

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

**CLAUDIA RAMOS DA SILVA**

**Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do  
bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada  
com *Saccharomyces cerevisiae***

**SÃO CARLOS**

**2013**

**CLAUDIA RAMOS DA SILVA**

**Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço  
de cana usando glicose isomerase coimobilizada com  
*Saccharomyces cerevisiae***

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

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

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

**SÃO CARLOS**

**2013**

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

S586pe

Silva, Claudia Ramos da.

Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae* / Claudia Ramos da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
138 f.

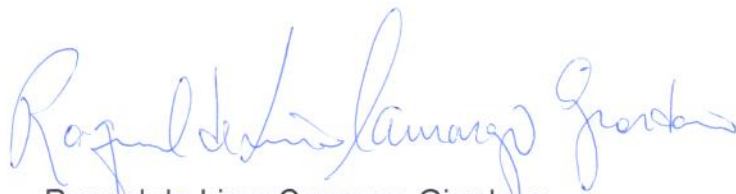
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fermentação. 2. Etanol. 3. Bagaço de cana. 4. Hemicelulose. 5. *S. cerevisiae*. I. Título.

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

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **CLAUDIA RAMOS DA SILVA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 24 DE ABRIL DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



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



Teresa Cristina Zangirolami  
**UFSCar**



Luciana Rocha Barros Gonçalves  
**UFC**



Maria Alice Zarur Coelho  
**UFRJ**



Célia Maria Araújo Galvão  
**CTC**



Roberto de Campos Giordano  
**UFSCar**



Ruy de Sousa Junior  
**UFSCar**

## AGRADECIMENTOS

Às professoras Raquel de Lima Camargo Giordano e Teresa Cristina Zangirolami, agradeço imensamente pela orientação, confiança, apoio, palavras e gestos de incentivo manifestados no sentido do meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço profundamente pelo comprometimento demonstrado na busca por soluções às dificuldades encontradas.

Aos meus pais, Cecília Dilva e Valdemar e as minhas irmãs Mônica e Vilma pelo amor, apoio e incentivo absolutos. À minha mãe agradeço imensamente por suas orações.

Agradeço aos meus sobrinhos Ires, Igor e Zilda por me proporcionarem tantos momentos revigorantes nas minhas volta periódicas à Paraíba.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de estudos concedidas tanto no país, quanto no exterior durante estágio financiado pelo Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior.

Ao professor Roberto de Campos Giordano, agradeço por seu auxílio na discussão dos resultados e por seu aconselhamento em momentos de dúvida.

Agradeço ao Prof. Dr. José Manuel Guisán e ao Pesquisador Dr. Fernando López-Gallego, ambos do ICP/Madrid, pela orientação durante meu estágio no exterior.

Agradeço à secretaria do PPG-EQ.

Ao BIOEN/FAPESP pelo apoio financeiro

À *Genencor Internacional* pela doação de enzimas.

À Juliana, representante da *Química Real*, agradeço pela doação dos antibióticos.

Aos técnico dos laboratórios, Amadeus, Tiago, Thaís e Alyne, agradeço pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Karina e João, ex-alunos de iniciação científica agradeço pelo auxílio durante os experimentos.

À Dascina e Rafael, agradeço por ensinamentos tão valiosos na minha chegada ao grupo de pesquisa no DEQ.

Aos companheiros de bancada, queridos amigos e integrantes do grupo que carinhosamente nomeamos “*família pentose*”, Patrícia e Guilherme agradeço por todo auxílio durante os experimentos. Discussões sobre metabolismo das pentoses, noites e finais de semana compartilhados no DEQ, os cafés na copa e tantos outros momentos ficarão eternizados. À Inti e ao Carlos, agradeço por todo auxílio durante os experimentos contínuos.

Aos queridos amigos Mirella, Adilson, Chanel, Diogo, Sandrinha e Gislene agradeço por compartilharem comigo momentos tão agradáveis que possibilitaram uma vida menos sofrida longe da minha família. Cleiton, Mayer, Ana Maria, Cintia, Cristine, Felipe, Lúcia, Viviane, Liliane, Luciana, Renata o convívio com vocês foi muito agradável!

Ao meu querido amigo e companheiro de longa data, Jailson, agradeço por estar comigo em tantos momentos importantes, me escutando, aconselhando e acalmando em momentos difíceis.

À Anny por seu companheirismo e amizade.

Agradeço à Luciana “*in memoriam*”. Nossa antiga secretária do PPG-EQ deixou saudades por sua presteza, simpatia e boa vontade.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Agradeço a Deus pela conquista acadêmica e pelas amizades consolidadas, bons frutos deste trabalho.

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”*

*George Bernard Shaw*

## RESUMO

Neste estudo, a enzima glicose isomerase e a levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* foram coimobilizadas em gel de alginato de cálcio para aplicação no processo contínuo de produção de etanol a partir de xilose e de hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana via simultânea isomerização e fermentação dos açúcares. A imobilização prévia da enzima em suportes porosos antecedeu o processo de coimobilização. Elevadas cargas de proteína foram imobilizadas no suporte glutaraldeído-quitosana (30-68 mg.g<sup>-1</sup> de suporte). Neste caso, elevados rendimentos de imobilização (~100 %) e atividade recuperadas superiores a 90 % foram alcançados. Em condições típicas de simultânea isomerização e fermentação de xilose (pH 5, 35 °C, presença de nutrientes e concentrações de etanol até 70 g.L<sup>-1</sup>) a enzima imobilizada manteve aproximadamente 90% da atividade inicial após 120 horas. Carbonato de cálcio foi utilizado para manutenção do pH do meio de isomerização/fermentação superior a 5,0, garantindo elevada conversão da xilose a 32-35 °C. Nessas condições, concentrações de enzima e levedura no reator da ordem de 60–120×10<sup>3</sup>UI.L<sup>-1</sup> e 50 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, resultaram nos melhores rendimentos e seletividade em etanol, em batelada. Após o consumo de 65 g.L<sup>-1</sup> de xilose no intervalo em 12 horas, em média, 21 g.L<sup>-1</sup> de etanol e 14 g.L<sup>-1</sup> de xilitol foram produzidos. Na ausência de carbonato de cálcio, a conversão do açúcar foi parcial devido à redução do pH do meio, que chegava a 4,7, impossibilitando a atividade de GI. O hidrolisado de hemicelulose resultante do tratamento do bagaço de cana com ácido diluído apresentou composição média de 61,0 g.L<sup>-1</sup> de xilose; 7,3 g.L<sup>-1</sup> de arabinose; 7,2 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 10,4 g.L<sup>-1</sup> de ácido acético; 0,53 g.L<sup>-1</sup> de furfural; 0,06 g.L<sup>-1</sup> de hidroximetilfurfural e 4,3 g.L<sup>-1</sup> de derivados da lignina. A simultânea isomerização e fermentação de meio preparado com hidrolisado não destoxificado gerou 23 g.L<sup>-1</sup> de etanol, com rendimento de 0,34 g.g<sup>-1</sup> e produtividade de 1,8 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. O processo contínuo de simultânea isomerização e fermentação de xilose foi conduzido com rendimentos equivalentes ao processo descontínuo por um período de 7 dias. Nesse caso, a operação por longos períodos será possível com o controle do pH e prevenção contra contaminações microbianas.



## ABSTRACT

Glucose isomerase (GI) was covalently immobilized and co-immobilized with baker yeast in calcium alginate beads for ethanol production by simultaneous isomerization and fermentation of xylose or hemicellulose hydrolysate from bagasse. GI was covalently immobilized on glutaraldehyde-chitosan and high protein loads were immobilized (30-68 support mg.g<sup>-1</sup>). High immobilization yields (100%) and activity recovery (90%) were achieved. Under typical operation conditions of simultaneous isomerization and fermentation (pH 5, 35°C, medium with nutrients and ethanol concentrations up to 70g.L<sup>-1</sup>) the derivative remained 90% of initial activity after 120 hours. Calcium carbonate was used to maintain the pH in isomerization/fermentation medium higher than 5.0, ensuring high conversion of xylose at 32-35°C. Accordingly, concentrations of enzyme and yeast in the reactor of 60-120.10<sup>3</sup>U.L<sup>-1</sup> and 50g.L<sup>-1</sup>, respectively, resulted in better yields and selectivity for ethanol batch production. After consumption of ~ 65g.L<sup>-1</sup> of xylose in about 12 hours, 21g.L<sup>-1</sup> of ethanol and 14g.L<sup>-1</sup> of xylitol was produced. In a medium without calcium carbonate, partial sugar conversion was observed due to the reduction of pH medium, which decreased up to 4.7, causing the inactivation of GI. The treatment of sugarcane bagasse with diluted acid resulted in hydrolysate with 61.0g.L<sup>-1</sup> of xylose, 7.3g.L<sup>-1</sup> of arabinose, 7.2g.L<sup>-1</sup> of glucose, 10.4g.L<sup>-1</sup> of acetic acid, 0.53g.L<sup>-1</sup> of furfural, 0.06g.L<sup>-1</sup> of hydroxymethylfurfural and 4.3g.L<sup>-1</sup> of lignin derivatives. Baker yeast was able to produce ethanol from non-detoxified liquid hydrolysate as efficiently as pure xylose medium. Simultaneous isomerization and fermentation using non-detoxified hydrolysate led to 23 g.L<sup>-1</sup> ethanol, yield of 0.34g.g<sup>-1</sup> and a productivity of 1.8g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Continuous process was conducted for 7 days. The operation for longer periods of time will be possible with pH control and microbial contamination prevention.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Ligações lignina-hemicelulose. Benzil ester (a), benzil éter (b), (c) fenil glicosídica. ....	22
Figura 2.2 – Composição química do bagaço de cana de açúcar. ....	23
Figura 2.3 – Formação de furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico a partir dos monossacarídeos glicose e xilose em meio ácido. ....	26
Figura 2.4 – Faces da glicose isomerase de <i>Streptomyces rubiginosus</i> . Os quatro monômeros da estrutura tetramérica estão representados em turquesa, rosa, verde e laranja. Em azul, os resíduos de lisina. ....	30
Figura 2.5 – Estágios iniciais da fermentação de xilulose em <i>S. cerevisiae</i> . ....	31
Figura 2.6 – Principais métodos de imobilização de enzimas (a) Ligação Covalente; (b) Adsorção; (c) Encapsulação; (d) entrecruzamento. ....	36
Figura 2.7 – Estrutura primária da (a) celulose e (b) quitosana. ....	38
Figura 3.1 – Imagens obtidas durante no decorrer do tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico a 3% (razão sólido/líquido 1:4) em autoclave a 121°C por 40 minutos. ....	46
Figura 3.2 – Detalhes da câmara de Neubauer utilizada para contagem de células. Dimensões do quadrante: profundidade: 0,1mm e largura 1mm. ....	50
Figura 3.3 – Mecanismo de aminação dos grupos carboxílicos ativados com EDAC na presença de EDA. ....	53
Figura 3.4 – Preparação do biocatalisador composto por GI imobilizada e levedura de panificação coimobilizadas em alginato de cálcio. (a) Aparato utilizado na preparação. (b) Pellets obtidos após coimobilização de IGI-Ch e levedura Itaiquara®. ....	57
Figura 3.5 – Imagem do sistema de reatores contínuos utilizado nos ensaios de simultânea isomerização e fermentação de xilose. ....	60
Figura 3.6 – Imagem do reator contínuo utilizado na SIF de xilose. ....	61

