulose do bagaço), pode ser convertida pela levedura em biomassa, etanol, xilitol e/ou outros metabólitos.

A otimização da produção de etanol requer a análise do metabolismo da xilulose. Modelos metabólicos permitem efetuar simulações de sistemas biológicos, viabilizando o estudo *in silico* das respostas celulares perante perturbações ambientais e genéticas. Uma das técnicas mais usadas para estudos deste tipo é a Análise do Balanço de Fluxos Metabólicos (do inglês, FBA) que foi explicada em detalhes no item 7 do capítulo 1. Neste trabalho, usando o software OptFlux, foi aplicado o método “parcimonious FBA” ao modelo iND750 para estimar os fluxos metabólicos em condições de aerobiose e anaerobiose, utilizando xilulose como fonte de carbono. Os resultados das simulações foram comparados a

dados experimentais e o modelo foi ajustado adicionando restrições de expressão em fluxos metabólicos da via pentose fosfato e de formação de biomassa. A produção de etanol só foi observada na condição anaeróbia, com favorecimento da seletividade para baixos fluxos de xilulose.

1.1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1.1 Modelo metabólico

Para realização das experiências *in silico* foi utilizado o modelo iND750 reconstruído a partir da escala genômica, totalmente compartimentalizado, da levedura *S. cerevisiae*, contando com 750 genes e 1149 reações. Todas as 1149 reações incluídas neste modelo são elementares e foram atribuídas a um dos oito locais celulares (espaço extracelular, citosol, mitocôndria, peroxissoma, núcleo, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, ou vacúolo) (DUARTE et al., 2004).

1.1.2 Software

Foi usado o OptFlux v3.0.3, software modular e de fonte aberta, destinado a apoiar as tarefas da engenharia metabólica *in silico*, permitindo o uso de modelos metabólicos estequiométricos para simulação do fenótipo de organismos de tipo selvagem e mutante, utilizando métodos de pFBA, dentre outros (ROCHA et al., 2010).

1.1.3 Dados experimentais

Resultados experimentais foram obtidos no DEQ/UFSCar pelo aluno de doutorado Carlos Alberto Galeano com a colaboração desta Doutoranda, com uma linhagem de *S. cerevisiae* selvagem adaptada ao crescimento em xilulose (SUAREZ et al., 2013).

Microrganismo: O microrganismo utilizado foi uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* selvagem, que foi adaptada ao crescimento em xilulose (pelo aluno de doutorado Carlos Alberto Galeano Suarez), isolada a partir do fermento biológico fresco (da marca Itaiquara, Brasil).

Substrato: Xarope concentrado de xilose-xilulose foi preparado seguindo o procedimento descrito por Chiang et. al., (1981). A reação de isomerização era iniciada com a adição de 5g.L^{-1} da enzima glicose isomerase imobilizada em quitosana, num reator de bancada contendo uma solução de 700g/L de xilose e 3mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a pH 7,0 e temperatura de 68°C . Quando as concentrações de xilose e xilulose alcançaram a proporção de equilíbrio e se mantiveram constantes, o meio reacional foi filtrado para separação da enzima. A solução obtida foi reduzida a um terço de seu volume utilizando-se um rotaevaporador a 45°C e posteriormente diluída quatro vezes em etanol P.A. A solução foi resfriada a 4°C e por diferença na solubilidade em etanol a baixas temperaturas, parte da xilose precipitou, podendo ser separada da xilulose por filtração. A solução resultante foi evaporada e liofilizada para remover o etanol. A mistura final continha 70% de D-xilulose e 30% de D-xilose.

Cultivo do microrganismo: A preparação do pré-inóculo foi realizada em frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 10 mL de meio YPD (10 g.L^{-1} de extrato de levedura, 20 g.L^{-1} de peptona e 20 g.L^{-1} de glicose). Após a adição de uma colônia isolada do microrganismo crescida em placa, os meios de germinação eram mantidos a 30°C e 250 rpm. Após 24 h de incubação, o pré-inóculo foi transferido para frasco de 1000 mL contendo 250 mL de meio YPD e incubado em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm durante 24h. Após ler a densidade ótica do inóculo, este foi centrifugado por 20 minutos a 14000g (4000 rpm) em uma centrífuga refrigerada EPPENDORF, modelo 5810R a 4°C , em frascos de centrifuga de 400 mL. O biorreator foi inoculado com aproximadamente 100 mL de solução concentrada de células.

Cultivos em batelada foram realizados em biorreator tipo tanque agitado, encamisado e aerado, com uma capacidade de 2 litros (Applikon, Netherlands), conectado a um analisador de gases (Sick/Maihak S.710). Fluxômetros de massa (GFC AALBORG) foram empregados para suprir ar e oxigênio. Em cultivos aeróbios, a agitação ficou entre 200 e 700 rpm e a entrada de ar ou ar enriquecido com O_2 entre 1 e 2 VVM. Agitação e aeração foram ajustadas ao longo dos cultivos para garantir que a concentração de O_2 dissolvido fosse mantida em 30% da saturação (eletrodo Metler Toledo, modelo CE, O2 4050). Em cultivos anaeróbios o biorreator foi equipado com mangueiras de noprène e borbulhado com N_2 ultrapuro (contendo $0,9\text{ ppm}$ de O_2) durante 12 horas antes da inoculação e ao longo do cultivo. A temperatura foi mantida em 31°C e pH 5,0. O controle de pH foi realizado pela adição de solução de NaOH 5M ou H_3PO_4 ao 20%. Foi utilizado meio mínimo, contendo 5,0

g/L de KH_2PO_4 , 2,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,5 g/L de uréia. A concentração inicial de D-xilulose foi de 28 g/L para cultivo aeróbio e 14 g/L para cultivo anaeróbio.

1.1.4 Metodologia de cálculo dos fluxos metabólicos

Calculo dos Fluxos para Cultivos em Batelada:

Os calculos dos fluxos metabólicos para os cultivos em batelada foram baseados em balanços de material. A definição de fluxo esta dada por:

$$\text{Fluxo} = \frac{r_i}{C_x} \quad (3.1)$$

r_i é a velocidade de consumo e/ou produção do componente i e C_x é a concentração de massa celular seca.

$$\text{Balanço de Células:} \quad \frac{d(m_x)}{dt} = r_x V \quad (3.2)$$

$$\text{Balanço de Substrato:} \quad \frac{d(m_s)}{dt} = -r_s V \quad (3.3)$$

$$\text{Balanço de Produto:} \quad \frac{d(m_p)}{dt} = r_p V \quad (3.4)$$

$$\text{Balanço de CO}_2: \quad n_{\text{CO}_2\text{prod}} = y_{\text{CO}_2s} \frac{Q_s P_s}{T_s R} - y_{\text{CO}_2e} \frac{Q_e P_e}{T_e R} \quad (3.5)$$

P_e e T_e são a pressão e a temperatura do gás às condições do fluxômetro (condições CNTP), P_s e T_s são a pressão e a temperatura do gás às condições do laboratório, V é o volume do reator. Neste caso, o volume do reator não foi considerado constante, pois, amostragens podem causar entorno de 30% de variação no volume, o que levaria a introduzir 30% de erro nos cálculos. Isolando o termo de velocidade de reação r das equações (3.2 – 3.4) e substituindo na equação (3.1) obtemos as expressões finais para o cálculo dos fluxos metabólicos:

$$\text{Fluxo de biomassa: } Fluxo_x = \frac{dm_x}{dt} \frac{1}{V} \quad (3.6)$$

$$\text{Fluxo de substrato: } Fluxo_s = -\frac{dm_s}{dt} \frac{1}{V} \quad (3.7)$$

$$\text{Fluxo de produto: } Fluxo_p = -\frac{dm_p}{dt} \frac{1}{V} \quad (3.8)$$

A partir das equações (3.6 - 3.8) o procedimento utilizado para determinar os fluxos metabólicos para o cultivo em batelada foi o seguinte:

1. Fazer um gráfico de m_i vs. de tempo.
2. Ajustar um polinómio para o gráfico anterior ($m_i(t)$).
3. Fazer a derivada do polinómio ajustado no passo anterior (dm_i/dt).
4. Calcular as equações (3.6 - 3.8) para cada tempo com o fim de obter o fluxo ao longo do experimento ($Fluxo_i(t)$).

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

$$\text{Balanço de Nitrogênio: } y_{N2e} \frac{Q_e P_e}{T_e R} = y_{N2s} \frac{Q_s P_s}{T_s R} \quad (3.9)$$

Onde,

$$y_{N2e} = 1 - y_{O2e} - y_{CO2e}$$

$$y_{N2s} = 1 - y_{O2s} - y_{CO2s}$$

Isolando Q_s da equação (3.9) obtemos:

$$Q_s = \frac{y_{N2e} Q_e P_e T_s}{y_{N2s} P_s T_e}$$

A partir da equação (3.5) podemos calcular os mols de CO₂ produzidas ($n_{CO2prod}$), e finalmente obter o fluxo de CO₂ com a equação a seguir:

$$\text{Fluxo de CO}_2: Fluxo_{CO2} = \frac{n_{CO2prod}}{m_x} \quad (3.10)$$

Os fluxos foram determinados durante a fase exponencial do cultivo em batelada porque em essa condição as células não se encontram limitadas pelos substratos e nutrientes do meio, pode ser assumido um estado pseudo-estacionário.

Calculo dos Fluxos para Cultivo em Contínuo:

Os calculos dos fluxos metabólicos para os cultivos em contínuo foram baseados em balanços de material. A definição de fluxo, no estado estacionário esta dada por:

$$Fluxo = \frac{\bar{r}_i}{C_x} \quad (3.11)$$

\bar{r}_i é o valor médio da velocidade de consumo e/ou produção do componente i e \bar{C}_x é o valor médio da concentração de massa celular seca.

$$\text{Balanço de Células: } \bar{C}_x \bar{F} = r_x \bar{V} \quad (3.12)$$

$$\text{Balanço de Substrato: } \bar{F}(C_S - C_{SF}) = -r_s \bar{V} \quad (3.13)$$

$$\text{Balanço de Produto: } \bar{F}C_p = r_p \bar{V} \quad (3.14)$$

\bar{V} é o valor médio do volume do reator, neste caso, o volume foi considerado constante (amostragem realizada na corrente de saída do reator), e \bar{F} é o valor médio da vazão de entrada no reator. Para determinar os fluxos de células, substrato e produto, isolamos o termo de velocidade de reação r das equações (3.12 – 3.14) e substituindo na equação (3.11) e obtemos as expressões finais para o cálculo dos fluxos metabólicos:

$$\text{Fluxo de biomassa: } Fluxo_x = \frac{\bar{F}}{\bar{V}} = \bar{D} \quad (3.15)$$

$$\text{Fluxo de substrato: } Fluxo_s = \bar{D} \frac{(C_{SF} - C_S)}{C_x} \quad (3.16)$$

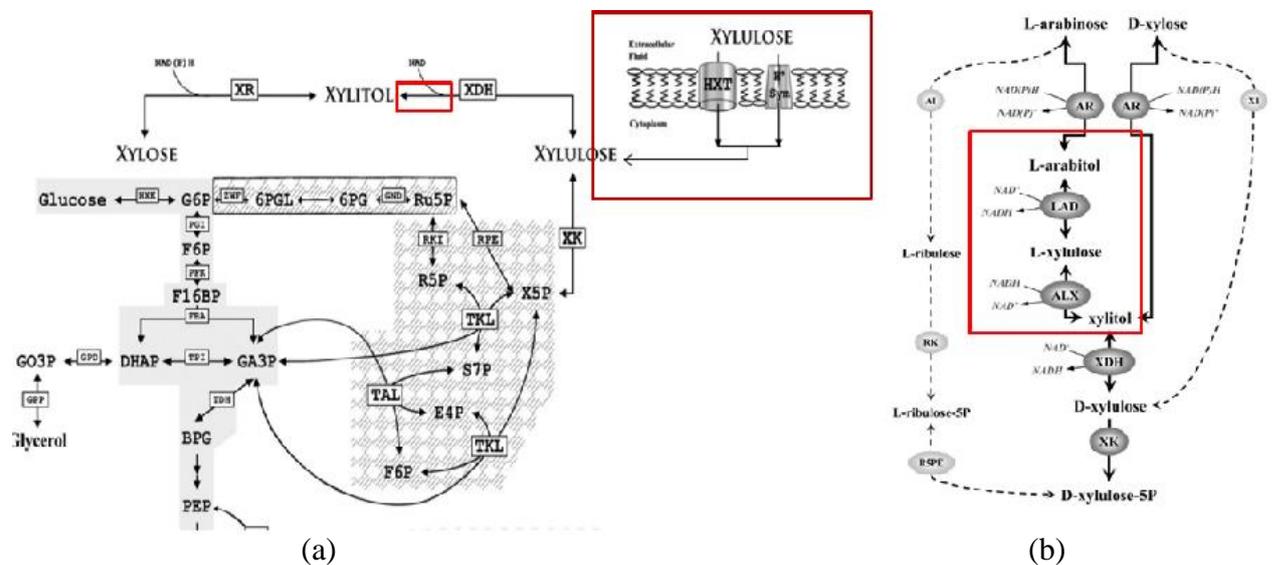
$$\text{Fluxo de produto: } Fluxo_p = \bar{D} \frac{C_p}{C_x} \quad (3.17)$$

\bar{D} é a taxa de diluição. A partir das equações (3.15 - 3.17) os fluxos metabólicos podem ser determinados para cultivos em contínuo, no final um ajuste de unidades deve ser realizado para obter unidades utilizadas no software OptFlux (mmol_i.gDWC⁻¹.h⁻¹).