Figura 4.1 – Cinética de imobilização de glicose isomerase em quitosana ativada com glutaraldeído. $Y_P$ = rendimento da imobilização de proteína (- - -); $Y_{UI}$ = rendimento de imobilização de unidades de enzimas (—); cargas oferecidas: 30 mg .g <sup>-1</sup> (●), 50 mg.g <sup>-1</sup> (▲), 70 mg.g <sup>-1</sup> (▲) 100 mg.g <sup>-1</sup> (◆).....	68
Figura 4.2 – Eletroforese SDS-PAGE de GENSWEET <sup>®</sup> SGI. (1) marcadores de proteína (Peso molecular em kDa); (2): extrato enzimático; (3): sobrecarga de extrato enzimático. ....	68
Figura 4.3 – Influência da temperatura sobre a atividade de isomerase de glicose, pH 7,0. SGI: enzima solúvel; IGI-Ch: imobilizada GI em glutaraldeído-quitosana. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas.....	70
Figura 4.4 – Influência do pH sobre a atividade de glicose isomerase, a 60°C. SGI: enzima solúvel; IGI-Ch: imobilizada GI em glutaraldeído-quitosana. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas. ....	71
Figura 4.5 – Perfis de inativação de isomerase de glicose a 80°C. SGI: enzima solúvel; IGI-Ch: imobilizada GI em glutaraldeído-quitosana. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas.....	72
Figura 4.6 – Isomerização de 60g. L <sup>-1</sup> xilose em condições operacionais de SIF, catalisada por GI solúvel e imobilizada, a 30°C e pH 5. (□) SGI: 12×10 <sup>3</sup> IU.L <sup>-1</sup> ; IGI-Ch (●): 12×10 <sup>3</sup> IU.L <sup>-1</sup> (7 g derivado. L <sup>-1</sup> ); IGI-HF (◆) 12×10 <sup>3</sup> IU.L <sup>-1</sup> (13 g derivado. L <sup>-1</sup> ).....	74
Figura 4.7 – Atividades residuais da glicose isomerase, em condições padrão, após incubação em condições típicas da SIF xilose: pH 5,0; 35°C e meio contendo fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cobalto, soytone, extrato de levedura, ureia, cloreto de cálcio e etanol. (a) SGI e IGI-Ch e (b) SGI e IGI-HF. ....	76
Figura 4.8 – Atividades residuais de glicose isomerase imobilizada em quitosana (IGI-Ch) após três bateladas repetidas de isomerização de frutose a pH 7 e 60°C.....	77
Figura 4.9 – Fatores responsáveis pela redução da atividade catalítica da glicose isomerase durante procedimento de aminação a pH 4,75, em EDA 250mM e carbodiimida 10mM por 30 minutos. ....	79

Figura 4.10 – Inativação de GI a 62°C e pH 5 em meio contendo 5mM MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O e 2,5mM COCl <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O. SGI: glicose isomerase solúvel, IGI-Aga: glicose isomerase imobilizada em quitosana. ....	80
Figura 4.11 – Perfil de atividade de GI solúvel e imobilizada em glioxil-agarose em função do pH. Atividade em frutose 1M pH 7 a 55°C. SGI: glicose isomerase solúvel, IGI-Aga: glicose isomerase imobilizada em quitosana.....	80
Figura 4.12 – SIF de 65g.L <sup>-1</sup> de xilose a 35 °C e 150 rpm catalisada por IGI-Ch: <i>S. cerevisiae</i> (38:4). (a) perfil de consumo de substrato e de variação do pH, (b) perfil de formação de produtos.....	84
Figura 4.13 – Concentrações de etanol no início da SIF de 65g.L <sup>-1</sup> de xilose a 35°C em diferentes concentrações de levedura no reator. ....	87
Figura 4.14 – Fermentação de xilose com <i>S. cerevisiae</i> coimobilizadas em gel de alginato de cálcio, a 35°C, pH <sub>0</sub> 5,4 e 150 rpm. Biocatalisador (17% de levedura em massa seca e 5% de gel de quitosana sem GI). Razão biocatalisador:meio (1:1). ....	89
Figura 4.15 – Massa seca dos pellets – biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10) – na SIF de xilose a 35°C e 150 rpm.....	91
Figura 4.16 – SIF de xilose pura e dos hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana não desintoxicado e desintoxicado por fervura e supercalagem suplementados com xilose pura, sais nutrientes e antibiótico (a) conversão da xilose, (b) perfil de consumo de substrato. Reação conduzida em batelada a 35°C e 150 rpm com uso do biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10) acrescido de carbonato de cálcio 0,5% (m/m). Símbolos: (●,o) xilose comercial, (●,o,♦) hidrolisado desintoxicado, hidrolisado não desintoxicado (●,o,♦).....	105
Figura 4.17 – Produtos da SIF de xilose pura e dos hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana não desintoxicado e desintoxicado por fervura e supercalagem suplementados com xilose pura, sais nutrientes e antibiótico (a) perfil de formação de glicerol e ácido acético (b) perfil de formação de etanol e xilitol. Reação conduzida em batelada a 35°C e 150 rpm com uso do biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10) acrescido de carbonato de cálcio 0,5% (m/m). Símbolos: (●,o) xilose comercial, (●,o) hidrolisado desintoxicado, hidrolisado não desintoxicado (●,o).....	107

Figura 4.18 – Perfil de pH em função do tempo da SIF de xilose catalisada por glicose isomerase e <i>S. cerevisiae</i> coimobilizadas com carbonato de cálcio 0,5% em alginato de cálcio.....	110
Figura 4.19 – Viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> na SIF de xilose submetidas a diferentes temperaturas.....	111
Figura 4.20 – SIF de 65g.L <sup>-1</sup> xilose em operação contínua a temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)+CaCO <sub>3</sub> 0,5%. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL <sup>-1</sup> . Concentração inicial de células no reator: 50g.L <sup>-1</sup> (a) Perfil de conversão da xilose (b) perfil de variação do pH. ....	114
Figura 4.21 – Micrografia obtida após reações de Gram em microrganismos contaminantes detectados durante a SIF de xilose em reator contínuo (ampliação de 1000 ×).....	115
Figura 4.22 – Perfil de formação de produtos durante SIF de 65g.L <sup>-1</sup> de xilose em operação contínua a temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)+CaCO <sub>3</sub> 0,5%. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL <sup>-1</sup> . Concentração inicial de células no reator: 50g.L <sup>-1</sup> (a) principais produtos (b) somatório dos ácidos orgânicos formados (acetato, formiato, malato; succinato; butirato e lactato). Os pontos nos gráficos representam: média± desvio padrão de duas amostragens no período de 24 horas. ....	117
Figura 4.23 – Imagem do reator contínuo contendo biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10) após 11 dias de ensaio. ....	118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Produção de etanol de xilulose por <i>S. cerevisiae</i> .....	34
Tabela 3.1 – Composição dos meios utilizados na simultânea isomerização e fermentação de xilose .....	44
Tabela 3.2 – Características do tratamento ácido do bagaço de cana <i>in natura</i> . .....	45
Tabela 3.3 – Composição dos biocatalisadores preparados por coimobilização de GI imobilizada e levedura de panificação em alginato de cálcio. ....	58
Tabela 3.4 – Ensaio de simultânea isomerização e fermentação de xilose .....	58
Tabela 4.1 – Parâmetros da imobilização de glicose isomerase em glutaraldeído quitosana a pH 7,0 e 25°C.....	69
Tabela 4.2 – Influência da concentração de etanol sobre a atividade de glicose isomerase a pH 5,0 e 35°C em meio contendo xilose, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cobalto, soytone, extrato de levedura, ureia, cloreto de cálcio (concentrações descritas no item 3.4.6.5). ....	74
Tabela 4.3 – Parâmetros da imobilização de glicose isomerase em glioxil-agarose a pH 10,0 e 25°C. ....	78
Tabela 4.4 – Concentrações de IGI-Ch e levedura de panificação adotadas para a SIF de xilose a 35°C.....	82
Tabela 4.5 – Parâmetros da SIF de 65g.L <sup>-1</sup> de xilose a 35 °C e 150 rpm, catalisada por glicose isomerase imobilizada (IGI-Ch) e <i>S. cerevisiae</i> coimobilizadas em alginato de cálcio. ....	86
Tabela 4.6– Viabilidade e concentração celular na SIF de 65g.L <sup>-1</sup> de xilose a 35°C com diferentes biocatalisadores. ....	90
Tabela 4.7 – SIF de xilose 65g.L <sup>-1</sup> com biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4) em diferentes meios a 35°C e 150 rpm.....	92

Tabela 4.8 – Balanço de massa de carbono, recuperação de carbono e rendimentos de etanol para SIFs de xilose 65g.L <sup>-1</sup> em batelada com o biocatalisador (IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> 38:4) a 35°C às 24 horas.....	94
Tabela 4.9 – Influência da adição do CaCO <sub>3</sub> nos parâmetros da SIF de xilose 65g.L <sup>-1</sup> a 35 °C e 150 rpm, catalisada por IGI-Ch e <i>S. cerevisiae</i> de panificação coimobilizadas em alginato de cálcio.....	97
Tabela 4.10 – Parâmetro da SIF de xilose 65g.L <sup>-1</sup> a 35°C e 150 rpm catalisada dor IGI-Aga/ <i>S. cerevisiae</i> (5:10). .....	99
Tabela 4.11 – Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....	100
Tabela 4.12 – Ensaio de hidrólise ácida do bagaço de cana <i>in natura</i> . Condições do tratamento: 121°C durante 40 minutos em autoclave. Relação sólido:líquido 1:4.....	100
Tabela 4.13 – Composição média do hidrolisado de hemicelulose obtido por tratamento bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído 3% (v/v) e relação sólido/líquido 1:4, em autoclave a 121°C por 40 min.....	101
Tabela 4.14 – Eficiência da hidrólise ácida do bagaço de cana <i>in natura</i> a 121°C durante 40 min em autoclave.....	102
Tabela 4.15 – Comparação do hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana não tratado com o tratado por fervura durante 15 min seguido de supercalagem até pH 10 e reacidificação até pH 6. ....	103
Tabela 4.16 – Composição média da fração sólida obtida após remoção da fração líquida resultante do tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído 3% (v/v) e relação sólido/líquido 1:4, em autoclave a 121°C por 40 minutos. ....	104
Tabela 4.17 – Parâmetros da produção de etanol e xilitol a partir da SIF de xilose pura e de hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana a conduzida a 35°C e 150 rpm.....	109
Tabela 4.18 – Condições gerais da SIF de xilose em operação contínua.....	112
Tabela 4.19 – Parâmetros da SIF de 65g.L <sup>-1</sup> a 32°C conduzida em reatores batelada e contínuo a pH inicial 5,6 com biocatalisador IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)+CaCO <sub>3</sub> 0,5% (m/m).	

Concentração de enzima do reator  $120 \text{ UI.mL}^{-1}$ . Concentração inicial de células no reator:  
 $50\text{g.L}^{-1}$  ..... 119

Tabela 4.20 – Eficiência de utilização de xilose/xilulose e hemicelulose na produção de etanol  
por diferentes tipos de levedura. .... 123



## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

GI – Glicose isomerase

IGI-Aga – Immobilized Glucose Isomerase in Agarose

IGI-Ch – Immobilized Glucose Isomerase in Chitosan

IGI-HF – Immobilized Glucose Isomerase by Genencor International

MBS – massa de bagaço seco

MBU – massa de bagaço úmido

$pH_0$  – pH inicial

$pH_f$  – pH final

Pr – Produtividade volumétrica

$S_{\text{ETOH/XOH}}$  – Seletividade do etanol em relação ao xilitol

SIF – Simultânea Isomerização e Fermentação

$V_f$  – viabilidade celular pH final

$V_i$  – viabilidade celular inicial

X – conversão

$Y_{\text{ETOH}}$  – Rendimento global em etanol

$Y_{\text{XOH}}$  – Rendimento global em xilitol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1	Composição dos Materiais Lignocelulósicos.....	21
2.1.1	Aplicações da xilana .....	22
2.1.2	Bagaço de Cana.....	23
2.2	Hidrólise da hemicelulose.....	24
2.2.1	Hidrólise ácida da hemicelulose do bagaço de cana .....	25
2.2.1.1	Inibidores do metabolismo microbiano.....	26
2.3	Produção de etanol de xilulose.....	28
2.3.1	Características da enzima glicose isomerase .....	29
2.3.2	Fermentação de xilulose por <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.4	Imobilização de Enzimas .....	35
2.4.1	Suportes para imobilização de enzimas .....	37
2.4.2	Quitosana .....	37
2.4.3	Agarose .....	38
2.5	Aplicações de reatores contínuos em bioprocessos .....	39
2.5.1	Células imobilizadas na produção de etanol .....	41
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1	Material.....	43
3.2	Meios de SIF.....	43
3.2.1	Obtenção do caldo hidrolisado de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar ..	44
3.2.1.1	Detoxificação do hidrolisado ácido de hemicelulose.....	46
3.2.1.2	Preparação do meio de SIF contendo hidrolisado de hemicelulose.....	46
3.3	Métodos analíticos .....	47
3.3.1	Determinação da concentração de glicose .....	47
3.3.2	Determinação da concentração de proteína .....	47
3.3.3	Eletroforese .....	47
3.3.4	Medida de atividade de glicose isomerase .....	47
3.3.5	Determinação de umidade.....	48
3.3.6	Análise de composição do bagaço de cana <i>in natura</i> .....	48
3.3.7	Quantificação de carboidratos e ácidos orgânicos .....	49
3.3.8	Quantificação de furfural e hidroximetilfurfural .....	49
3.3.9	Quantificação de lignina solúvel em hidrolisado de hemicelulose.....	49
3.3.10	Análise da viabilidade e concentração celular .....	50
3.3.11	Coloração Gram .....	51
3.4	Procedimento Experimental.....	52
3.4.1	Preparação do suporte glutaraldeído-quitosana .....	52
3.4.2	Preparação do suporte glioxil-agarose .....	52
3.4.3	Aminação da enzima glicose isomerase.....	52
3.4.4	Imobilização glicose isomerase em glutaraldeído-quitosana.....	53
3.4.5	Imobilização glicose isomerase em glioxil-agarose.....	54
3.4.6	Caracterização do derivado IGI-Ch .....	54
3.4.6.1	Efeito do pH e da temperatura .....	54
3.4.6.2	Estabilidade térmica.....	55
3.4.6.3	Efeito do etanol sobre a atividade enzimática.....	55
3.4.6.4	Ensaio de reciclo para IGI-Ch .....	55
3.4.6.5	Isomerização de xilose em meio de SIF.....	55

3.4.6.6	Estabilidade de GI em condições SIF de xilose .....	55
3.4.7	Coimobilização de glicose isomerase imobilizada e <i>S. cerevisiae</i> em alginato de cálcio	56
3.4.8	Simultânea isomerização e fermentação de xilose em reator batelada.....	58
3.4.9	Viabilidade da levedura de panificação a diferentes temperaturas.....	59
3.4.10	Simultânea isomerização e fermentação da xilose em operação contínua .....	59
3.4.10.1	Tratamento ácido da levedura.....	62
3.5	Metodologias de cálculos .....	63
3.5.1	Cálculo dos parâmetros de imobilização .....	63
3.5.2	Desempenho da hidrólise ácida do bagaço de cana.....	64
3.5.3	Cálculo dos parâmetros da SIF .....	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
4.1	Obtenção de derivados de glicose isomerase .....	67
4.1.1	Imobilização de GI em glutaraldeído-quitosana.....	67
4.1.2	Influência do pH e da temperatura na atividade de glicose isomerase .....	70
4.1.3	Inativação térmica.....	72
4.1.4	Isomerização de xilose a xilulose a pH 5,0 e 30°C .....	73
4.1.5	Influência da concentração de etanol sobre a atividade de GI em condições operacionais da SIF de xilose .....	74
4.1.6	Estabilidade de GI nas condições de operação do processo de SIF de xilose .....	75
4.1.7	Ensaio de reciclo usando GI imobilizada.....	76
4.2	Imobilização de GI em glioxil-agarose .....	77
4.3	SIF de xilose em batelada.....	81
4.3.1	Influência das concentrações de enzima e de levedura na produção de etanol ....	81
4.3.1.1	Avaliação da viabilidade e do crescimento celular na SIF de xilose em batelada	90
4.3.2	Influência da composição do meio na produção de etanol.....	91
4.3.3	Novas estratégias para condução da SIF de xilose .....	96
4.3.3.1	SIF de xilose com biocatalisador IGI-Aga/ <i>S. cerevisiae</i> .....	98
4.3.3.2	Seleção de biocatalisadores para o SIF de xilose em operação contínua .....	99
4.4	Produção do hidrolisado de hemicelulose do bagaço de cana e sua utilização no processo SIF .....	99
4.4.1	Quantificação da hemicelulose presente no bagaço de cana .....	100
4.4.2	Avaliação da hidrólise ácida do bagaço de cana <i>in natura</i> .....	100
4.4.3	Avaliação do Processo SIF utilizando hidrolisado de hemicelulose .....	105
4.5	Estabilidade de <i>S. cerevisiae</i> em diferentes temperaturas .....	110
4.6	SIF de xilose em sistema contínuo .....	111
4.7	Comparação dos resultados obtidos com informações descritas na literatura .....	121
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos vem sendo intensamente estudado em todo o mundo. A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (33-51%), hemicelulose (19-34%) e lignina (20-30%) (VAN MARIS et al., 2006). A hidrólise ácida ou enzimática dos polissacarídeos da lignocelulose gera majoritariamente dois açúcares, glicose a partir de celulose e xilose da hemicelulose. Esses açúcares podem ser aplicados na produção de uma série de produtos, inclusive etanol.

No Brasil, o bagaço de cana é um resíduo agroindustrial importante. A produção de açúcar e álcool no país gera atualmente milhões de toneladas dessa biomassa, cujo principal destino na atualidade é a queima para produção de energia (BRANCO et al. 2011). Mundialmente, a obtenção de etanol e outros bioprodutos vem sendo estudada como alternativa para agregar valor ao bagaço, integrando novos processos às plantas industriais já existentes (KUMAR et al., 2007; CHENG et al., 2008; BRANCO et al. 2011).

Para aumentar a viabilidade econômica do processo de produção de etanol, é importante que hexoses e pentoses, componentes da biomassa vegetal, sejam fermentados. Nesse contexto, o microrganismo ideal seria aquele capaz de utilizar todos os açúcares gerados no processo de hidrólise (CHENG et al., 2008).

*Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo preferido para produção de etanol, mas, infelizmente, esta levedura é incapaz de fermentar xilose (CHU; LEE, 2007). As leveduras *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* são conhecidas por fermentarem xilose a etanol. Entretanto, a exploração comercial dessas espécies é limitada devido a fatores como baixa tolerância a etanol, baixas velocidades de fermentação, dificuldade de controle da velocidade de fornecimento de oxigênio a nível ótimo e maior sensibilidade aos inibidores gerados durante o pré-tratamento dos substratos lignocelulósicos (SAHA, 2003). Outra abordagem que tem sido estudada por vários grupos de pesquisa é a modificação genética de *S. cerevisiae*, mediante a incorporação dos genes de enzimas necessárias para metabolização de xilose (HUGHES et al., 2009; OLOFSSON et al., 2008; WALFRIDSSON et al., 1996). Esta abordagem, no entanto, também tem vários inconvenientes, como a estabilidade genética da cepa recombinante, produção de etanol a baixo rendimento global e a concorrência com cepas selvagens em escala industrial. No entanto, embora *S. cerevisiae* não utilize xilose, pode fermentar xilulose, isômero de xilose, a etanol. Portanto, outra possibilidade, que permite

aproveitar a robustez industrial de *S. cerevisiae*, é a isomerização *ex situ* da xilose em xilulose (RAO et al., 2008).

A isomerização reversível da xilose em xilulose é catalisada pela enzima glicose isomerase (GI), que tem sido intensamente utilizada na indústria na forma imobilizada, para a produção de xarope de glicose de milho rico em frutose (BHOSALE et al., 1996; GIORDANO et al., 2000). Embora glicose isomerase seja capaz de converter xilose a xilulose, 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 menores do que os necessários para obter a atividade máxima da enzima (pH 7-8, temperatura superior a 70°C). O funcionamento da SIF nos pHs mais elevados pode levar à contaminação por bactérias. Por outro lado, na operação em pH baixo, a atividade da enzima terá uma redução significativa. A operação na faixa de temperatura exigida pela levedura é obrigatória, já que não irá sobreviver por longos períodos em temperaturas acima de 37°C. Isso implica também na redução da atividade da enzima (RAO et al., 2008; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Portanto, a melhor temperatura e pH para executar a xilose SIF é uma relação de compromisso entre as exigências da enzima e da levedura e sua determinação requer estudos específicos.

Tendo em vista a temática abordada, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o processo de produção de etanol (descontínua e contínua) utilizando xilose e hemicelulose do bagaço de cana como substratos e *S. cerevisiae* de panificação coimobilizada com glicose isomerase imobilizada como biocatalisador. Os objetivos específicos foram:

- ✓ Obter um derivado da enzima glicose isomerase com elevada atividade catalítica e estabilidade adequada para aplicação na SIF de xilose;
- ✓ Definir as concentrações de glicose isomerase imobilizada e de *S. cerevisiae* coimobilizadas em alginato de cálcio que conduzem a bons rendimentos e seletividade ao etanol;
- ✓ Obter um hidrolisado de hemicelulose de bagaço com elevada concentração de xilose mediante o tratamento da biomassa com ácido sulfúrico diluído;
- ✓ Definir condições adequadas para condução da SIF de xilose em operação contínua.

O processamento contínuo de xilose para produção de etanol retoma a estratégia de processo adotada por Trovati (2001) e Giordano (1992) que utilizaram com sucesso um sistema contínuo de reatores de leito fixo para sacarificação e fermentação de amido liquefeito de mandioca.

O desenvolvimento do processo de produção de etanol de bagaço com aproveitamento da fração de hemicelulose é um dos objetivos do projeto temático apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São (FAPESP) do qual este trabalho foi integrante: *Bioprocess systems engineering (BSE) applied to the production of bioethanol from sugarcane bagasse* (2008/56246-0), coordenado pelo Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano/DEQ-UFSCAR.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Lignocelulose é um termo genérico usado para descrever o conjunto formado pelos principais constituintes na maioria das plantas, ou seja, celulose, hemicelulose e lignina. A primeira dificuldade de converter lignocelulósicos em produtos de maior valor agregado, como o etanol, é atribuída às características morfológicas do material, naturalmente resistente à degradação por agentes externos. A seguir, são descritas as principais características dos componentes da biomassa lignocelulósica, com destaque para a fração hemicelulósica, objeto deste estudo.