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Considerando que o modelo original iND750 foi construído para o metabolismo de hexoses, a representação do metabolismo de xilulose exigiu que algumas modificações fossem introduzidas. Conforme mostra a Figura 3.1a, foi representada como reversível a reação de xilitol para xilulose e foi realizada a inclusão de uma reação irreversível para o transporte de xilulose do espaço extracelular para o interior da célula. Foram também incluídas duas reações da via L-arabinose para produção de L-arabitol, espécie com capacidade de ser excretada para o meio extracelular (ver Figura 3.1b). Esta última modificação foi realizada devido a resultados obtidos no grupo de pesquisa do projeto BIOEN do DEQ/UFSCar que apontaram a produção de arabitol por *S. cerevisiae* usando xilulose como fonte de carbono.

Figura 3.1 – Modificações realizadas ao modelo iND750. (a) utilização de xilulose como fonte de carbono e produção de xilitol a partir de xilulose, e (b) adição da via L-arabinose para produção de L-arabitol.



Fonte: adaptado de CHU e LEE, 2007.

Resultados experimentais correspondentes às 14h de cultivo (caso aeróbio) e 9h de cultivo (caso anaeróbio) de uma linhagem selvagem de *S. cerevisiae* foram utilizados para testar o modelo por serem dados correspondentes à fase exponencial de crescimento. Na Tabela 1 podem ser encontrados os valores experimentais usados, assim como os resultados obtidos nas simulações do modelo modificado em condições de aerobiose e anaerobiose para a linhagem selvagem.

Tabela 3.1 – Comparação de dados experimentais (de crescimento e produção de metabólitos) e simulados com o modelo iND750 obtidos para a linhagem selvagem

	AEROBIOSE (mmol/gDWC.h)		ANAEROBIOSE (mmol/gDWC.h)	
	Experimental (14h)	Simulado	Experimental (9h)	Simulado
FLUXOS				
Biomassa (h⁻¹)	0,024	0,059	0,0054	0,015
Etanol	0,0	0,0	0,93	1,2
Xilitol	0,04	0,0	0,27	0,044
Arabitol	0,009	0,0	0,18	0,0
Acetato	0,0	0,0	0,071	0,0
CO₂	1,64	1,66	1,12	1,26
	RESTRIÇÕES			
Xilulose	0,74		0,88	
Ureia	0,1		0,025	

Conforme mostra a Tabela 3.1, os dados simulados para aerobiose não mostraram bons ajustes para biomassa e também não houve produção de metabólitos importantes como xilitol e arabitol; já para CO₂, o erro ficou em torno de 1%. Para simulações em anaerobiose, o modelo apresentou uma melhor resposta do que o caso anterior, mostrando produção dos metabólitos mais importantes como etanol e xilitol, embora as magnitudes dos fluxos não representem os dados experimentais.

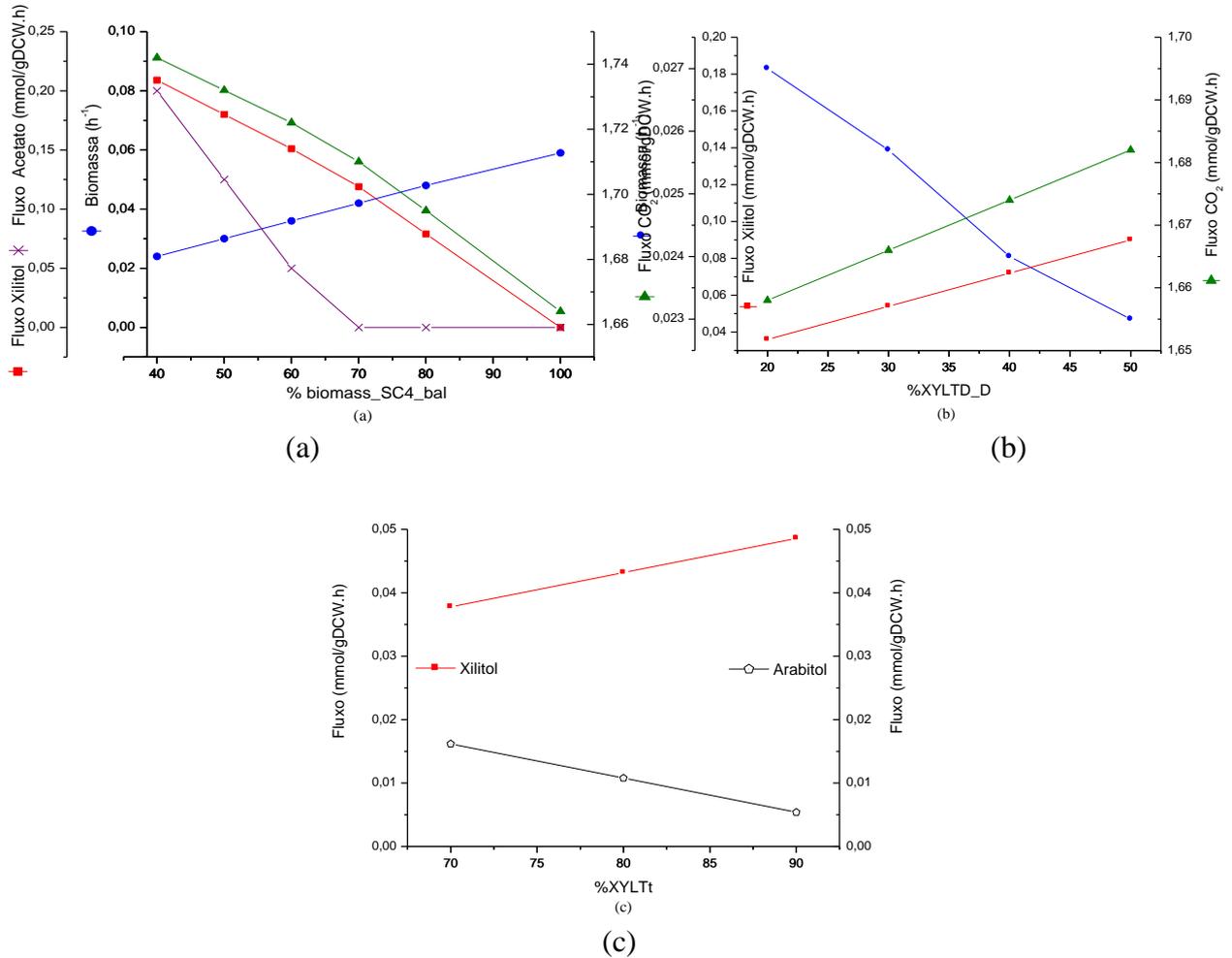
Para calibrar o modelo na condição de cultivo aeróbio, foram utilizados os fluxos de substratos e metabólitos calculados para as 14h de cultivo (fase exponencial). Já para validação, foram usados os fluxos calculados para as 16h e 22h de cultivo. Foram realizadas experiências *in silico* utilizando o módulo disponível no software OptFlux para sub/sobre expressar as vias metabólicas consideradas chave para o ajuste do modelo metabólico aos dados experimentais. As reações que foram objeto deste estudo foram: (i) formação de biomassa, (ii) formação de xilitol a partir de xilulose e (iii) reação de transporte de xilitol para o espaço extracelular (ver Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Reações do metabolismo de *S. cerevisiae* a serem sub expressadas

REAÇÃO	NOME
Duarte et al., (2004)	Biomass_SC4_bal
nad + xilitol --> h + nadh + xilulose	XYLTD_D
xilitol[e] <==> xilitol[c]	XYLTt

[e]:extracelular, [c]: citosol

Figura 3.2 – Comportamento dos metabólitos para o caso aeróbio ao subexpressar uma via metabólica. (a) Biomass_SC4_bal (biomassa), (b) XYLT_D (xilitol desidrogenase) e (c) XYLTt (transporte de xilitol).



A Figura 3.2a apresenta o comportamento dos metabólitos ao subexpressar a reação Biomass_SC4_bal. Ao diminuir o valor do fluxo de biomassa, observou-se uma queda no valor da mesma, assim como um aumento no valor dos fluxos de xilitol, CO₂ e acetato. O valor correspondente aos 50% da reação Biomass_SC4_bal foi selecionado por apresentar resultados mais próximos aos dados experimentais. Com a porcentagem do fluxo de biomassa definida, foi realizada a subexpressão da reação XYLT_D (ver Figura 3.2b). Os fluxos de xilitol e CO₂ diminuíram e verificou-se um leve aumento no fluxo de biomassa. Foi selecionado o valor correspondente a 30% da reação XYLT_D por apresentar resultados mais próximos aos dados experimentais. Como as simulações não apresentavam produção de arabitol e sim produção excessiva de xilitol, foi restringida também a reação XYLTt em 80%,

de forma a representar melhor os fluxos experimentais de xilitol e arabitól (ver Figura 3.2c). Não houve produção de etanol nesta condição.

A Tabela 3.3 mostra os resultados obtidos nas simulações de ajuste e validação do modelo modificado em condições de aerobiose. As simulações do modelo aeróbio apresentaram produção de acetato, que não foi constatada experimentalmente. Contudo, dados experimentais apontam a formação de um metabólito não identificado. Esforços para elucidar qual é este metabólito não identificado estão ainda sendo realizados no grupo (foram testados vários padrões da via das pentoses fosfato, dentre eles: sedoheptulose-7-fosfato, ácido oxálico, ácido láctico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico). Senac e Hahn-Hägerdal (1990) realizaram cultivos anaeróbios de *S. cerevisiae* em batelada usando xilose-xilulose como fonte de carbono e relataram que não conseguiram explicar em torno de 25% do carbono consumido (ou seja, não conseguiram fechar o balanço de carbono). Já nos cultivos realizados por eles com glicose como fonte de carbono, conseguiram fechar completamente o balanço.

Ao igual ao caso anterior, neste trabalho os balanços de carbono nos experimentos usando xilulose também não fecharam. Em experimentos aeróbios o balanço fechou com 75% no final do experimento (44h de cultivo, embora na fase exponencial apresentou uma recuperação de 89%). Já no caso anaeróbio, o balanço de carbono apresentou uma recuperação final de 83% (com recuperação de carbono na fase exponencial de 87%) (ver balanços de carbono no Apêndice B). Devido ao modelo metabólico ser estequiométrico, o carbono faltante nos dados experimentais é direcionado para acetato nas simulações com OptFlux.

Tabela 3.3 – Comparação dos fluxos experimentais e simulados (aeróbio).

	AJUSTE (mmol/gDWC.h)		VALIDAÇÃO (mmol/gDWC.h)			
	Experimental (14h)	Simulado	Experimental (16h)	Simulado	Experimental (22h)	Simulado
Biomassa (h⁻¹)	0,024	0,026	0,023	0,025	0,018	0,023
Xilitol	0,04	0,043	0,046	0,044	0,06	0,041
Arabitól	0,009	0,01	0,0085	0,01	0,0074	0,009
Acetato	0,0	0,47	0,0	0,456	0,0	0,417
CO₂	1,64	1,67	1,3	1,61	1,27	1,48
Xilulose	0,74		0,72		0,66	
Uréia	0,1		0,09		0,08	

Observação: o fluxo de oxigênio para aerobiose total é 1,518 mmol/gDW.h

No caso do experimento anaeróbio, foram utilizados, para ajustar o modelo, os fluxos calculados com os dados obtidos em 9h de cultivo, enquanto que para validação foram usados os fluxos calculados para as 7h e 11h de cultivo. Utilizando o módulo “*Under/Over Expression: Reaction Simulation*” do software OptFlux, foi subexpressada a via metabólica de formação de biomassa (ver Tabela 3.2).

Diferente do caso aeróbio, o valor correspondente aos 90% da reação Biomass_SC4_bal foi escolhido na condição de anaerobiose pelo fato dos fluxos simulados apresentarem um ajuste melhor aos experimentais. Os resultados das simulações apresentaram valores mais baixos para xilitol em comparação aos dados experimentais e, por isso, as modificações das reações XYLTD_D e XYLt não foram consideradas para este caso, e por isso o modelo descola na produção de arabitol (não foi possível ajustar o arabitol por não houver fluxo de xilitol suficiente para direcionar para a via de arabitol). As validações realizadas com valores de fluxo de xilulose inferiores ao utilizado no ajuste (ou seja, em tempos maiores de cultivo), apresentaram melhor concordância com os fluxos experimentais. A Tabela 3.4 mostra os resultados obtidos. Devido ao modelo metabólico ser estequiométrico, o carbono faltante nos dados experimentais é direcionado neste caso para maior produção de biomassa nas simulações com OptFlux.

Tabela 3.4 – Comparação de dados experimentais e simulados (anaeróbio).

	AJUSTE (mmol/gDWC.h)		VALIDAÇÃO (mmol/gDWC.h)			
	Experimental (9h)	Simulado	Experimental (7h)	Simulado	Experimental (11h)	Simulado
Biomassa (h⁻¹)	0,0054	0,013	0,0043	0,018	0,0065	0,0088
Etanol	0,93	0,95	0,79	1,27	0,66	0,63
Xilitol	0,27	0,19	0,27	0,24	0,0	0,1
Arabitol	0,18	0,0	0,23	0,0	0,07	0,0
Acetato	0,07	0,05	0,07	0,06	0,04	0,03
CO₂	1,0	1,06	1,3	1,42	0,7	0,7
Succinato	0,0	0,01	0,088	0,002	0,0	0,0
Xilulose	0,88		1,18		0,58	
Uréia	0,025		0,025		0,025	

As simulações do modelo anaeróbio apresentaram boas previsões para etanol e xilitol sem carecer de muitas modificações ao modelo, embora não tenha previsto a formação de arabitol e tenha sobre-estimado o fluxo de formação de biomassa. A seletividade em etanol

foi favorecida com a diminuição do fluxo de xilulose. Comparando os resultados das Tabelas 3.3 e 3.4 pode-se ver como oxigênio é um fator importante para o aumento da produção de etanol em relação à produção de xilitol. Ausência de oxigênio levou a um maior direcionamento da xilulose para a produção de xilitol, provavelmente pela necessidade de regenerar os cofatores presentes na cadeia metabólica (NAD⁺ e NADH). Identificar uma condição ótima de operação por limitação do fornecimento de oxigênio que favoreça a produção de etanol é fundamental para o estabelecimento de um processo industrial baseado no aproveitamento da fração C5 do bagaço de cana-de-açúcar. A Tabela 3.5 mostra os resultados obtidos nas simulações de limitação de oxigênio utilizando os modelos ajustados.

Tabela 3.5 – Simulações com vários níveis de fluxos de oxigênio e xilulose para o modelo anaeróbio ajustado.

C, O₂ E METABÓLITOS (mmol/gDWC.h)							
Fonte de Carbono (C)	O₂ disponível	O₂ consumido	Taxa de crescimento (h⁻¹)	Etanol	Xilitol	Acetato	Seletividade Para Etanol (mol_{etanol}·mol⁻¹_{xilitol})
Xilulo (-1,18)	-0,25	-0,25	0,027	1,056	0,134	0,133	7,88
	-0,1	-0,1	0,023	1,301	0,157	0,108	8,29
	-0,05	-0,05	0,021	1,308	0,186	0,079	7,03
Xilulo (-0,88)	-0,25	-0,25	0,022	0,67	0,095	0,108	7,05
	-0,1	-0,1	0,018	0,951	0,106	0,087	8,97
	-0,05	-0,05	0,016	0,976	0,130	0,066	7,51
Xilulo (-0,58)	-0,25	-0,25	0,017	0,284	0,056	0,083	5,07
	-0,1	-0,1	0,013	0,565	0,067	0,062	8,43
	-0,05	-0,05	0,011	0,644	0,075	0,054	8,59

Observação: o fluxo de oxigênio para aerobiose total é 1,518 mmol/gDWC.h

Os resultados apresentados na Tabela 3.5 foram utilizados para construir um gráfico de superfície de resposta correlacionando as variáveis: fluxo de xilulose, fluxo de oxigênio e seletividade para etanol (ver Figura C.1 no Apêndice C).

Quando o fluxo de xilulose disponível foi aumentado, comparando nas mesmas condições de oxigênio, foi constatado (nas simulações) que houve desvio de fluxo da fonte de

carbono para maior produção de xilitol. Também se pode observar que são necessários maiores fluxos de oxigênio para atingir a mesma faixa de seletividades quando comparado com fluxos menores de xilulose. Vale a pena ressaltar que a maiores fluxos da fonte de carbono, o fluxo de etanol produzido aumenta, favorecendo a quantidade de etanol produzido.

Na Figura C.1 podemos ver que o para um determinado fluxo de xilulose e vários níveis de fluxos de oxigênio, o comportamento da curva não é linear e sim em forma de sino, onde existe um valor máximo de seletividade em etanol para uma determinada condição de oxigênio, ou seja, a melhor condição de operação não resultou ser a de maior ou menor oxigênio e sim uma condição que poderíamos chamar de “ótima”.

Analisando valores pontuais da Tabela 3.5, podemos ver que para valores de fluxo de xilulose de 1,18 mmol/gDWC.h e de oxigênio de 0,25 mmol/gDWC.h os fluxos de etanol diminuíram consideravelmente, não sendo uma condição atraente de operação. Para valores de oxigênio de 0,05 mmol/gDWC.h os fluxos de xilitol e etanol aumentaram, indicando que *S. cerevisiae* necessita da regeneração de cofatores NAD⁺, fato que resulta em acúmulo de xilitol. Já para valores de oxigênio em torno de 0,1 mmol/gDWC.h houve diminuição do fluxo de xilitol, sem afetar significativamente a produção de etanol, favorecendo a seletividade em etanol.

Fica claro, então, que valores de oxigênio e xilulose disponíveis nos experimentos de *S. cerevisiae* são cruciais para obter alta seletividade em etanol.

1.3 CONCLUSÕES

Foi obtido um modelo iND750 modificado, com o qual foram alcançadas boas predições dos fluxos metabólicos para a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Itaiquara adaptada ao consumo de xilulose utilizada neste estudo. Com o procedimento realizado *in silico* de impor restrições aos fluxos de biomassa e xilitol (reação de transporte e produção) para o modelo aeróbio foram obtidos resultados simulados muito próximos aos dados obtidos experimentalmente com esta linhagem. Todavia, o modelo aeróbio apresentou produção de acetato, que não foi constatada experimentalmente, o que resulta coerente, pois experimentalmente o balanço de carbono nos tempos escolhidos apresentou uma recuperação inferior aos 100% e devido ao modelo metabólico ser estequiométrico, o carbono faltante nos dados experimentais é direcionado para acetato nas simulações com OptFlux. Já o modelo anaeróbio simulado apresentou melhores ajustes aos dados experimentais, não sendo

necessário impor restrições aos fluxos de transporte e produção de xilitol, somente realizando restrições no fluxo de formação de biomassa, as experiências *in silico* do modelo anaeróbio apresentaram boas predições para os fluxos dos principais metabólitos que são etanol e xilitol, assim como para o fluxo de CO₂, embora não tenha previsto a formação de arabitól e tenha direcionado o carbono faltante para sobre-estimar o fluxo de formação de biomassa.

Simulações realizadas variando o fluxo de oxigênio disponível (simulações como oxigênio limitado) mostraram que a levedura *S. cerevisiae* apresenta umas regiões de fluxo de oxigênio ótimas para maior produção de etanol e menor produção de xilitol, mostrando importantes variações na seletividade etanol/xilitol, sendo este um ponto importante a ser estudado em experimentos SIF. Para definir melhor as regiões de trabalho onde se tem maior seletividade em etanol foi construído um gráfico 3D (ver Figura C.1 no Apêndice C).

2 PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE EM CULTIVOS SIF

Nesta secção foi estudada a isomerização e fermentação simultânea de xilose a etanol (SIF) usando a enzima glicose isomerase e a levedura *S. cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato de cálcio. Para este estudo é importante o uso de condições operacionais adequadas para viabilizar o processo. Nesse sentido, o grupo de pesquisa do DEQ/UFSCAR vem trabalhando com o objetivo de definir condições adequadas para condução da SIF de xilose em operação contínua. Neste contexto, Silva et al., (2012) desenvolveram um biocatalisador contendo uma levedura de panificação e glicose isomerase coimobilizadas em gel de alginato de cálcio (13% de levedura úmida e 5% de glicose isomerase imobilizada). Experimentos iniciais realizados com este biocatalisador, usando uma concentração inicial de xilose de 65 g.L⁻¹ a 35°C e pH 6,0, alcançaram uma conversão de 75,4% em 48 horas, sendo que 40% do açúcar foi assimilado durante as primeiras 12 horas de ensaio. Após esse tempo, houve uma queda no pH durante o processo (em torno de pH 4,5), causando conversão lenta, ou seja, foi necessário mais do dobro do tempo para conseguir uma assimilação semelhante do açúcar.

Para contornar o problema da queda do pH durante o processo, Aquino (2013), incorporou carbonato de cálcio à etapa de coimobilização da enzima glicose isomerase

imobilizada com a levedura. O carbonato de cálcio é um sal que ao ser hidrolisado produz Ca(OH)_2 , uma base que aumenta o pH de soluções aquosas. Nos ensaios onde o carbonato de cálcio estava presente, o pH foi mantido entre 5,4 e 5,6 e conversão e produtividade foram melhoradas.

Estudos para o aprimoramento do biocatalisador foram realizados, sendo selecionadas como as melhores concentrações: 10% de levedura em base seca e 20% de glicose isomerase imobilizada. As condições operacionais também foram estudadas, sendo escolhidas: 32°C e pH 5,6 por apresentarem menor tempo de conversão e melhor seletividade, quando usada a levedura de panificação Itaiquara (Levedura também utilizada neste trabalho) (AQUINO, 2013). Estas condições foram as empregadas no presente estudo.

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* selvagem, que foi adaptada ao crescimento em xilulose (pelo aluno de doutorado Carlos Alberto Galeano Suarez), isolada a partir do fermento biológico fresco (da marca Itaiquara, Brasil).

2.1.2 Produção de levedura viável para coimobilização

Na preparação de meios de crescimento e produção, a fonte de carbono foi esterilizada separadamente dos demais nutrientes. As condições de esterilização foram 120°C durante 20 min. As soluções contendo sais foram esterilizadas por filtração usando filtros de 0,22µm.

Preparação de Placas de Petri em meio com ágar:

S. cerevisiae adaptada foi armazenada como células vegetativas em Eppendorfs estéreis contendo 900 µL de caldo fermentativo junto com 100 µL de solução crioprotetora de glicerol 80% v/v, em ultrafreezer a -70°C.