A celulose é o polissacarídeo mais comum na natureza. Estruturalmente, é um homopolissacarídeo formado por unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosose ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) formando uma cadeia linear. A celobiose, dímero de glicose, é definida como a unidade conformacional mínima da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Feixes de moléculas de celulose se agregam e formam regiões cristalinas alternadas com regiões menos ordenadas ou amorfas. A celulose tem uma elevada resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes devido à ocorrência regular de ligações de hidrogênio e à estrutura fibrosa (SJÖSTRÖM, 1993).

A lignina é uma substância amorfa de natureza aromática muito complexa, sendo constituída por macromoléculas baseadas em três precursores monoméricos: álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. A proporção desses monômeros varia entre as espécies de planta. Além de funcionar como barreira contra degradação enzimática ou microbiana, a mais importante propriedade física desta macromolécula orgânica é sua rigidez, que não só dá força aos tecidos vegetais, mas também impede o colapso dos elementos condutores de água, nutrientes e metabólitos (FENGEL; WEGENER, 1989; SIMÕES, 2001).

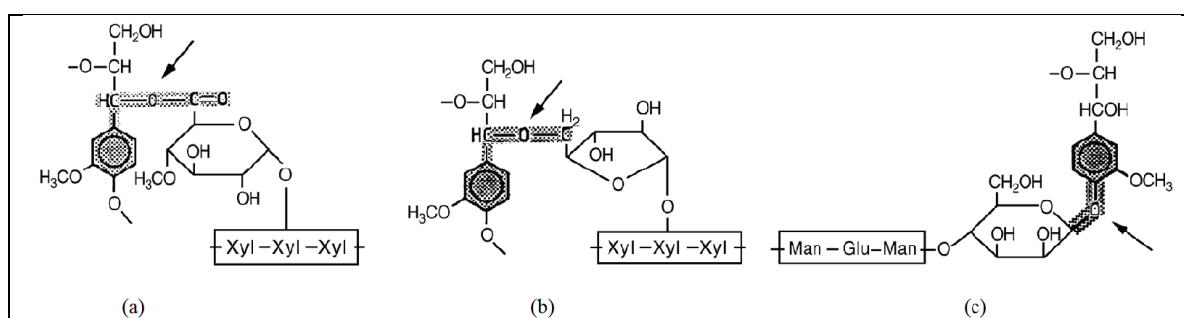
Os materiais lignocelulósicos também apresentam pequenas quantidades de materiais extrativos e cinzas. Os extrativos são por definição, compostos que podem ser separados do material por extração com solventes orgânicos ou água. A cinza é composta por íons metálicos como sódio, potássio, cálcio e ânions correspondentes, por exemplo, carbonato, fosfato, silicato e sulfato (BIERMANN, 1996; ROSSELL, 2006).

Hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza, representando cerca de 20-35% da biomassa lignocelulósica. Ao contrário da celulose, hemiceluloses não são quimicamente homogêneas. Possuem estrutura composta por polímeros

heterogêneos de açúcares como pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos de açúcares (SAHA, 2003). Diversos tipos de polímeros compõem os vários tipos de hemicelulose, dentre os quais, xiloglicanas, xilanas e mananas tais como glicomananas, galactomananas ou galactoglicomananas. Xiloglicanas são definidas pela cadeia principal de  $\beta$ -1,4-glicanas, que é altamente substituída com xilose, e apresentam cadeias laterais que podem conter galactose, arabinose ou fucose. Xilanas são as mais abundantes hemiceluloses e possuem cadeia principal de  $\beta$ -1,4-xilose e podem conter ramificações de arabinose, ácido glucurônico ou 4-*O*-metil éter e ácidos acético, ferrúlico e *p*-cumárico (SAHA, 2003; MOHNEN et al., 2008). Xilanas podem ainda ser categorizadas como homoxilanas, arabinoxilanas, glucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas. A frequência e composição das ramificações são dependentes da fonte da xilana. Xilana *birchwood* (Roth<sup>®</sup>), por exemplo, contém 89,3% de xilose, 1% de arabinose, 1,4% de glicose e 8,3% de ácido urônico (KORMELINK; VORAGEN, 1993). Já a arabinoxilana de trigo contém 65,8% de xilose, 33,5% de arabinose, 0,1% de manose, 0,1% de galactose e 0,3% de glicose (GRUPPEN et al., 1992).

Hemiceluloses estão interconectadas à celulose e à lignina, estando associadas à celulose por ligações de hidrogênio e forças de *van der Waals* e à lignina por ligações covalentes. Podem ser representadas pela fórmula geral  $(C_5H_8O_4)_n$ , cujo grau de polimerização (n) pode variar entre 80 e 200 (WYMAN, 2005; PENG et al., 2009). Na Figura 2.1 são ilustradas diferentes ligações lignina-hemicelulose (BOBLETER, 2005).

**Figura 2.1** – Ligações lignina-hemicelulose. Benzil ester (a), benzil éter (b), (c) fenil glicosídica.



Abreviaturas: Xyl, xilose; Man, manose; Glu, glicose. Fonte: BOBLETER (2005).

### 2.1.1 Aplicações da xilana

Industrialmente, xilanas são utilizadas para produção de xilose, xilitol e furfural. Uma aplicação que vem sendo estudada recentemente é para produção de xilo-ligossacarídeos, oligômeros de xilose com elevado valor comercial. Esses compostos são considerados prebióticos, pois estimulam crescimento das bactérias benéficas à flora intestinal humana



(MAALEJ-ACHOURI et al., 2009; PENG et al., 2009). Uma importante alternativa adicional para aproveitamento da xilanas, já que são fontes de açúcares, é sua utilização em processos fermentativos para produção de etanol (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000b; MARTIN, 2007; CHENG et al., 2008).

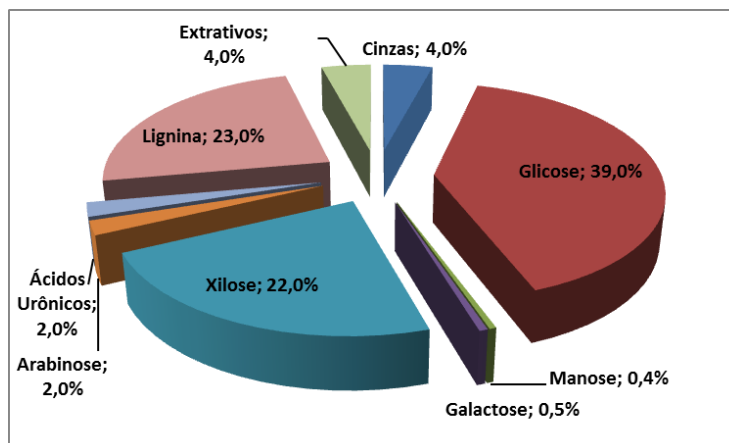
A hidrólise de xilana gera xilose, um açúcar fermentescível por algumas leveduras, tais como *Pichia Stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, mas não por *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura tradicionalmente usada no Brasil para produção de etanol da sacarose presente no caldo de cana de açúcar. Contudo, a velocidade de produção e as concentrações de etanol atingidas por esses microrganismos comparam-se pobremente com os valores obtidos para a fermentação de hexoses (glicose e frutose) por *S. cerevisiae*.

*S. cerevisiae* não fermenta xilose, mas pode produzir etanol a partir de seu isômero, xilulose. Assim, uma forma de produzir etanol a partir da xilose por *S. cerevisiae* sem utilizar modificação genética do microrganismo é, primeiramente, converter xilose em xilulose, em reação catalisada por xilose isomerase, seguido de fermentação para etanol (OLSSON et al., 1996).

### 2.1.2 Bagaço de Cana

O bagaço de cana, subproduto fibroso remanescente após extração do açúcar da cana, é um dos resíduos agrícolas de maior importância no território brasileiro. Quimicamente, cerca de 40-50% do bagaço seco é celulose, 25-35% é hemicelulose e o restante é principalmente lignina (SUN et al., 2009). Uma composição mais detalhada foi publicada por Van Maris et al. (2006) (Figura 2.2).

**Figura 2.2** – Composição química do bagaço de cana de açúcar.



Fonte: VAN MARIS et al. (2006).

A hemicelulose do bagaço é classificada como glucuronoarabinoxilana (polímero composto por cadeia principal de xilose contendo ramificações de ácido glucurônico e arabinose), contendo aproximadamente 92% dessa pentose (BOUSSARSAR et al., 2009).

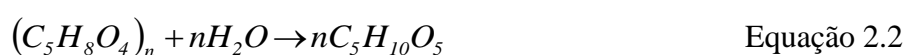
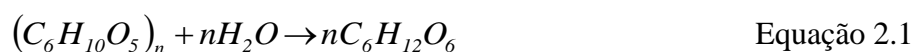
O bagaço é produzido em grandes quantidades nas indústrias de açúcar e álcool. Em geral, uma tonelada de cana gera 280 kg de bagaço úmido (umidade 50%) (SUN et al., 2009). De acordo com Frollini e Pimenta (1997), metade do bagaço deve ser queimada para atender à demanda de energia da planta. Porém, a indústria sucroalcooleira brasileira queima cerca de 75-90% do bagaço e vende eletricidade às distribuidoras. Esse fato faz do setor sucroalcooleiro um importante contribuinte da produção de eletricidade na matriz energética nacional.

O Balanço Energético Nacional divulgado em 2012 destacou que 44,1% da oferta interna da matriz energética brasileira, no ano anterior, foram de origem renovável. Desse montante, 15,7% são referentes ao aproveitamento da biomassa da cana; 14,7% do potencial hidráulico e eletricidade; 9,7% dos usos de lenha e carvão vegetal e 4,1% lixo e outras fontes renováveis (Empresa de Pesquisa Energética, 2012).

Além de geração de energia, o bagaço pode ser aproveitado na produção de papel e papelão, ração animal, furfural e produção de fertilizantes (LOBO et al., 2007). Alternativas que vêm sendo estudadas são os processos fermentativos para produção de etanol e xilitol (FOGEL et al., 2005; KUMAR, 2007; BRANCO et al., 2011).

## 2.2 HIDRÓLISE DA HEMICELULOSE

A estabilidade térmica e química das hemiceluloses é geralmente inferior a da celulose, devido à baixa cristalinidade e seu menor grau de polimerização. Em função disso, podem ser mais facilmente hidrolisadas para liberar açúcares monoméricos. A estequiometria para a liberação de hexoses e pentoses presentes no polissacarídeo é apresentada nas equações 2.1 e 2.2 respectivamente (WYMAN, 2005):



A hidrólise da hemicelulose pode ser catalisada por um adequado coquetel de enzimas coletivamente conhecidas como hemicelulases. Nesse caso, a reação é conduzida em temperaturas moderadas, evitando a degradação de açúcares (WYMAN, 2005). Ácidos diluídos (sulfúrico, por exemplo) também podem catalisar a hidrólise da hemicelulose em temperaturas entre 100 e 200°C. Uma desvantagem desse processo é a degradação de açúcares, gerando furfural, hidroximetilfurfural, além de outros compostos inibidores do processo de fermentação. No entanto, a degradação pode ser reduzida, levando a uma recuperação de aproximadamente 80-90% dos açúcares, dependendo das condições da reação (MARTIN et al. 2007; BOUSSARSAR et al. 2009; UM; BAE 2011). É possível também realizar a operação sem adição de ácido, em processos hidrotérmicos baseados no uso da água ou vapor em elevadas pressões e temperaturas de 150-230°C, entretanto esse processo gera principalmente oligossacarídeos (LASER, 2002; BOUSSARSAR et al., 2009).