Em placas de Petri estéreis foram adicionados 20 ml de meio YPD ágar (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico) o qual foi previamente fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação, com auxílio de uma alça de platina estéril, raspou-se o Eppendorf que continha o microrganismo e espalhou-se sobre a placa de forma homogênea (formando colônias isoladas). As placas foram incubadas a 30°C durante dois dias.

Preparação do inóculo:

Realizada em frasco estéril de 250 ml contendo 20 ml de meio YPD (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona e 20 g.L⁻¹ de glicose). O pH foi corrigido para 5,0 utilizando soluções de NaOH e HCl 1M. Após a adição de uma colônia isolada do microrganismo crescida em placa, os meios de germinação eram mantidos em câmara rotativa (*shaker*) a 30°C e 250 rpm, permanecendo as células de *S. cerevisiae* incubadas durante 24h.

Condições de crescimento:

Após 24h de incubação, o inóculo foi transferido a frasco estéril de 1000 ml contendo 250 ml do meio YPD a pH 5,0, e incubado em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm. A adição de 5 ml de inóculo dava início ao cultivo, com duração de 24h (fase estacionária de crescimento atingida).

Após ler a densidade ótica do inóculo, este foi centrifugado por 20 minutos a 14000g (4000 rpm) em uma centrífuga refrigerada EPPENDORF, modelo 5810R a 4°C, em frascos de centrifuga de 400 ml. O sobrenadante foi descartado. A massa celular recuperada foi lavada e novamente centrifugada deixando aproximadamente 20 ml para re-suspender as células. A suspensão de levedura obtida era submetida a um processo de filtração a vácuo, e posteriormente, uma amostra era submetida a determinação de umidade.

2.1.3 Enzima glicose isomerase imobilizada em glutaraldeido-quitosana

O grupo de pesquisa em Engenharia de Processos Enzimáticos (LabEnz) do DEQ/UFSCar, preparou e disponibilizou a enzima glicose isomerase imobilizada em glutaraldeido-quitosana (com a colaboração desta Doutoranda) para ser utilizada no

desenvolvimento deste trabalho. A enzima utilizada foi glicose isomerase solúvel (E.C. 5.3.1.5), GENSWEET SGI, produzida por *Streptomyces rubiginosus*, cedida pela Genencor Internacional. A metodologia para preparação do suporte e imobilização é explicada em detalhe por Silva (2013). A enzima foi armazenada a 4°C em uma solução a 0,1% de benzoato de sódio (utilizado como conservante).

2.1.4 Coimobilização de glicose isomerase imobilizada e *S. cerevisiae* em alginato de cálcio

O processo de coimobilização da enzima glicose isomerase imobilizada e a levedura *S. cerevisiae* selvagem adaptada em alginato de cálcio foi realizado de acordo com Silva (2013). É importante ressaltar que os procedimentos descritos a seguir foram realizados de forma estéril, dentro do fluxo laminar.

Preparou-se uma suspensão aquosa contendo 1% (m/m) de alginato, 10% (m/m) de levedura em massa seca, 20% (m/m) de enzima e 0,5% (m/m) de CaCO₃. Inicialmente, 1% de alginato de sódio foi dissolvido em tampão fosfato 50 mM estéril a pH 8,0, utilizando um agitador magnético. Após a homogeneização, foi adicionada a quantidade de enzima necessária para obter a concentração final desejada. Devido à enzima ser armazenada em uma solução a 0,1% de benzoato de sódio, esta deve passar por um processo de lavagem, retirando por filtração a vácuo a maior quantidade de umidade possível, antes de ser utilizada. A enzima lavada foi suspensa em tampão fosfato em um tubo falcon estéril e deixada durante 30 min num banho a 68°C, para esterilização.

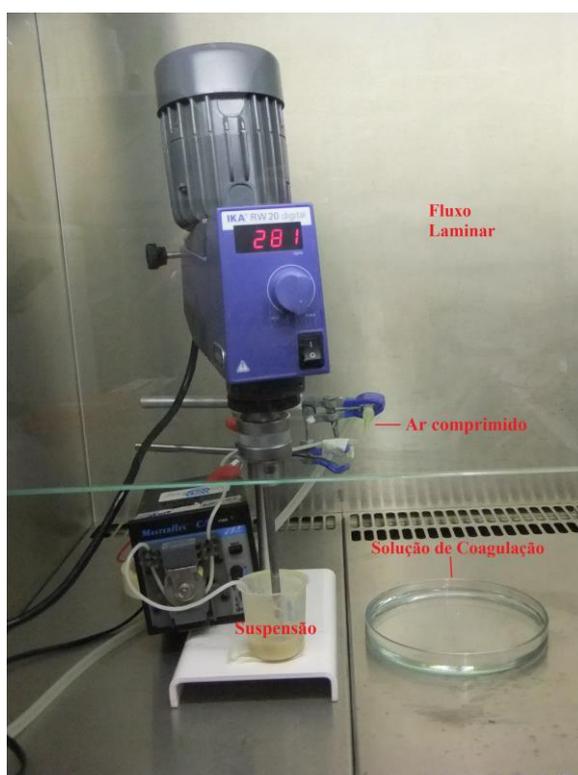
À solução anterior foi adicionada levedura previamente filtrada (ver item 2.1.2 deste capítulo) para obter uma concentração final de 10% em massa seca. Finalmente, foi adicionado o CaCO₃ estéril. Após mistura sob agitação magnética, a suspensão aquosa obtida era peneirada para evitar o entupimento do sistema de coimobilização.

Sistema de coimobilização:

A montagem do sistema de coimobilização é mostrada na Figura 3.3. A suspensão peneirada obtida foi submetida a agitação mecânica enquanto era bombeada por uma mangueira de silicone, com ajuda de uma bomba peristáltica. Uma corrente de ar

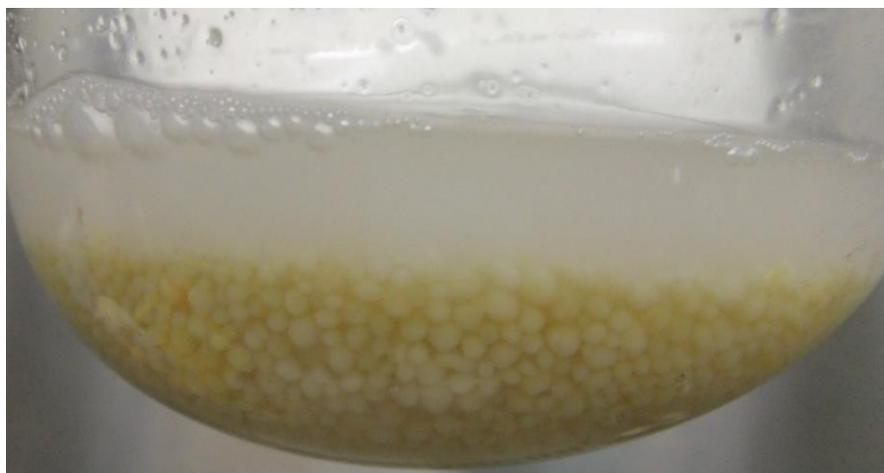
comprimido foi colocada perpendicularmente do final da mangueira, para acelerar o gotejamento, e assim auxiliar a formação de gotas de pequeno diâmetro.

Figura 3.3 – Sistema para coagulação do biocatalisador composto por GI immobilizada e *S. cerevisiae* coimobilizadas em alginato de cálcio.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 3.4 – Pellets obtidos após coimobilização e coagulação.



Fonte: arquivo pessoal.

A suspensão contendo enzima, levedura, CaCO_3 e alginato foi então gotejada em uma solução de coagulação contendo CaCl_2 0,25 M e MgCl_2 0,25M para formação dos pellets. Os pellets formados foram peneirados para retirar a solução de coagulação e posteriormente armazenados numa solução de cura em geladeira a 4°C , durante aproximadamente 20 horas. A composição da solução de cura está descrita na Tabela 3.6. O pH dessa solução era ajustado ao mesmo valor desejado para o processo SIF.

Tabela 3.6 – Composição do meio de cura dos pellets, pH inicial ajustado para 5,6.

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Xilose	120,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,0
KH_2PO_4	10,0
Ureia	3,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2
CaCl_2	4,0

2.1.5 Procedimento Experimental: Isomerização e fermentação simultâneas (SIF) de xilose em reator contínuo de leito fixo

Os experimentos SIF foram realizados no sistema apresentado na Figura 3.5. Este sistema era composto por um balão de 6L contendo o meio de alimentação, um reator de vidro, bomba peristáltica multicanal, tubo de vidro para o controle do nível, conectado à saída do reator, balão de 3L usado para descarte do meio de saída e duas bombas peristálticas para alimentação da base, antibiótico e ar.

Uma bomba peristáltica multicanal ajustada para fornecer uma vazão de $0.12 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, conectada a um balão de 6L contendo 3L de meio SIF (ver Tabela 3.7), foi usada para bombear o meio de alimentação para dentro do reator (a entrada referente à alimentação de meio estava localizada na parte inferior do reator).

Cada reator de vidro apresentava volume útil de 100 mL, sendo dotado de camisa que permitia o controle da temperatura (Figura 3.6). No interior do reator, os pellets (50 g do biocatalisador) ficavam confinados entre duas telas de aço inox (SILVA, 2013).

Figura 3.5 – Sistema utilizado nos ensaios de isomerização e fermentação simultâneas de xilose em reator contínuo de leito fixo.



Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 3.7 – Composição do meio SIF, pH inicial ajustado para 5,6.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)	
	MEIO 1	MEIO 2
Xilose	<u>65,0</u>	<u>32,5</u>
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0	2,0
KH ₂ PO ₄	5,0	5,0
Ureia	1,5	1,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1	0,1
CaCl ₂	<u>1,0</u>	<u>2,0</u>

A tampa do reator era uma rolha de borracha a qual era dotada de: uma saída para o CO₂ formado, um poço para termômetro e um tubo capilar de aço inox usado para

alimentação de base (ajuste de pH). O tubo de vidro conectado à parte lateral do reator tinha as seguintes funções: controle do nível do reator e permitir o acúmulo de líquido para tirada de amostras. Este efluente descia por gravidade até um balão de 3L estéril que servia como descarte, o qual continha hipoclorito de sódio para evitar qualquer contaminação. O monitoramento do pH era realizado uma vez a cada tempo de residência, mediante coleta do efluente do reator. O pH era corrigido acionando uma bomba peristáltica previamente calibrada, conectada a um frasco contendo uma solução de NaOH 1M.

Na entrada do reator era colocado um tubo de vidro em forma de L, cuja função era evitar entupimentos na mangueira de alimentação devido a sedimentos provenientes do reator. Esta mangueira de alimentação possuía três bifurcações: a primeira para entrada de meio de alimentação, a segunda para alimentação de antibiótico e a terceira para fornecimento de ar. Os antibióticos utilizados para evitar contaminação ao longo dos experimentos contínuos foram: *Kamoran* e *HJ Gold* (utilizados na indústria sucroalcooleira e fornecidos pela Química Real[®]). O ar era fornecido ao reator por meio de uma mangueira que tinha em uma de suas pontas um filtro estéril e a outra ponta aberta à atmosfera. Esta mangueira estava conectada a uma bomba peristáltica capaz de oferecer vazões baixas de ar.

Figura 3.6 – Imagem do reator utilizado



Fonte: arquivo pessoal.

Antibiótico era suplementado ao reator uma vez a cada tempo de residência, para manter uma concentração de 8 ppm dentro do reator. A temperatura inicial do ensaio foi escolhida como 32°C e o tempo de residência 11 horas, tomando como referência resultados obtidos por Silva (2013) em ensaios descontínuos. Os produtos obtidos na SIF eram quantificados por HPLC e a viabilidade celular era determinada no começo e no final do experimento (ver item 2.1.6 deste capítulo).

2.1.6 Métodos Analíticos

Amostras retiradas em intervalos definidos de tempo foram utilizadas para a realização das respectivas análises. Em culturas de levedura, alíquotas de 2 ml do caldo de fermentação foram centrifugadas (centrífuga EPPENDORF, modelo 5403) por 20 min a 11600g (11000 rpm) e 4°C. Em experimentos em reator as amostras foram filtradas usando filtros de 0,22µm. O sobrenadante foi utilizado para o acompanhamento do consumo dos nutrientes e de produção dos metabólitos.

Massa e Viabilidade Celular:

As concentrações celulares foram acompanhadas pela medição da densidade ótica (DO), com um espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000, a 600 nm. As amostras foram convenientemente diluídas de modo que o valor da absorbância fosse inferior a 0,8 para garantir que a medida estivesse dentro da faixa de linearidade da relação entre densidade ótica e concentração.

A viabilidade das células imobilizadas em alginato de cálcio foi acompanhada por microscopia óptica (utilizando um Microscópio Olympus BX50, conectado a um sistema de captura e armazenamento de imagens) mediante a contagem de células utilizando uma “Câmara de Neubauer”, seguindo o seguinte procedimento:

1. Adicionar cerca de 25 mg de pellets a um eppendorf contendo 1ml de solução de citrato de sódio 8% (m/v). Agitar até dissolver completamente os pellets.
2. Diluir a suspensão resultante 20x usando a solução de citrato de sódio, seguida por uma diluição 40x em corante azul de metileno. Esperar aproximadamente 5 min.

3. Colocar 4 μl da suspensão de células diluída sobre uma câmara de Neubauer e proceder à contagem com auxílio de microscopia óptica (onde, células viáveis: não coradas e células não viáveis: coradas, em azul).

Análise de açúcares, álcoois e ácidos orgânicos:

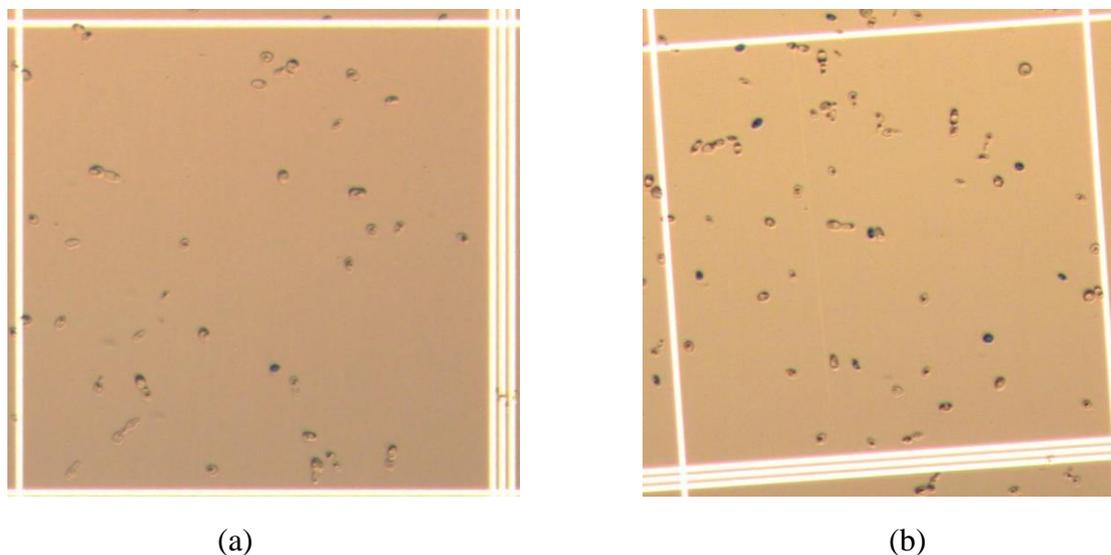
As concentrações de álcoois e ácidos orgânicos foram medidas por cromatografia líquida de troca iônica (cromatógrafo Waters, detector modelo 486) utilizando a coluna Aminex HPX-87H, Bio-Rad, como fase estacionária, e solução de ácido sulfúrico 5 mM, eluindo a uma vazão de 0,6 mL/min, como fase móvel. A temperatura para separação dos componentes foi de 50°C. A detecção dos ácidos foi realizada em detector UV a um comprimento de onda de 210 nm, e a dos carboidratos e álcoois por índice de refração.

As concentrações de carboidratos foram quantificadas usando coluna Aminex HPX87-C (300×7,8 mm; BIO-RAD) a 80°C, com água ultra pura como eluente, a uma vazão de 0,6mL.min⁻¹.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizados dois ensaios de SIF de xilose em reator contínuo de leito fixo. A diferença entre os dois ensaios foi o meio de alimentação utilizado (ver Tabela 3.7) e as condições de oxigênio empregadas. Embora os experimentos tenham sido planejados para utilizar biocatalizadores contendo 10% de levedura em massa seca, houve perdas de massa celular no processo de centrifugação e lavagem de aproximadamente 20%. Os biocatalizadores obtidos tiveram uma concentração final de 6% de levedura em massa seca e 20% de enzima glicose isomerase. Após preparação dos biocatalizadores, foi realizada a medida da viabilidade celular, como descrito no item 2.1.6 deste capítulo (ver Figura 3.7) obtendo uma viabilidade inicial de 97%. No final dos experimentos, a viabilidade final foi de 87%. Os experimentos SIF foram realizados em paralelo (cada um deles em um dos dois reatores mostrados na Figura 3.5) e são explicados a seguir.

Figura 3.7 – Micrografia dos pellets obtida após coimobilização. Células viáveis: não coradas e células não viáveis: coradas de azul. (a) tempo inicial e (b) após 18 dias (ampliação de 1000×).



Fonte: arquivo pessoal.

2.2.1 Experimento contínuo #1: xilose (65 g.L^{-1}), sem suplementação de ar

Neste experimento foi utilizada uma concentração alta de xilose (meio de alimentação 1, ver Tabela 3.7), com o objetivo de avaliar a ocorrência de desvio de fluxo da fonte de carbono para produção de xilitol. A concentração de CaCl_2 no meio foi também reduzida para a metade para evitar precipitação deste sal no meio de alimentação, ocasionando possíveis entupimentos nas telas de aço que continham os pellets dentro do reator. O pH era corrigido a cada tempo de residência utilizando uma solução de NaOH 1M. Este experimento foi conduzido sem alimentação de ar para dentro do reator, para fins comparativos com o experimento 2 (que utilizou a metade da concentração de xilose).

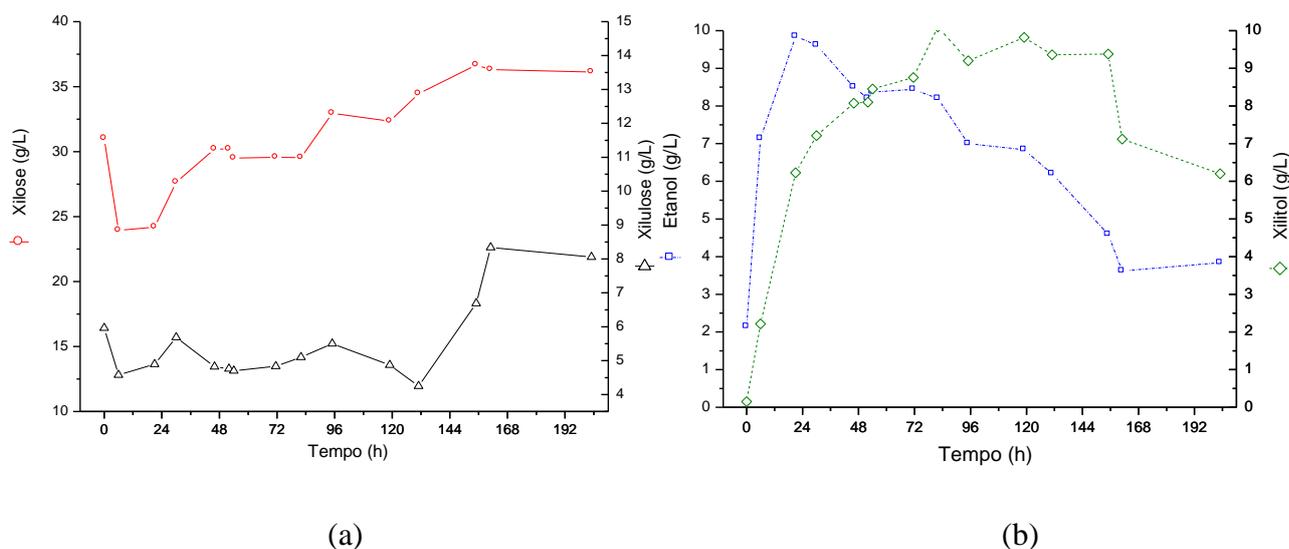
A Figura 3.8 mostra os resultados obtidos neste experimento. Amostras eram retiradas a cada tempo de residência (um tempo de residência equivalendo a 15h) e serviam para acompanhar a concentração de metabólitos, bem como para verificar se o reator não estava contaminado.

Nas primeiras horas de experimento (~12h), as concentrações de xilose e xilulose foram se estabilizando em valores de $24,0$ e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, e

seletividades de etanol com respeito a xilitol em torno de $3,2 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$ foram alcançadas. Com o decorrer do experimento, essa seletividade foi diminuindo. Outros metabólitos foram também produzidos, dentre eles glicerol e ácido acético, em concentrações inferiores a 2,5 e 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Pode-se observar que as concentrações de etanol e xilitol não ficaram constantes ao longo do tempo (não atingiram o estado estacionário) e que a seletividade de etanol começou a diminuir, até que em torno da 52ª h as concentrações de etanol e xilitol atingiram o mesmo valor. Acredita-se que isto pode ser explicado devido às condições de oxigênio dentro do reator (a concentração de oxigênio no reator variam ao longo do experimento), como sugerido nos resultados obtidos nas simulações utilizando o software OptFlux (Tabela 3.5). No começo do experimento, ar entra no reator juntamente com a carga inicial de pellets e com o meio de alimentação. Este oxigênio deve ter sido consumido durante os primeiros três tempos de residência, período no qual a produção de xilitol foi menor. Após o esgotamento do oxigênio, o metabolismo da levedura foi direcionado para maior produção de xilitol, provavelmente pela necessidade de regenerar os cofatores presentes na cadeia metabólica (NAD+).

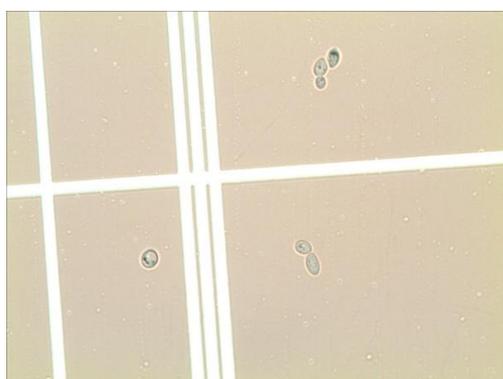
Figura 3.8 – Experimento #1: SIF de $65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de xilose em operação contínua, Temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador *S. cerevisiae*/enzima (6:20) e CaCO_3 0,5 %. Concentração de enzima do reator $120 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$. Concentração inicial de células no reator: $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. (a) Substratos e (b) Produtos.



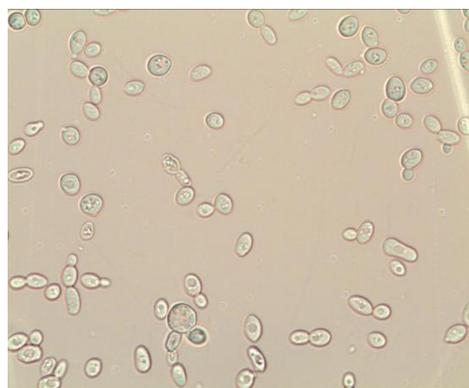
Para diminuir a concentração de xilose remanescente no reator, o tempo de residência foi aumentado para 19h, às 46h de experimento. Às 82h de experimento, observou-se que alguns pellets estavam se desfazendo, e no acompanhamento com microscópio podia-se observar uma alta concentração de levedura livre no meio de cultivo, indicando que a diminuição da concentração de cálcio para a metade teve efeitos prejudiciais na integridade dos pellets (ver Figuras 3.9a e 3.9b).