### **2.2.1 Hidrólise ácida da hemicelulose do bagaço de cana**

Como descrito anteriormente, 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 duração da reação (UM e BAE, 2011). A formação de produtos de degradação de açúcares como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) é fortemente dependente da severidade da hidrólise ácida. Produtos de degradação não só diminuem o rendimento da hidrólise, mas também atuam como inibidores da fermentação (MARTIN et al, 2007; CHENG et al., 2008; BRANCO et al., 2011). Dessa forma, a produção de hidrolisados sem grandes perdas de rendimentos, requer a seleção de condições adequadas de reação. Outra desvantagem do processo é a necessidade de uso de equipamentos resistentes à corrosão (CARVALHEIRO et al., 2008).

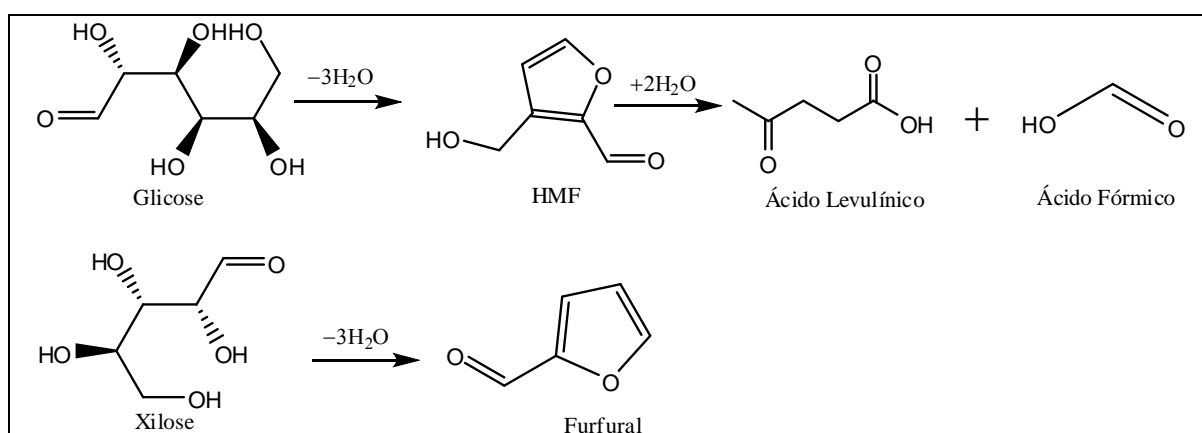
O fracionamento da hemicelulose do bagaço de cana por ácido diluído é um tema amplamente discutido na literatura. Uma série de trabalhos descreve o tratamento da biomassa com aplicação de relações sólido/líquido na faixa de 1/20 a 1/10 (MARTIN et al., (2007); BOUSSARSAR et al. (2009); BRANCO et al. (2011); UM; BAE (2011)). Como resultado da baixas relações sólido/líquido, a concentração de açúcares nos hidrolisados hemicelulósicos é relativamente baixa (inferior a 20g.L<sup>-1</sup>). Em função disso, concentrar o licor obtido é uma prática usual que antecede a etapa de fermentação (NIGAM, 2001; CHENG et al., 2008). Em oposição, para obter hidrolisados mais concentrados, Fogel et al. (2005) otimizaram a recuperação de xilose durante tratamento do bagaço de cana com auxílio do planejamento estatístico. A máxima concentração de xilose (57,3g.L<sup>-1</sup>) foi obtida no tratamento da biomassa

em autoclave a 1,0 atm por 40 min, para uma relação bagaço:ácido 1:4 em ácido sulfúrico 3%. Nesse sentido, a estratégia adotada por Cheng et al. (2008) para obtenção de hidrolisados mais ricos em açúcares consistiu em reutilizar o licor obtido em sucessivas reações de hidrólise ácida do bagaço. O primeiro ciclo de tratamento foi com ácido sulfúrico 1,25% (m/m) em autoclave a 121°C por 2 h, numa razão biomassa:líquido 1:10. Os pesquisadores verificaram que a concentração de açúcares redutores no hidrolisado aumentou até o terceiro ciclo, entretanto, o rendimento global do processo diminuía devido à degradação dos açúcares (por exemplo, furfural estava presente na concentração de 2,0g.L<sup>-1</sup>).

### 2.2.1.1 Inibidores do metabolismo microbiano

Como se sabe, condições severas aplicadas durante a hidrólise da hemicelulose resultam na liberação de muitas substâncias que inibem o crescimento e a produção de etanol por leveduras. O número e a identidade destes compostos tóxicos variam com a natureza da matéria-prima e das condições do tratamento. Três categorias principais de compostos inibidores derivados de tratamentos físico-químicos podem ser identificadas: ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos (CARVALHEIRO et al., 2008). Os mais importantes produtos de degradação são os compostos cíclicos furfural (formado a partir de pentoses e ácidos urônicos) e HMF (formado a partir de hexoses, como a glicose), conforme mostra a Figura 2.3.

**Figura 2.3** – Formação de furfural, hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico a partir dos monossacarídeos glicose e xilose em meio ácido



Fonte: NABARLATZ (2006).

Um inibidor comumente liberado durante a hidrólise da hemicelulose acetilada é ácido acético. Além deste, o ácido fórmico e o ácido levulínico podem ser gerados, como ilustrado na Figura 2.3. A literatura reporta que concentrações de ácido acético entre 2-5g.L<sup>-1</sup>

tem efeito inibitório sobre leveduras. Estudos reportam que apenas as formas não dissociadas dos ácidos difundem-se no citosol das células dos microrganismos, onde ocorre a dissociação devido ao pH neutro intracelular. Conseqüentemente há uma diminuição do pH interno que deve ser compensada por uma ATPase de membrana (enzima que catalisa a hidrólise do ATP, adenosina trifosfato) que bombeia prótons para fora da célula, na tentativa de manter o pH intracelular em valores fisiológicos à custa da hidrólise de ATP (VERDUYN et al., 1992). Quando a concentração de ácido é suficientemente elevada, a capacidade de bombeamento de prótons da célula é esgotada, fato que origina acidificação do citoplasma e perda de viabilidade celular (VIEGAS; SA-CORREIA, 1991). Em função disso, recomenda-se que fermentações de hidrolisados sejam conduzidas em pH cerca de 2 unidades acima do valor de pKa do ácido (4,8 a 25°C) para minimizar tal efeito (NIGAM, 2001).

Boyer et al. (2002) identificaram que concentrações de furfural superiores a 1g.L<sup>-1</sup> têm efeito inibidor sobre *S. cerevisiae*. Palmqvist et al. (1999) destacaram que esse composto aumenta a fase *lag* (período de adaptação do microrganismo, no qual não ocorre crescimento) e diminui a taxa de produção de etanol no começo da fase exponencial, mas parece não ter efeito no rendimento final, nem reduz a velocidade específica de crescimento por si só. Segundo os autores, o furfural é reduzido por NADH (coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo) a álcool furfuril (não inibidor) por ação da enzima álcool desidrogenase.

Taherzadeh (1999) verificaram que HMF em concentrações superiores a 2g.L<sup>-1</sup> diminuiu o crescimento de *S. cerevisiae* em 23%. Além disso, verificou que HMF prolonga a fase *lag*, porque as células convertem-no a álcool hidroximetilfurfuril (não inibidor) muito lentamente. Por causa da menor eficiência da enzima álcool desidrogenase, HMF permanece no meio cerca de quatro vezes mais tempo que o furfural.

Compostos aromáticos originários da degradação da lignina geralmente estão presentes em mais baixas concentrações nos hidrolisados, principalmente devido a baixa solubilidade em água. Porém, mesmo em baixas concentrações (1g.L<sup>-1</sup>), eles são capazes de inibir o crescimento, mas não influenciam no rendimento do etanol em *S. cerevisiae* (DELGENES, 1996).

Um das possibilidades para limitar o impacto dos inibidores no processo de fermentação é a introdução de processo adicional (químico, físico ou biológico) para redução dos inibidores (VAN MARIS et al., 2006). No quadro I estão destacados os tratamentos mais usados para remoção de ácidos fracos, furfural, HMF e compostos fenólicos.

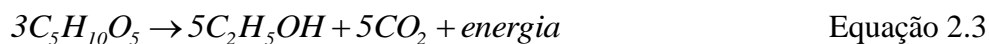
Quadro I: Métodos de detoxificação de hidrolisados lignocelulósicos.

Tratamento	Ácidos fracos	Furfural, HMF	Compostos fenólicos	Referência
Ca(OH) <sub>2</sub>				Ranatunga et al. (2000)
Eletrodiálise				Cheng et al. (2008)
Resinas de troca iônica				Kumar et al. (2007)
Lacase				Kumar et al. (2007)
Extração com solventes orgânicos				Wilson et al. (1989)
Ebulição				Cheng et al. (2008)

De maneira geral, não há uma solução simples para a detoxificação de diferentes tipos de hidrolisado. Como a seleção do processo dependerá do tipo de inibidor presente, a combinação de métodos ocasionalmente será necessária. Outra abordagem que vem sendo estudada é a adaptação gradativa dos microrganismos aos hidrolisados, tornando-os tolerantes aos inibidores presentes (NIGAM, 2001). O sucesso dessa estratégia conduziria à eliminação da etapa de detoxificação, que impõe custos adicionais ao processo de produção de etanol.

### 2.3 PRODUÇÃO DE ETANOL DE XILULOSE

A reação estequiométrica da fermentação de pentoses para etanol é representada na Equação 2.3. Assim como acontece na fermentação da glicose, o rendimento teórico em etanol é 0,51g.g<sup>-1</sup> açúcar.



A utilização de xilose com aplicação de *S. cerevisiae* selvagem para produção de etanol, requer a isomerização do açúcar para gerar xilulose, assimilável pela levedura. O processo pode ser realizado segundo duas estratégias. A primeira consiste em realizar a isomerização e fermentação separadas de modo a oferecer condições ideais para enzima e levedura. Essa abordagem apresenta uma importante limitação: mesmo glicose isomerase convertendo xilose a xilulose em alta velocidade, a relação de equilíbrio xilose/xilulose normalmente é elevada (da ordem de 5:1). Na segunda estratégia, a isomerização e fermentação são realizadas simultaneamente (LASTICK, 1989; CHANDRAKANT; BISARIA, 2000 (a e b); RAO et al., 2008). Esse processo é limitado pela diferença nas condições ótimas (pH e

temperatura) para isomerização e fermentação. Glicose isomerase disponível comercialmente tem atividade ótima em pH ente 7 e 8 e sua atividade cai bruscamente quando o pH diminui. Já a fermentação geralmente é realizada em pHs entre 4 e 5, para reduzir problemas de contaminação no processo. Além disso, a temperatura do processo é limitada pelo microrganismo, em detrimento à atividade enzimática, cujo máximo situa-se acima de 70°C (TÜKEL; ALAGÖZ, 2008; STRANDBERG; SMILEY, 1971). Nos itens a seguir são destacados aspectos importantes para a compreensão dos dois processos, a isomerização de xilose e a fermentação de xilulose.