Às 179h de experimento, uma conexão localizada na parte inferior do reator em questão se soltou, ficando o mesmo exposto ao ambiente não estéril, resultando em contaminação. Antibióticos *Kamoran* e *HJ Gold* foram adicionados de forma a manter uma concentração de 8 ppm. O experimento foi encerrado às 227h, quando o meio de alimentação contaminou e ficou difícil controlar a contaminação dentro do reator (ver Figura 3.9c). Os fluxos médios calculados para este experimento foram: fluxo de xilulose, 0.471 ± 0.057 mmol/gDWC.h, fluxo de etanol, 0.356 ± 0.121 mmol/gDWC.h e fluxo de xilitol, 0.116 ± 0.044 mmol/gDWC.h.

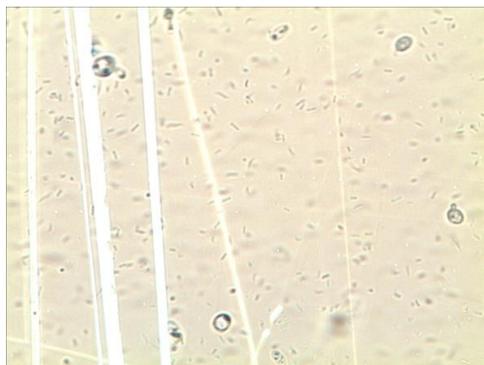
Figura 3.9 – Micrografia do acompanhamento do experimento 1. (a) $t = 6h$, (b) $t = 82h$ e (c) $t = 227h$ (ampliação de 1000 \times).



(a)



(b)



(c)

2.2.2 Experimento contínuo #2: xilose (32,5 g.L⁻¹) e oxigênio (3 e 7,5 ml.min⁻¹)

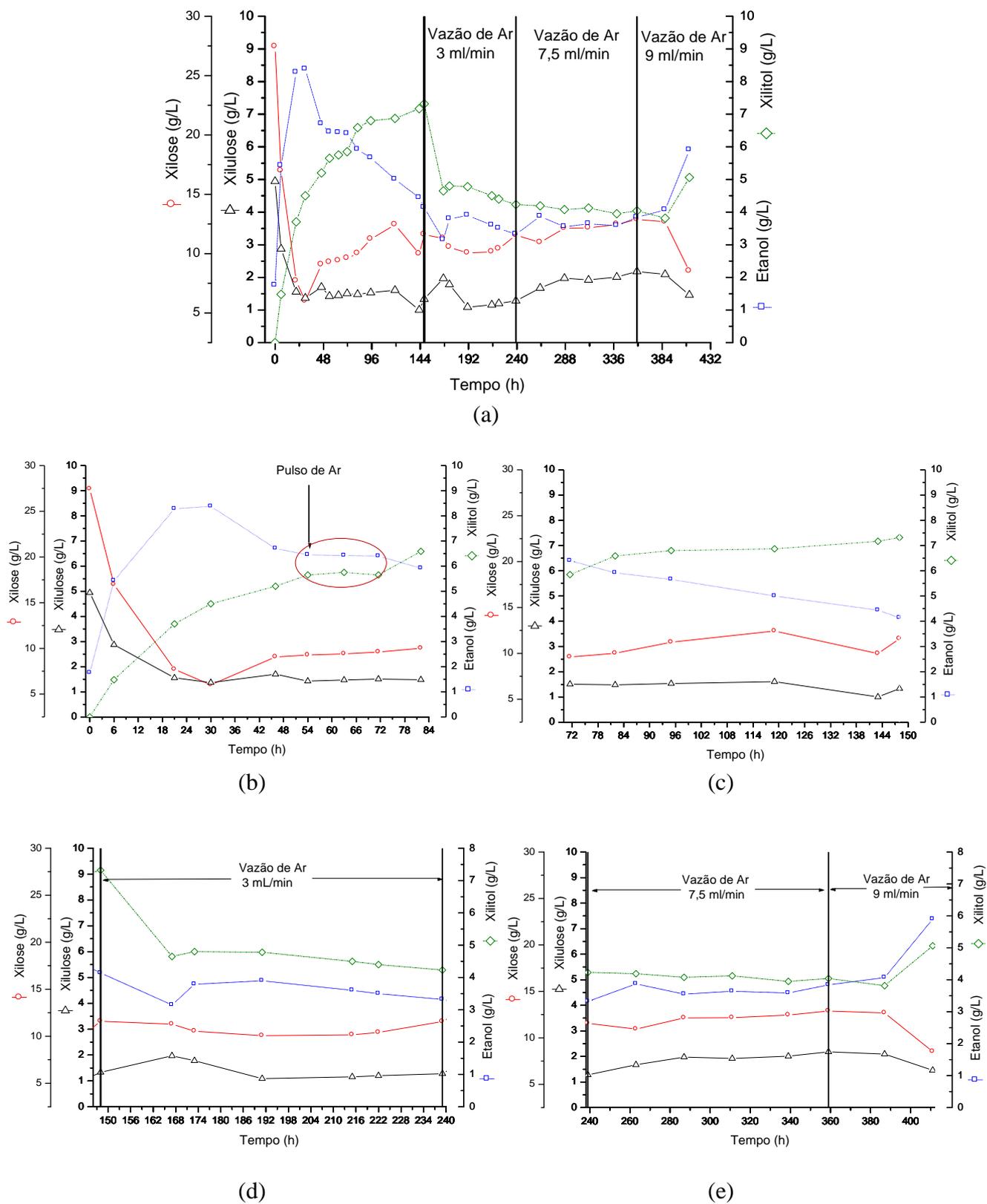
Neste experimento foi utilizada a metade da concentração de xilose do experimento 1 (meio de alimentação 2, ver Tabela 3.7), com o objetivo de avaliar o desvio de fluxo da fonte de carbono para produção de xilitol. A Figura 3.10a mostra os resultados obtidos neste experimento. Quando comparada a seletividade alcançada nas primeiras horas do experimento #1 (3,2 g_{etanol}·g_{xilitol}⁻¹) com as do experimento #2 (3,7 g_{etanol}·g_{xilitol}⁻¹) pode-se ver que maiores concentrações de xilose no meio de alimentação têm um efeito negativo sobre a seletividade em etanol, direcionando o metabolismo da levedura para maior produção de xilitol.

A concentração de CaCl₂ no meio foi mantida em 2 g.L⁻¹ o que ocasionou precipitação de sais no meio de alimentação, mas sem ocasionar entupimento nas telas de aço que continham os pellets dentro do reator. Esta quantidade de cálcio foi suficiente para manter a integridade dos pellets durante todo o experimento (com duração de 18 dias).

Inicialmente o experimento foi conduzido sem fornecimento de ar, para fins comparativos com o experimento #1 (que utiliza o dobro da concentração de xilose). Nos primeiros dois tempos de residência (com um tempo de residência equivalendo a 15h), as concentrações de xilose e xilulose se estabilizaram em valores de 9,5 e 1,5 g.L⁻¹ respectivamente. Tal como no experimento anterior, as concentrações de etanol e xilitol não permaneceram constantes ao longo do tempo e a seletividade em etanol começou a diminuir, até que às 46h de experimento as concentrações de etanol e xilitol atingiram um valor muito próximo (ver Figura 3.10b). Glicerol e ácido acético, também foram produzidos, em concentrações inferiores a 1,8 e 1 g.L⁻¹, respectivamente.

Às 54h de experimento, um pulso de ar foi adicionado ao reator, levando à estabilização das concentrações de etanol e xilitol por cerca de 20h. Transcorrido este tempo, estas concentrações começaram a mudar novamente e a seletividade de etanol começou a diminuir (Figura 3.10b). Isto confirmou os resultados obtidos em experimentos *in silico* usando o software OptFlux, onde pequenas mudanças no oxigênio disponível levam a mudanças na produção de xilitol. Na Figura 3.10c pode-se ver que sem a adição de mais pulsos de ar, entre as 74 e 148h de experimento, as concentrações de etanol e xilitol não permanecem constantes, sendo direcionado o metabolismo para maior produção de xilitol.

Figura 3.10 – Experimento #2: SIF de 32,5 g.L⁻¹ de xilose em operação contínua, Temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador *S. cerevisiae*/enzima (6:20) e CaCO₃ 0,5 %. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL⁻¹. Concentração inicial de células no reator: 30 g.L⁻¹. (a) Tempo total de experimento, (b) 0 – 84h de experimento, (c) 72 – 150h de experimento, (d) 148 – 240h de experimento, (e) 148 – 240h de experimento.



Às 148h de experimento (quando a seletividade em etanol se encontrava em $0,62 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$), ar foi suplementado ao reator a uma vazão de $3,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ durante aproximadamente 5 tempos de residência. Com a adição de uma vazão contínua de ar dentro do reator, foi observado diminuição na concentração de xilitol (ver Figura 3.10d), alcançando uma seletividade em etanol de $0,80 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$. Conseguiu-se também que as concentrações dos metabólitos não apresentassem mudanças significativas com o tempo. O consumo de xilose também ficou um pouco favorecido com a presença de ar no reator, passando de $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. As concentrações de glicerol e ácido acético diminuíram para 1,6 e 0,85 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Devido à produção de xilitol ainda ser maior que a produção de etanol (apesar da seletividade em etanol ter aumentado após a alimentação contínua de ar para dentro do reator), às 239h de experimento a vazão de ar foi alterada para $7,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (ver Figura 3.10e). Após aproximadamente 100h com a nova vazão de ar, as concentrações de etanol e xilitol ficaram muito próximas, mas ainda a produção de etanol não era maior que a do xilitol, indicando que ainda poderia ser aumentada um pouco mais a vazão de ar.

Às 359h de experimento com uma vazão de ar de $9,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ e mudando o tempo de residência para 20h, foi alcançada uma seletividade em etanol de $1,17 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$.

Os fluxos metabólicos de substratos e produtos calculados para cada intervalo de tempo para este experimento são apresentados na Tabela 3.8. Podemos observar que para os intervalos de tempo 148 - 239h e 359 - 411h o fluxo de xilulose é parecido, mas o maior fornecimento de ar no reator no ultimo intervalo, favoreceu para o aumento do fluxo de etanol e a diminuição do fluxo de xilitol, levando assim a maiores seletividades para etanol.

Tabela 3.8 – Fluxos metabólicos de substratos e produtos calculados para cada intervalo de tempo do experimento contínuo #2 (concentração de xilose de $32,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Intervalo de Tempo (h)	Fluxo de Xilulose (mmol/gDWC.h)	Fluxo de Etanol (mmol/gDWC.h)	Fluxo de Xilitol (mmol/gDWC.h)
0 – 148	0.305 ± 0.098	0.300 ± 0.087	0.081 ± 0.034
148 - 239	0.327 ± 0.013	0.185 ± 0.013	0.072 ± 0.003
239 – 359	0.295 ± 0.014	0.193 ± 0.008	0.064 ± 0.001
359 - 411	0.322 ± 0.054	0.260 ± 0.068	0.070 ± 0.014

2.3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os experimentos SIF empregando duas diferentes concentrações de xilose no meio de alimentação, demonstram que existe uma influência significativa do fluxo deste açúcar sobre a produção de etanol e xilitol (indicação de desvio de fluxo da fonte de carbono para produção de xilitol). Baixas concentrações de cálcio no meio de alimentação podem afetar consideravelmente a integridade dos biocatalizadores, ocasionando perdas de enzima e levedura ao longo do experimento. Fazendo uso de assepsia na preparação dos biocatalizadores e de meios de alimentação suplementar, evita-se a contaminação do reator por microrganismos prejudiciais à fermentação.

A utilização de ferramentas de simulação (neste caso, o software OptFlux), permitiu uma melhor compreensão do metabolismo de xilulose por *S. cerevisiae*, sendo muito útil para a compreensão do papel do oxigênio e da xilulose na produção de etanol a partir deste açúcar. Suplementar continuamente oxigênio para dentro do reator, demonstrou ser de vital importância para manter a seletividade de etanol em valores superiores a $1 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}_{\text{xilitol}}^{-1}$. Estes experimentos foram propostos para encerrar este doutorado e servir como base para o início do doutorado da aluna Thais Milessi.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal do trabalho foi aplicar técnicas de modelagem e simulação para a otimização do processo de conversão das frações C6 e C5 presentes no bagaço de cana de açúcar a serem utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração. Com esse intuito, foi realizado um estudo para definir duas políticas diferentes de alimentação de celulose na hidrólise enzimática em batelada alimentada (com base em equações cinéticas simples), as quais foram validadas usando reatores em escala de bancada. A primeira política fez uso da alimentação de substrato e enzima, para sustentar altas taxas de produção de glicose (P#1). A segunda só alimenta o substrato para o reator em batelada alimentada, e foi definida utilizando teoria clássica do controle ótimo (P#2). Concluiu-se que a política de alimentação P#1 (adição de enzima e substrato) forneceu melhores resultados, seguida pela política de controle ótimo P#2, quando comparadas com bateladas sucessivas, para os valores de mercado para a enzima, bagaço e etanol no Brasil (em Setembro de 2012).

Na sequência, foi realizado um estudo do metabolismo da xilulose (derivado da fração C5 do bagaço de cana) em *S. cerevisiae* com o auxílio das metodologias da Biologia de Sistemas, encontrando indicação de desvio de fluxo da fonte de carbono para produção de xilitol a maiores fluxos de xilulose e também que fornecimento de oxigênio é importante para o aumento da seletividade em etanol e, conseqüentemente, a diminuição da produção de xilitol. Estas relações foram utilizadas para planejamento de experimentos em reator contínuo de leito fixo em sistema SIF (Fermentação e isomerização simultâneas) para produção de etanol.

No final do trabalho, foram realizados ensaios SIF em reator contínuo, obtendo melhores resultados de seletividade de etanol em experimento com suplementação de um fluxo contínuo de ar para dentro do reator.

Para dar continuidade ao estudo realizado, propõe-se, para a produção de etanol a partir da fração C6:

- Implementar um sistema contínuo de alimentação de bagaço de cana pré-tratado para evitar o aumento da viscosidade aparente do meio;
- Realizar experimentos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), introduzindo a levedura *S. cerevisiae* no meio reacional visando à produção de etanol de segunda geração.

Quanto à SIF de xilose em operação contínua:

- Realizar experimentos operando o reator contínuo de leito fixo com diferentes fluxos de ar com o objetivo de identificar o fluxo que otimize a seletividade para etanol;
- Avaliar outra configuração de reator que permita um melhor controle do oxigênio dissolvido e do pH durante o processo SIF. Uma alternativa seria o uso de reatores de mistura que não comprometam a integridade dos biocatalisadores;
- Adicionar inibidores da enzima xilitol desidrogenase, ao meio de fermentação, para favorecer a seletividade de etanol durante o processo.

APÊNDICE A

Deseja-se maximizar a concentração de produto no tempo final em um biorreator operado em batelada alimentada. Para isso, o comportamento dinâmico do sistema é descrito nas equações (2.4a) e o índice de desempenho dado pela equação (2.4b) pode ser escrito da seguinte forma:

$$J = -P(tf) - X(tf) = -P(tf) - \frac{[I(S_0 \cdot V_0) + (S_{feed} \cdot (V(tf) - V_0)) - (S(tf) \cdot V(tf))]}{[I(S_0 \cdot V_0) + (S_{feed} \cdot (V(tf) - V_0))]} \quad (A.1)$$

Para a maximização deste funcional é necessária a utilização do princípio do máximo de Pontryagin, expressado em termos do Hamiltoniano:

$$H = \underline{\lambda}^T \cdot (\underline{f}(x) + \underline{g}(x) \cdot u) \quad (A.2a)$$

Substituindo as equações (2.4a) na equação (A.2a), obtém-se:

$$H = \underline{\lambda}^T \cdot (\underline{f}(x) + \underline{g}(x) \cdot u) = \lambda_1 \cdot [-r + (S_{feed} - S)D] + \lambda_2 \cdot (r - PD) + \lambda_3 \cdot (VD) \quad (A.2b)$$

O Hamiltoniano pode ser reescrito:

$$H = \psi(x, \underline{\lambda}) + u \cdot H_u(x, \underline{\lambda}) \quad (A.3)$$

Onde:

$$\psi(x, \underline{\lambda}) = \underline{\lambda}^T \cdot \underline{f}(x)$$

$$H_u(x, \underline{\lambda}) = \underline{\lambda}^T \cdot \underline{g}(x) \quad (A.4)$$

Substituindo as equações (2.4a) nas equações (A.4), obtém-se:

$$\psi(x, \underline{\lambda}) = \lambda_1 \cdot (-r) + \lambda_2 \cdot (r) \quad (A.5)$$

$$H_u(x, \underline{\lambda}) = \lambda_1 \cdot (S_{feed} - S) + \lambda_2 \cdot (-P) + \lambda_3 \cdot (V) \quad (A.6)$$

O princípio mínimo para o controle ótimo requer:

$$\text{Se } H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) \geq 0 \text{ então } u = u_{\min}$$

$$\text{Se } H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) \leq 0 \text{ então } u = u_{\max}$$

$$\text{Se } H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) = 0 \text{ então } u = u_{\text{sing}}$$

No intervalo de controle singular, H_u é igual a zero e, portanto, suas derivadas também devem ser zero:

$$H_u(\underline{x}, \underline{\lambda}) = \lambda_1 \cdot (S_{\text{feed}} - S) + \lambda_2 \cdot (-P) + \lambda_3 \cdot (V) = 0 \quad (\text{A.7})$$

$$\frac{dH_u}{dt} = 0 \quad (\text{A.8})$$

As condições necessárias para a otimização são:

Equação de Euler-Lagrange (equação 1.7):

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

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

$$\dot{\lambda}_3 = -\lambda_3 \cdot u \quad (\text{A.9})$$

Finalmente, considerando a condição de transversalidade para o tempo final fixo ($\delta t_f = 0$) e ponto final livre (equação 1.9)

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

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

$$\lambda_3(t_f) \cdot = [S \cdot V_0 \cdot (S_0 - S_{\text{feed}})] / [S_0 \cdot V_0 + S_{\text{feed}} \cdot V - S_{\text{feed}} \cdot V_0]^2 \quad (\text{A.10})$$

APÊNDICE B

Tabela B.1- Balanço de carbono para experimento em batelada aeróbio (ver item 1.1.3 do capítulo 3).

Componente	Formula elemental	MMC	C-mol inicial	TEMPO									
				2	4	6	8	12	14	16	20	22	24
Xilulose	CH ₂ O	30	0.9953	0.9338	0.9028	0.8618	0.8164	0.7284	0.6835	0.6167	0.5126	0.4567	0.3972
Uréia	CO(NH ₂) ₂	60	0.0230	0.0210	0.0192	0.0175	0.0160	0.0136	0.0122	0.0108	0.0081	0.0065	0.0051
ETOH	CH ₃ O _{0,5}	23	0.0673	0.0616	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
XOH	CH _{2,4} O	30.4	0.0039	0.0045	0.0046	0.0048	0.0050	0.0073	0.0096	0.0136	0.0212	0.0259	0.0311
CO ₂	CO ₂	44	0.0000	0.0242	0.0517	0.0687	0.0865	0.1225	0.1470	0.1705	0.2111	0.2335	0.2560
Glicerol	CH _{2,7} O	30.7	0.0093	0.0095	0.0123	0.0122	0.0106	0.0116	0.0081	0.0070	0.0055	0.0054	0.0056
Biomassa	CH _{1,79} O _{0,57} N _{0,15}	25.01	0.1865	0.2001	0.2196	0.2309	0.2405	0.2742	0.2818	0.2940	0.3325	0.3374	0.3596
Succinato	CH _{1,5} O	29.5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0016	0.0020	0.0025	0.0030
Arabitol	CH _{2,4} O	30.4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0055	0.0062	0.0075	0.0085	0.0089
	Soma		1.2854	1.2546	1.2101	1.1960	1.1749	1.1575	1.1487	1.1204	1.1006	1.0764	1.0665
	% recuperação		100	98	94	93	91	90	89	87	86	84	83

Tabela B.1- (Continuação) Balanço de carbono para experimento em batelada aeróbio (ver item 1.1.3 do capítulo 3).

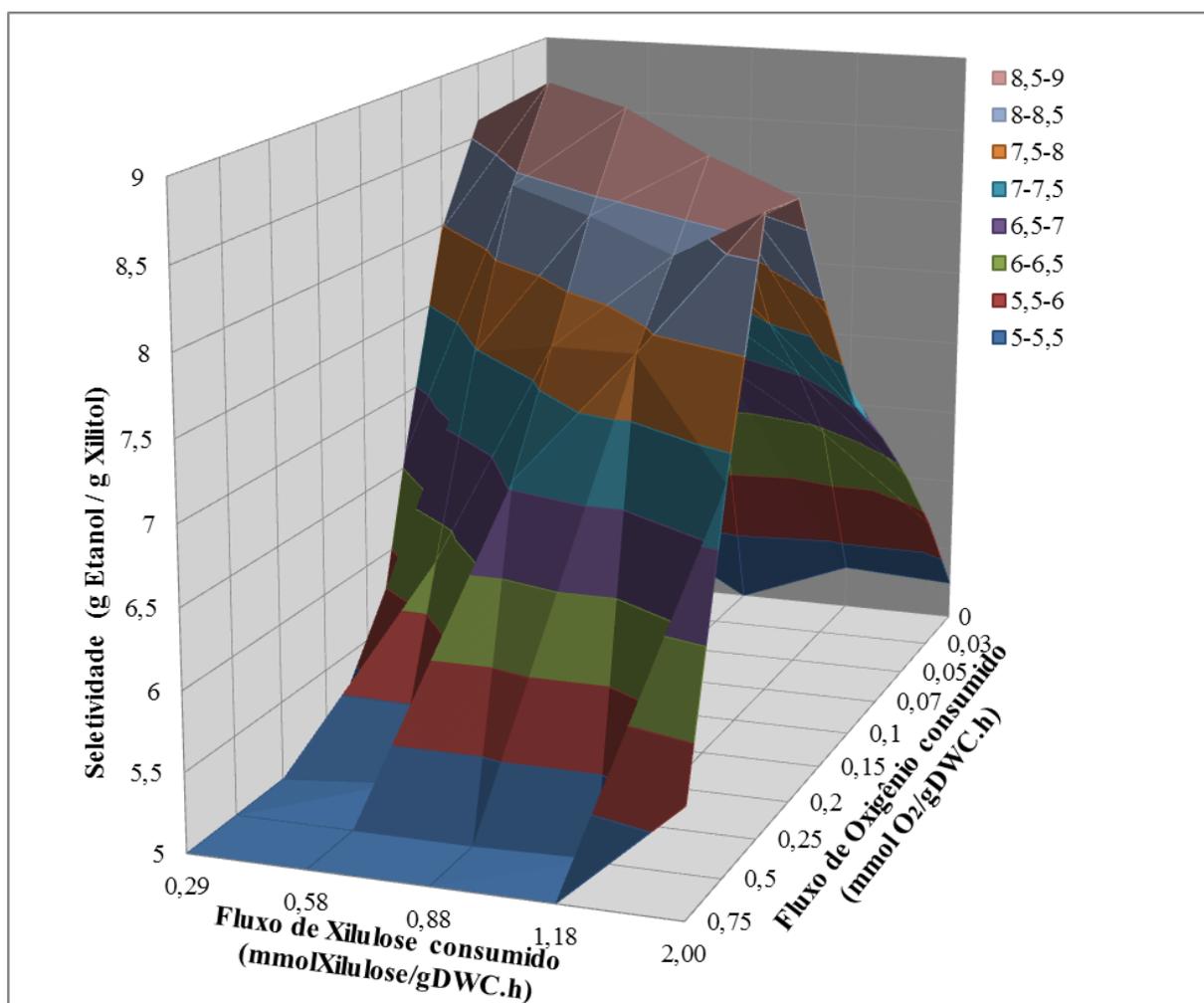
Componente	Formula elemental	MMC	C-mol inicial	TEMPO						
				24	26	28	30	34	36.5	44
Xilulose	CH ₂ O	30	0.9953	0.3972	0.3201	0.2621	0.2048	0.0942	0.0424	0.0138
Uréia	CO(NH ₂) ₂	60	0.0230	0.0051	0.0035	0.0026	0.0017	0.0003	0.0003	0.0000
ETOH	CH ₃ O _{0,5}	23	0.0673	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
XOH	CH _{2,4} O	30.4	0.0039	0.0311	0.0375	0.0470	0.0513	0.0562	0.0556	0.0549
CO ₂	CO ₂	44	0.0000	0.2560	0.2848	0.3155	0.3356	0.3735	0.3932	0.4238
Glicerol	CH _{2,7} O	30.7	0.0093	0.0056	0.0057	0.0053	0.0055	0.0055	0.0048	0.0047
Biomassa	CH _{1,79} O _{0,57} N _{0,15}	25.01	0.1865	0.3596	0.3659	0.3758	0.3904	0.3976	0.4146	0.4496
Succinato	CH _{1,5} O	29.5	0.0000	0.0030	0.0034	0.0038	0.0040	0.0042	0.0043	0.0045
Arabitol	CH _{2,4} O	30.4	0.0000	0.0089	0.0093	0.0101	0.0105	0.0105	0.0105	0.0107
	Soma		1.2854	1.0665	1.0302	1.0223	1.0037	0.9420	0.9256	0.9620
	% recuperação		100	83	80	80	78	73	72	75

Tabela B.2- Balanço de carbono para experimento em batelada anaeróbio (ver item 1.1.3 do capítulo 3).