### 2.3.1 Características da enzima glicose isomerase

Glicose/xilose isomerase (D-xilose cetol isomerase; CE 5.3.1.5), comumente conhecida como glicose isomerase (GI), é uma das três enzimas mais produzidas no mundo. Catalisa a isomerização reversível da glicose e xilose em frutose e xilulose, respectivamente. A isomerização da glicose em frutose tem importância comercial na produção de xarope de frutose. Esse processo foi desenvolvido primeiro no Japão e mais tarde nos Estados Unidos, onde ganhou importância comercial por causa do alto preço do açúcar importado (BHOSALE et al., 1996). A capacidade da glicose isomerase converter xilose à xilulose é importante na bioconversão de hemicelulose para etanol (GONG et al. 1981; CHANDRAKANT e BISARIA, 2000; RAO, CHELIKANI; VARANASI, 2008).

A maior parte da glicose isomerase disponível no mercado é distribuída na forma imobilizada. A imobilização é uma das maneiras de reduzir o custo de produção, recuperar a enzima de forma eficiente e reutilizá-la várias vezes (BHOSALE et al., 1996).

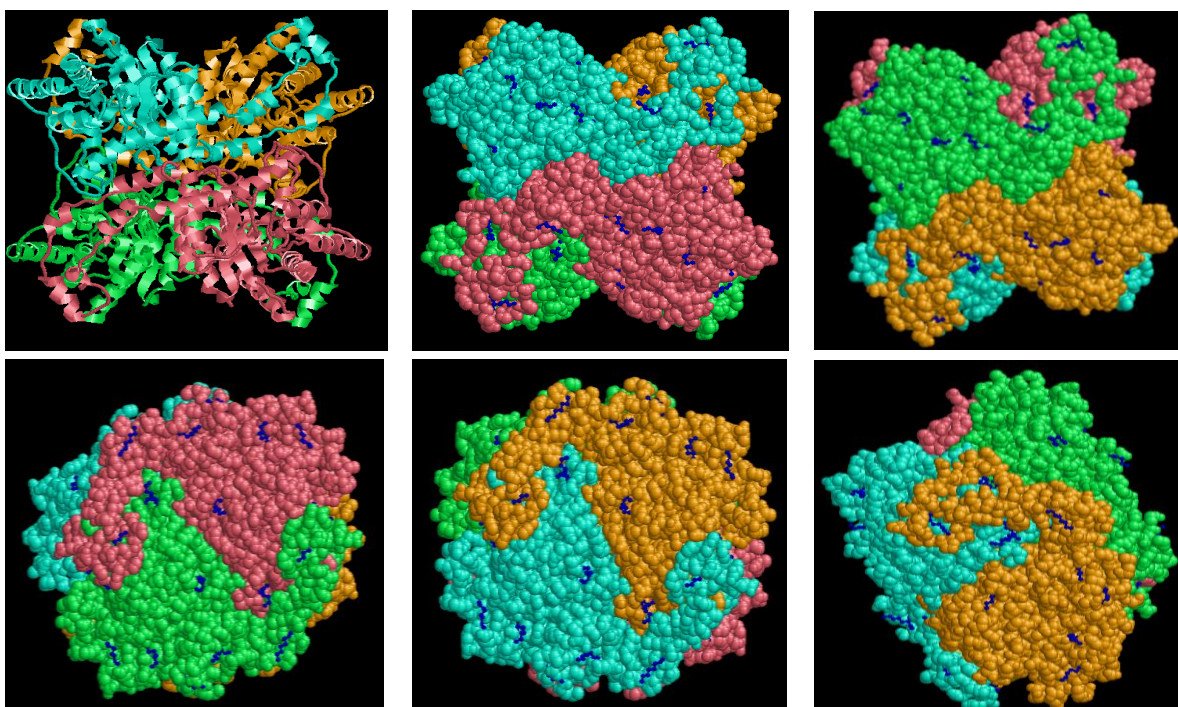
Glicose isomerase exige um cátion divalente, como  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , ou uma combinação destes, para manter máxima atividade e estabilidade. Tanto  $Co^{2+}$ , quanto  $Mg^{2+}$  são essenciais para a atividade, entretanto desempenham papéis diferenciados.  $Mg^{2+}$  é superior a  $Co^{2+}$  como ativador, enquanto este último é responsável pela estabilização da enzima e manutenção da conformação, especialmente a estrutura quaternária da enzima. Por outro lado, a atividade catalítica pode ser inibida por metais como o  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Ni^{2+}$ . Outros inibidores são xilitol, arabitol, sorbitol, manitol, lixose e Tris (BHOSALE et al., 1996).

Na produção industrial de xarope de alta frutose, glicose isomerase imobilizada é amplamente utilizada em reatores do tipo leito fixo operando a pH 7,5-8,0 e temperatura entre 55-60°C, com adição de 5mM de  $Mg^{2+}$  como cofator e estabilizador da enzima e também para abrandar a inibição do cálcio sobre a enzima. O cálcio está presente no processo graças à etapa

anterior de sacarificação enzimática do amido. Nessas condições a enzima imobilizada tem meia vida de aproximadamente 200 dias (SAHA; JORDAN, 2009).

Glicose isomerase tem sido isolada de várias fontes, porém a maioria das enzimas comercializadas atualmente é de origem bacteriana (KRISTO et al. 1996). A enzima de origem bacteriana é tetramérica, com massa molecular de aproximadamente 173 kDa (Figura 2.4), formada por quatro subunidades idênticas com massa molecular próxima a 43 kDa (JANIS et al., 2008).

**Figura 2.4** – Faces da glicose isomerase de *Streptomyces rubiginosus*. Os quatro monômeros da estrutura tetramérica estão representados em turquesa, rosa, verde e laranja. Em azul, os resíduos de lisina.



Fonte: (Protein Data Bank)

De acordo com Janis et al. (2008) glicose isomerase solúvel tem pouca ou nenhuma atividade catalítica a  $\text{pH} \leq 5$ . Nessa faixa de pH ocorre perda reversível dos íons  $\text{Mg}^{2+}$ . Além disso, a complexa estrutura multimérica da enzima é modificada devido à dissociação dos tetrâmeros a trímeros, dímeros e monômeros.

### 2.3.2 Fermentação de xilulose por *S. cerevisiae*

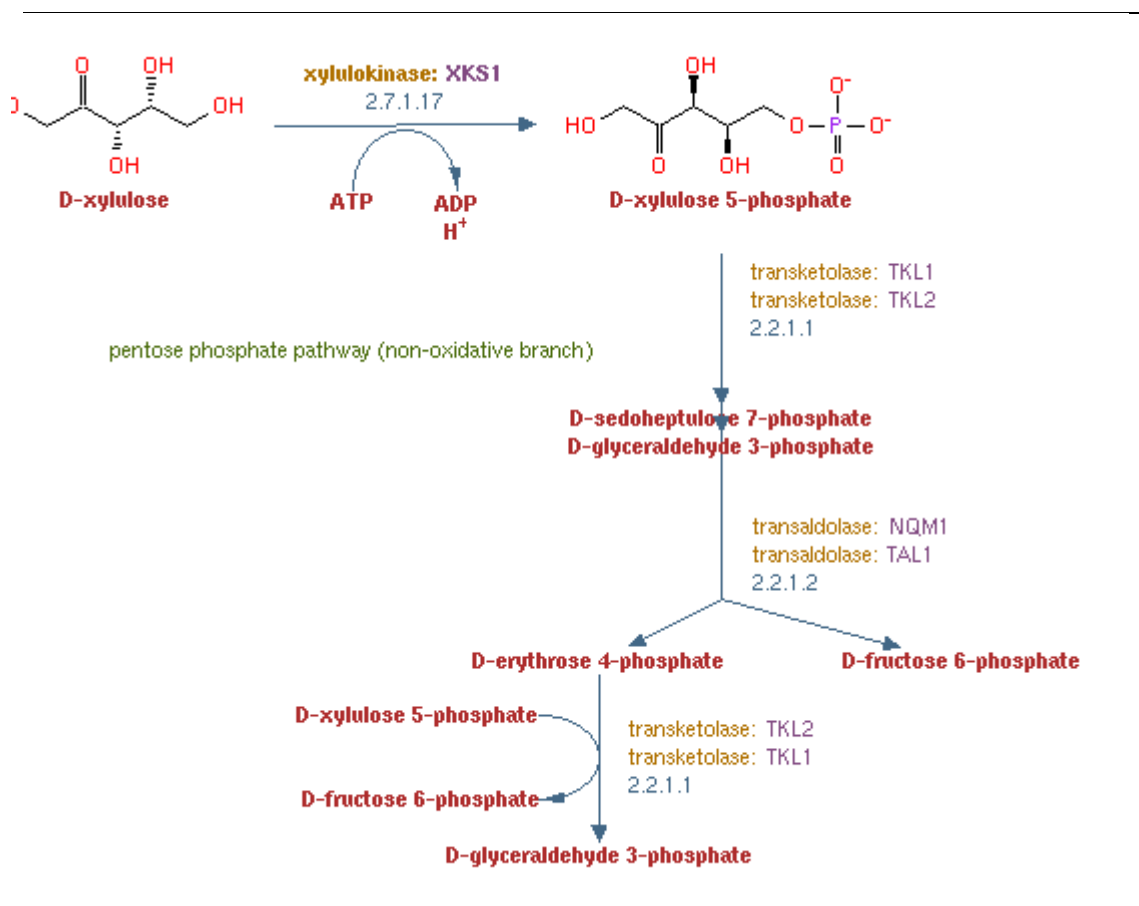
O primeiro passo metabólico para a fermentação é a captação do açúcar através da membrana citoplasmática. Uma vez dentro da célula, xilulose é fosforilada a xilulose 5-fosfato, por ação da enzima xiluloquinase, que é convertido a intermediários da via glicosídica,



como gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato através da via pentose fosfato não oxidativa (Figura 2.5).

Richard et al. (2000) verificaram que a etapa catalisada por xiluloquinase é limitante na fermentação do açúcar. Os tempos de duplicação da linhagem selvagem foram 2 e 34 h em glicose e xilulose, respectivamente. A superexpressão de xiluloquinase na levedura, diminuiu o tempo de duplicação para 12 h, enquanto sua deleção impediu o crescimento em xilulose. A baixa velocidade de fermentação de xilulose por *S. cerevisiae* também tem sido associada ao insuficiente baixo fluxo de metabólitos na via pentose fosfato (JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002).

**Figura 2.5** – Estágios iniciais da fermentação de xilulose em *S. cerevisiae*.



Fonte: BioCyc Database Collection

Em particular, as atividades de duas das enzimas da via pentose fosfato não-oxidativa (transcetolase e transaldolase), tem sido apontadas como limitantes para a fermentação. Essa evidência foi apoiada no significativo acúmulo do metabólito sedoheptulose-7-fosfato durante a fermentação de xilulose realizada por Senac e Hahn-Hägerdal (1990). Transcetolase catalisa a conversão de xilulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato para sedoheptulose-

7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, enquanto transaldolase catalisa a conversão de sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato para frutose-6-fosfato e eritrose-4-fosfato (WALFRIDSSON et al., 1995). Gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato são convertidos a piruvato. Em condições anaeróbicas, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase à acetaldeído, que é reduzido a etanol pela álcool desidrogenase. Em condições aeróbicas piruvato é oxidado através do ciclo de Krebs na cadeia respiratória (CHU; LEE, 2007).

Dentre as principais estratégias descritas na literatura para o processo de produção de etanol a partir de xilose isomerizada por *S. cerevisiae*, destacam-se o uso de elevadas densidades celulares, ajuste da temperatura a valores máximos toleráveis pelo microrganismo e adição de tetraborato de sódio ao meio de isomerização de xilose (YUAN et al., 2011; CHANDRAKANT; BISARIA, 2000b).

Chiang et al. (1981) estudaram a conversão de xilulose a etanol por *S. cerevisiae* comercial utilizado xarope de pentoses (mistura xilose-xilulose) como substrato. Os autores verificaram que a produção de etanol aumentava com a densidade celular. Na temperatura de 37° C e pH 6 a taxa de produção de etanol foi máxima com 150 g de células por litro. Em concentrações de células inferiores a 100g.L<sup>-1</sup> o tempo de fermentação aumentava significativamente. A temperatura ótima foi definida como 35°C, porém pHs entre 4 e 6 conduziram a resultados muito parecidos. Segundo os autores, geração de subprodutos como xilitol e glicerol foi favorecida em pH elevado (6-7) e temperaturas baixas (≤35°C).

Chiang et al. (1982) utilizaram sistema de reatores de leito fixo para converter xilose em xilulose e fermentar xilulose por *S. cerevisiae*, produzindo etanol. Quando as reações foram realizadas separadamente, xilose a 100g.L<sup>-1</sup> resultou em 32g.L<sup>-1</sup> de etanol com uma produtividade de aproximadamente 0,3g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Já a operação em sistema contínuo utilizando glicose isomerase coimobilizada com *S. cerevisiae* produziu menor quantidade de etanol (máximo 11g.L<sup>-1</sup>). Os autores destacaram algumas dificuldades na operação do sistema contínuo, dentre elas, o acúmulo de dióxido de carbono que ocupava uma parte considerável do volume útil do reator e falta de controle do pH do meio reacional sem agitação. A agitação foi considerada essencial para manutenção do pH constante uma vez que o metabolismo da levedura tende a diminuir o pH para valores mais ácidos, que não são ideais para a atividade de glicose isomerase. Nos dois casos, houve produção de xilitol, a qual foi atribuída ao catabolismo de xilose. Os autores consideraram improvável a produção de xilitol a partir de xilulose (como suposto por Gong et al. 1981). Aparentemente, na literatura não há consenso a respeito da formação de xilitol por *S. cerevisiae* em sistemas contendo a mistura xilose-xilulose. Se por um lado a metabolização de xilose como única fonte de carbono em condições

fermentativas é descrita como impossível, como verificado por Gong et al. (1981), por outro a fermentação de xilulose como único substrato tem apresentado rendimento próximo ao teórico (HAHN-HÄGERDAL et al.; 1986; YUAN et al., 2011).

Hahn-Hägerdal et al. (1986) investigaram a influência da aeração, pH, concentração de enzima, massa celular e concentração de azida de sódio, um inibidor da respiração, na produção de etanol e subprodutos a partir de xilose na presença de *S. cerevisiae* e glicose isomerase. As melhores condições operacionais encontradas foram: sistema anaeróbio a pH 6, 10g.L<sup>-1</sup> de enzima, 75g.L<sup>-1</sup> de células e 4,6mM de azida sódica. Sob essas condições, etanol foi produzido com rendimento teórico a partir de 42g.L<sup>-1</sup> xilose, em 24 horas. Em batelada alimentada chegou-se a produzir 62g.L<sup>-1</sup> de etanol a partir de 127g.L<sup>-1</sup> de xilose, com rendimento de 0,49g.g<sup>-1</sup> de açúcar e produtividade de 1,35 g<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Senac e Hahn-Hagerdal (1990) estudaram a fermentação das misturas glicose-xilose (267-267mM) e xilulose-xilose (333-267mM) por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24860 (16 g<sub>cel</sub>.L<sup>-1</sup>) a 30°C e 300 rpm, sob condições anaeróbias em reator batelada. As velocidades de consumo de açúcar foram significativamente distintas: 3,94mMol.g<sub>cel</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para glicose e 0,39mMol.g<sub>cel</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para xilulose. Toda glicose foi consumida em 4 horas, gerando cerca de 500mM de etanol. Por outro lado, aproximadamente 100mM da xilulose restaram em 60 h. Nos dois casos, foram identificados os subprodutos glicerol, xilitol, arabitol além de traços de ácido acético e ácido succínico.

Em relação ao equilíbrio da isomerização de xilose, diversos trabalhos têm destacado que este pode ser deslocado no sentido do produto xilulose mediante a introdução de tetraborato de sódio no meio reacional (YUAN et al., 2011; RAO et al., 2008; CHANDRAKANT e BISARIA, 2000b). Isso é possível porque íons tetrahydroxiborato podem formar complexos com açúcares (HOFFSTETTER-KUHN, 1991). Entretanto, Skoog e Hahn-Hägerdal (1988) destacaram que leveduras não podem fermentar o complexo xilulose-borato, desse modo, o mais conveniente seria realizar a isomerização e fermentação de xilose em duas etapas. Primeiro, em pH elevado, formar-se-ia o complexo xilulose-borato e posteriormente o pH do meio seria diminuído para a dissociação do complexo e fermentação da xilulose. Nesse sentido, Hsiao e colaboradores (1982) estudaram o efeito da adição de tetraborato de sódio na isomerização e fermentação separadas de xilose catalisada por glicose isomerase. Quando xilose 1 M foi isomerizada na presença de várias concentrações de tetraborato de sódio (0-0,5 M) uma conversão máxima de 80% foi observada na razão molar borato/xilose=0,2. Os autores verificaram ainda que temperaturas entre 40 e 69°C e pHs entre 6 e 7,5 tiveram efeito insignificante sobre o equilíbrio quando borato estava presente. Nessas condições, a conversão

de xilose foi aproximadamente 72% para a razão molar borato/xilose=0,1. A presença do borato também afetou a fermentação da xilulose pela levedura. Nessa etapa, a razão molar borato/xilose=0,1 resultou no melhor rendimento em etanol (58% em relação ao açúcar total e 91,6% em relação à xilulose consumida). Na Tabela 2.1 são apresentados os resultados de três experimentos realizados pelos pesquisadores Hsiao et al. (1982).

**Tabela 2.1** – Produção de etanol de xilulose por *S. cerevisiae*

Referência	Xilose <sup>1</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	b/x	Xilulose <sup>2</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Células (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	pH	Temp. (°C)	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	P <sub>ETOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
HSIAO et al., 1982	75	-	14,0	150	24	4,0	35	6,4	0,27
		0,100	53,7	150				22,2	0,92
		0,250	60,0	150				15,2	0,63
YUAN et al., 2011	60	0,125	33,0	100	72	4,5	34	18,2	0,25
		0,125	52,2	200				34	25,0

<sup>1</sup>Concentração de xilose antes da isomerização, x/b, razão molar xilose/borato; <sup>2</sup>xilulose no equilíbrio; P<sub>ETOH</sub>, produtividade volumétrica do etanol.

Na Tabela 2.1 também foram descritos os resultados da fermentação de xilulose por *S. cerevisiae* obtidos por Yuan et al. (2011). No estudo, xilulose foi previamente isomerizada com pellets de glicose isomerase coimobilizada com urease (como descrito por Rao et al., 2008) e adição de tetraborato de sódio numa razão molar borato/xilose=0,125. Dois isomerizados foram preparados. No primeiro, xilose foi isomerizada até 55% e no segundo até 87%. Os autores também avaliaram a fermentação da mistura glicose-xilulose (90-30g.L<sup>-1</sup>). Nas concentrações celulares de 50, 100 e 200g.L<sup>-1</sup>, toda glicose foi consumida em menos de 5 h. Por outro lado, havia xilulose remanescente após 28 horas em todos os ensaios. Azida de sódio (4,6mM) foi adicionada como inibidor respiratório para restringir a formação de xilitol. Como resultado, a formação de subprodutos foi cerca de metade daquela observada sem azida. No entanto, o consumo de xilulose foi ainda mais lento.

Para superar a questão da disparidade dos pHs ótimos para isomerização e fermentação de xilose, Rao et al. (2008) desenvolveram um sistema de isomerização que reúne urease e glicose isomerase coimobilizadas. De acordo com os autores, é possível sustentar um significativo gradiente de pH entre o meio reacional e a região central do pellet por causa da difusão de íons hidrogênio de fora para dentro da partícula, que são neutralizados pela amônia produzida na hidrólise da uréia pela urease. Dessa forma, teoricamente a enzima seria mantida num pH mais elevado no centro do pellet e então catalisaria a isomerização. Após isso, xilulose

difundiria a partir do pellet para a fermentação no meio reacional. Além disso, os pesquisadores adicionaram tetraborato de sódio no meio reacional como forma de alterar o equilíbrio para a formação de xilulose. A isomerização de xilose  $60\text{g.L}^{-1}$  com  $5,2\text{g.L}^{-1}$  de glicose isomerase, a pH 7,5 e  $34^{\circ}\text{C}$  resultou em  $9\text{g.L}^{-1}$  e  $30\text{g.L}^{-1}$  de xilulose, na ausência e presença de tetraborato de borato (0,05 M), respectivamente. Utilizando o co-imobilizado, os resultados foram semelhantes. A isomerização a  $34^{\circ}\text{C}$  e pH 4,5, favorável a fermentação, com 0,01 M de uréia e borato 0,05 M resultou em xilulose a  $17\text{g.L}^{-1}$ . Aumentando a concentração do coimobilizado de 5,2 para  $36\text{g.L}^{-1}$  a concentração do produto aumentou para  $44\text{g.L}^{-1}$ .

## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

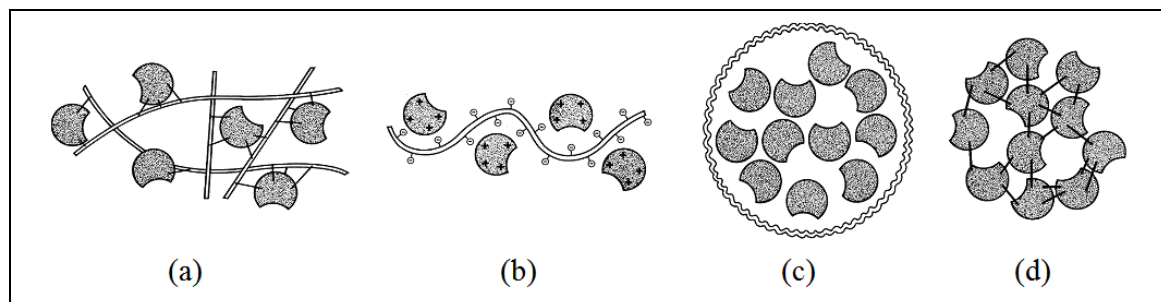
O processo de imobilização de uma enzima consiste no confinamento desta em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso. A imobilização é conseguida mediante contato do suporte com a célula ou enzima, sob condições controladas. As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; MIELENZ; 2009):

- ✓ Aumento da estabilidade térmica;
- ✓ Aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas;
- ✓ Facilidade de separação entre catalisador e produto após a reação;
- ✓ Possibilidade de reutilização sem perda significativa da atividade catalítica.

As principais desvantagens do processo de imobilização são: alteração da conformação natural da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização.