Componente	Formula elemental	MMC	C-mol inicial	TEMPO								
				3	3.5	5	7	9	10	11	12	13
Xilulose	CH ₂ O	30	0.6029	0.4790	0.4618	0.3571	0.2317	0.1096	0.0649	0.0305	0.0123	0.0067
Uréia	CO(NH ₂) ₂	60	0.0157	0.0147	0.0145	0.0142	0.0130	0.0127	0.0126	0.0124	0.0123	0.0122
ETOH	CH ₃ O _{0,5}	23	0.0213	0.0801	0.0922	0.0966	0.1252	0.1596	0.1640	0.1831	0.1820	0.1803
XOH	CH _{2,4} O	30.4	0.0000	0.0123	0.0147	0.0320	0.0622	0.0894	0.0992	0.1057	0.1062	0.1086
CO ₂	CO ₂	44	0.0000	0.0295	0.0357	0.0380	0.0524	0.0660	0.0736	0.0792	0.0835	0.0859
Glicerol	CH _{2,7} O	30.7	0.0000	0.0014	0.0017	0.0049	0.0075	0.0086	0.0090	0.0127	0.0126	0.0126
Biomassa	CH _{1,79} O _{0,57} N _{0,15}	25.01	0.3550	0.4045	0.3934	0.3846	0.3665	0.3673	0.3564	0.3471	0.3584	0.3503
Acetato	CH ₂ O	30	0.0000	0.0014	0.0016	0.0029	0.0059	0.0086	0.0098	0.0127	0.0129	0.0137
Succinato	CH _{1,5} O	29.5	0.0000	0.0069	0.0085	0.0135	0.0182	0.0210	0.0220	0.0243	0.0240	0.0238
Arabitol	CH _{2,4} O	30.4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0080	0.0194	0.0270	0.0292	0.0307	0.0308	0.0314
	Soma		0.9950	1.0297	1.0243	0.9518	0.9019	0.8698	0.8405	0.8385	0.8351	0.8255
	% recuperação		100	103	103	96	91	87	84	84	84	83

APÊNDICE C

Figura C.1 – Superfície de resposta correlacionando as variáveis: fluxo de xilulose, fluxo de oxigênio e seletividade para etanol para simulações realizadas em OptFlux para o modelo anaeróbio ajustado.



REFERÊNCIAS

- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities: chemical analysis and testing task. **Laboratory analytical procedure**.
<http://cobweb.ecn.purdue.edu/~lorre/16/research/LAP-006.pdf>, 1996.
- AQUINO, P. M. **Produção de etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Saccharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)—Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **Int Sugar J.**, v. 104, p. 64–67, 2002.
- BRAND, M. A. Energia de biomassa florestal. Rio de Janeiro: **Interciência**, p. 131, 2010.
- BRASILAGRO. **Biocombustível de 2ª geração está na rampa de decolagem**. São Paulo. 2013. <http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/11/49979>
- BRENAN, K. E.; CAMPBELL, S. L.; PETZOLD, L. R. **Numerical Solution of Initial Value Problems in Differential Algebraic Equations**. Classics in Applied Mathematics, SIAM Philadelphia, 1996.
- BRUINENBERG, P. M. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 52, p. 411–29, 1986.
- BUDRIENE, S. et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization, **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, p. 95–105, 2005.
- CARVALHO, M. L. et al. Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Braz J Chem Eng**, in press, 2013.
- CHANDRA, R. P. et al. The Influence of Pretreatment and Enzyme Loading on the Effectiveness of Batch and Fed-Batch Hydrolysis of Corn Stover. **Biotechnol Prog.**, v. 27, p. 77-85, 2011.
- CHENG, K. K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105–109, 2008.
- CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425–441, 2007.
- DUARTE, N. C.; HERRGÅRD, M. J.; PALSSON, B. O. Reconstruction and Validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model. **Genome Research**, v. 14, p. 1298–1309, 2004.
- EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 12, p. 225-228, 1990.

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

FOGEL, R. et al. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 741-752, 2005.

FÖRSTER, J. et al. Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. **Genome Research**, v. 13, p. 244–253, 2003.

GRANDA, C. B. et al. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2969-2977, 2007.

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

GÖKSUNGUR, Y.; ZORLU, N. Production of ethanol from beet molasses by ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor, **Turk J. Biol**, v. 25, p. 265–275, 2001.

GONÇALVES, E. et al. Optimization approaches for the *in silico* discovery of optimal targets for gene over/underexpression. **Journal of Computational Biology**, v. 19, p. 102-114, 2012.

GUPTA, R. et al. Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. **Biotechnol Biofuels**, v.5, p. 16, 2012.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards Industrial Pentose-fermenting Yeast Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 937-953, 2007.

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

HERRGARD, M. J. et al. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. **Nat Biotech**, v. 26, p. 1155–1160, 2008.

HODGE, D. B. et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresour Technol.**, v. 99, p. 8940–8948, 2008.

HODGE, D. B. et al. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis, **Appl Biochem Biotech**, v. 152, p. 88, 2009.

INGLEDEW, W. M. Yeasts for production of fuel ethanol. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The Yeasts**. San Diego, USA: Academic Press, 1993. v. 5, p. 245-291.

JEFFRIES, T.W. Fermentation of d-xylose and cellobiose. In: Verachert, H., De Mot, R. (Eds.), **Yeast-Biotechnology and Biocatalysis**. Marcel Dekker, New York, 1990.

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

JIN, Y. S.; JEFFRIES, T. W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105–108, p. 277–286, 2003.

JORGENSEN, H.; KRISTENSE, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels. Bioproducts Biorefining**. v. 1, n.2, p. 119-134, 2007.

KAUFFMAN, K. J.; PRAKASH, P.; EDWARDS, J. S. Advances in flux balance analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 491–496, 2003.

KIM, Y. S. et al. Xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing multiple xylose reductase genes at chromosomal delta-sequences. **J. Biotechnol.**, v. 67, p. 159-171, 1999.

KOLODKIN, A. et al. Emergence of the silicon human and network targeting drugs. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 46, p. 190-197, 2012

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

KRUCKEBERG, A. L. The hexose transport family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 166, p. 283-292, 1996.

KUEPFER, L.; SAUER, U.; BLANK, L. M. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Research**, v. 15, p. 1421 –1430, 2005.

LLANERAS, F.; PICÓ, J. Stoichiometric modelling of cell metabolism. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105(1), p. 1–11, 2008.

LOGSDON, J.S.; BIEGLER, L.T. Accurate solution of differential-algebraic optimization problems, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 28, p. 89–101, 1989.

MANICHAIKUL, A. et al. Metabolic network analysis integrated with transcript verification for sequenced genomes. **Nature Methods**, v. 6(8): p. 589–592, 2009.

MARTIN, C. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 339-352, 2007.

MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 84, p. 37-53, 2009.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MO, M.; PALSSON, B.; HERRGARD, M. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. **Systems Biology / BMC**, v. 3, p. 37, 2009.

MONTERA, L. et al. A heuristic search for optimal parameter values of three biokinetic growth models for describing batch cultivations of *S. pneumoniae* in bioreactors. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 5027, p. 359-368, 2008.

NOOKAEW, I. et al. The genome-scale metabolic model iIN800 of *Saccharomyces cerevisiae* and its validation: a scaffold to query lipid metabolism. **Systems Biology**, v. 2, p. 71, 2008.

OBERHARDT, M. A. et al. Applications of genome-scale metabolic reconstructions. **Molecular Systems Biology**, v. 5, p. 1-15, 2009.

ORTH, J. D.; THIELE, I.; PALSSON, B. U. What is flux balance analysis?. **Nature biotechnology**, v. 28, p. 245, 2010.

PALSSON, B. O. **Systems Biology: Properties of Reconstructed Networks**. Cambridge University Press., 2006.

PINO, V. et al. Determination of the alkyl- and methoxy-phenolic content in wood extractives by micellar solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, v. 73, n. 3, p. 505-513, 2007.

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

RABELO, S. C. **Avaliação do desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RAMAN, K.; CHANDRA, N. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. **Brief Bioinform**, v. 10, p. 435-449, 2009.

RAMAN, K.; RAJAGOPALAN, P.; CHANDRA, N. Flux Balance Analysis of Mycolic Acid Pathway: Targets for Anti-Tubercular Drugs. **Computational Biology**, v. 5, 2005.

RAMIREZ, W. F. **Process Control and Identification**. Academic Press, 1994.

RANGANATHAN, S.; SUTHERS, P. F.; MARANAS, C. D. OptForce: An Optimization Procedure for Identifying All Genetic Manipulations Leading to Targeted Overproductions. **PLoS Comput Biol** 6, no. 4, 2010.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.22–27, 2005.

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

ROCHA, I. et al. OptFlux: an open-source software platform for *in silico* metabolic engineering. **BMC Systems Biology**, v. 4(45), p. 1-12, 2010.

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

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

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

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

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

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

SOUSA Jr., R. et al. Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. **Braz J Chem Eng**, v. 28, p. 545–564, 2011.

SUAREZ, C. A. G. et al. Adaptação de uma Linhagem Comercial de *Saccharomyces cerevisiae* para Produção de Etanol a Partir de D-Xylulose. **XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, Foz de Iguaçu, 2013.

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

TEBBANI, S.; DUMUR, D.; HAFIDI, G. Open-loop optimization and trajectory tracking of a fed-batch bioreactor. **Chem. Eng. and Process.**, v. 47, p. 1933-1941, 2008.

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

TOIVARI, M. H. et al. Conversion of Xylose to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of Xylulokinase (XKS1) and Oxygen Availability. **Metab. Engin.**, v. 3, p. 236-249, 2001.

TOIVARI, M.H. et al. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 70, p. 3681-3686, 2004.

UM, BYUNG-HWAN; BAE, SUNG-HO. Statistical methodology for optimizing the dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 5, p. 1172-1176, 2011.

VAN SUYLEKOM, D et al. Degradation of the hexose transporter Hxt5p in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol. Cell.**, v. 99, p. 13-23, 2007.

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

WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 482-487, 1999.

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

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p.3-16, 1994.

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v.24, p.189-226, 1999.

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

WYMAN, C. E. et al. **Hydrolysis of cellulose and hemicellulose**. In: DUMITRIU, Severian. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. New York: Ed. Marcel Dekker, p. 994-1033, 2005.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.367–375, 2008.