Na Figura 2.6 são ilustrados os principais métodos de imobilização de enzimas: ligação covalente, adsorção, confinamento ou encapsulação e entrecruzamento ou ligação cruzada. Em cada uma dessas técnicas os mecanismos de interação enzima-suporte são diferentes.

**Figura 2.6** – Principais métodos de imobilização de enzimas (a) Ligação Covalente; (b) Adsorção; (c) Encapsulação; (d) entrecruzamento



Fonte: MIELENZ (2009)

As técnicas de imobilização se diferenciam pelo modo de interação enzima-suporte. No método de ligação covalente, os suportes são especialmente funcionalizados para conter um grupamento químico que será responsável pela imobilização da enzima ao suporte (SCHMIDELL et al., 2001). Esta técnica de imobilização envolve a formação de ligações covalentes entre o biocatalisador e material de suporte. A ligação normalmente é formada entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e aminoácidos residuais da superfície da enzima. Uma série de grupos funcionais dos aminoácidos é adequada para participação na formação de ligação covalente. Os envolvidos com mais frequência são o grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) da lisina, grupo carboxila ( $\text{CO}_2\text{H}$ ) do ácido aspártico e ácido glutâmico, o grupo hidroxila ( $\text{OH}$ ) da serina ou treonina e o grupo ( $\text{SH}$ ) da cisteína. A escolha do método de reação é importante, se inadequada pode promover inativação da enzima pela reação com aminoácidos residuais do sítio ativo (MIELENZ, 2009).

Um sistema de imobilização e estabilização muito estudado foi desenvolvido por Guisán (1988). Consiste na ligação de grupos amina da enzima a grupos aldeído adequadamente introduzidos na superfície de um suporte poroso, como gel de agarose, por ativação. Quando são efetivadas em número adequado, essas ligações tornam a molécula da enzima mais rígida, protegendo-a de perdas de atividades causadas por alterações conformacionais em sua estrutura tridimensional provocadas por efeito de calor, solventes e íons presentes no meio de reação. No entanto, existem proteínas que não dispõem de número suficiente de lisinas em regiões acessíveis. Nesse caso, uma possibilidade factível é realizar a aminação de grupos carboxílicos de aminoácidos como ácidos glutâmico e aspártico da superfície da enzima com etilenodiamina, conforme descrito por Lopez-Gallego et.al (2005).

Na imobilização por encapsulamento, ocorre um confinamento físico onde enzimas e/ou células são mantidas no interior de esferas, cujo envoltório é constituído por um polímero geliforme e semipermeável. As proteínas não devem transpassar a cápsula, mas

substratos e produtos devem passar livremente através da membrana. Caso os produtos de reação se acumulem devido à dificuldade de difusão, problemas como a ruptura da membrana podem ocorrer (MIELENZ, 2009). Segundo Schmidell *et al.* (2001) os materiais mais usados para formação de partículas de gel são os polímeros naturais carragenana, alginato e pectina.

#### **2.4.1 Suportes para imobilização de enzimas**

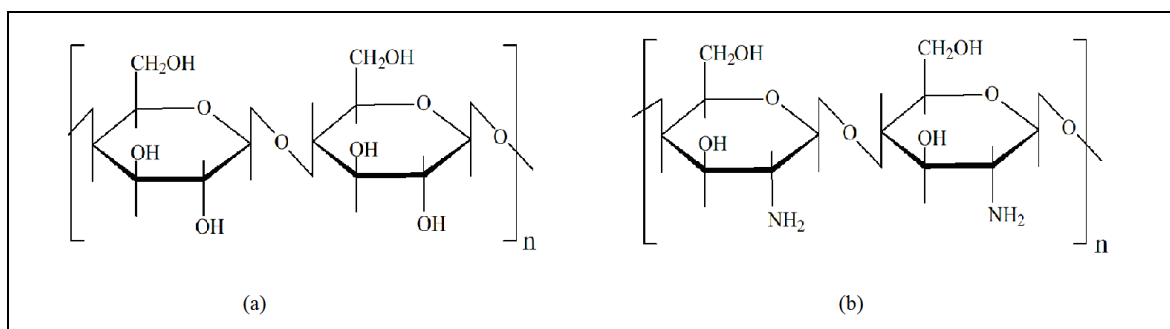
Suportes para imobilização podem ser naturais ou sintéticos. Dentre os naturais destacam-se celulose, agar, quitina, bentonita e quitosana, alginato e colágeno. Dentre os sintéticos, poliestireno, poliacrilato, polivinílico, sílica, aluminossilicatos e o náilon (SCHMIDELL *et al.* 2001). A decisão sobre o tipo de suporte para imobilização exige uma avaliação da aplicação do biocatalisador. A escolha é influenciada por aspectos como (MIELENZ; 2009):

- ✓ Propriedades físicas do suporte: rigidez, área superficial disponível, forma, grau de porosidade, volume dos poros, permeabilidade, densidade, entre outras;
- ✓ Características químicas, tais como hidrofiliabilidade e grupos funcionais disponíveis para modificação;
- ✓ Características de estabilidade do suporte podem influenciar no armazenamento e regeneração da atividade do biocatalisador;
- ✓ Custo do suporte, impacto ambiental e viabilidade de preparação em escala industrial.

Os itens a seguir apresentam uma breve descrição de dois interessantes suportes utilizados na imobilização de enzimas.

#### **2.4.2 Quitosana**

A quitosana, um polissacarídeo abundante e barato, é um suporte muito interessante para imobilização de enzimas. Este biomaterial catiônico é produzido por desacetilação da quitina, um polímero presente na parede celular dos fungos e das conchas de moluscos (principalmente caranguejo, camarão, lagosta, entre outros), resíduos da indústria de processamento de frutos do mar. Quimicamente, a quitosana possui uma estrutura molecular semelhante à celulose, diferenciando-se nos grupos funcionais (Figura 2.7). Grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura da celulose assim como grupos amino (NH<sub>2</sub>) na da quitosana. A quitosana é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras da celulose (BERGER *et al.*, 2004).

**Figura 2.7** – Estrutura primária da (a) celulose e (b) quitosana

Fonte: (MAJETI; KUMAR, 2000).

Em pH básico, os grupos amina da quitosana estão descarregados (pKa 6,5) e os polímeros são insolúveis em meio aquoso, formando um gel (GAN; WANG, 2007). Quitosana contém uma alta densidade de grupos de amina primária que podem ser diretamente ativados com glutaraldeído. Grupos aldeído produzidos após a ativação com glutaraldeído são muito reativos, e podem imobilizar as enzimas, após ligação com apenas um grupo amina da proteína. Esta alta reatividade do glutaraldeído torna o processo de imobilização fácil e rápido. No entanto, não é esperado um aumento significativo na estabilidade térmica da enzima (MANRICH et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; ADRIANO et al., 2008).

### 2.4.3 Agarose

Agarose é um polímero de galactose produzido por purificação do agar obtido a partir de algas marinhas vermelhas. Devido à sua biocompatibilidade, tem sido muito utilizada como uma matriz de imobilização das células e enzimas e veículo de liberação de drogas. Além disso, o gel de agarose é muito utilizado em análise de moléculas de DNA e proteínas através de eletroforese. Agarose forma hidrogéis através de agregações intermoleculares por mudanças térmicas. As propriedades dos hidrogéis formados podem ser controladas com as condições de gelificação ou até mesmo por mistura com polímeros sintéticos (KONG; MOONEY, 2005).

Agarose é descrita como uma excelente matriz para imobilização de enzimas e tem sido extensivamente estudada (BLANCO et al., 1989; GIACOMINI et al., 1998; PEDROCHE et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008). Além de apresentar elevada porosidade, possui caráter hidrófilo e é de fácil derivatização. No entanto, uma limitação importante no uso de agarose é o custo elevado (KONG; MOONEY, 2005).



## 2.5 APLICAÇÕES DE REATORES CONTÍNUOS EM BIOPROCESSOS

Diversos estudos têm descrito o uso de sistemas contínuos em bioprocessos. Um caso de sucesso é a aplicação na indústria farmacêutica na produção de proteínas instáveis que se degradam rapidamente no caldo de cultura. Nesse caso, o uso de reatores contínuos possibilita a geração de produtos de elevada qualidade, pois o tempo de residência no reator é minimizado (KONSTANTINOV, 2011). Outra aplicação muito pesquisada é a produção de etanol usando leveduras imobilizadas e biorreatores de diferentes configurações, dentre eles o do tipo tanque agitado (CSTR – *Continuous Stirred-Tank Reactor*) e o de leito fixo também conhecido como reator de fluxo pistonado (PFR – *Plug Flow Reactor*) (BRETHAUER; WYMAN, 2010). A literatura relata que essa última configuração de reator tem se tornado muito popular devido às características como baixos custos de produção e operação e facilidade de automação do processo (GÖKSUNGUR; ZORLU, 2001).

No CSTR de mistura perfeita, a composição no reator é homogênea e idêntica àquela do fluxo de saída. No PFR ideal, a corrente contendo os reagentes escoava através do reator e a reação prossegue à medida que o fluido se desloca ao longo do leito, assumindo-se que a difusão na direção axial e a variação de concentração na direção radial sejam desprezíveis (BRETHAUER; WYMAN, 2010).

Em um sistema de fermentação operando em modo contínuo, o substrato é constantemente alimentado para o reator ao mesmo tempo que um fluxo correspondente de caldo fermentado é descarregado, de modo a manter o volume do reator constante. Além disso, o equilíbrio entre a alimentação e descarga é mantido durante períodos suficientemente longos para que o estado estacionário seja atingido (BRETHAUER; WYMAN, 2010).

Como sugerido acima, a produtividade do sistema é usada como critério de desempenho importante para o processo. Este parâmetro depende de vários fatores, incluindo concentração de substrato, concentração de células e taxa de diluição (inverso do tempo de retenção do líquido no reator). A escolha do ponto de operação (taxa de diluição) é feita de forma a manter conversão quase completa do substrato e maximizar a produtividade, para evitar a perda de substrato ou a necessidade de reciclo da corrente efluente. De modo geral, sistemas de reatores contínuos associados em série têm desempenho superior ao de um único vaso para reações autocatalíticas como o crescimento de células, onde há inibição pelo produto (GOOIJER et al., 1996). A associação também permite reduzir significativamente o volume total do sistema para reatores tipo CSTR. No quadro II destaca-se uma série de aplicações que fazem uso de reatores contínuos.

Quadro II – Exemplos de usos dos reatores contínuos

Tipo de reator	Aplicação	Microorganismos	Principal resultado	Fonte
CSTR	Tratamento de águas residuais da indústria petroquímica e refinarias de petróleo	<i>A. caviae</i> , <i>B. cereus</i> , <i>O. intermedium</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>Rhodococcus</i> sp.	Redução no nível de hidrocarboneto contaminantes de 320 mg L <sup>-1</sup> para 8 mg L <sup>-1</sup>	(GARGOURI et al., 2011)
CSTR e PFR combinados	Produção de etanol partir de caldo de sorgo sacarino AR inicial 240g.L <sup>-1</sup>	<i>S. cerevisiae</i> NP 01	Produção de etanol: 106g.L <sup>-1</sup> , na taxa de diluição de 0,007 h <sup>-1</sup> . Rendimento 0,50g.g <sup>-1</sup> e produtividade 0,76g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	(KHONGSAY et al., 2010)
CSTRs em serie	Produção sequencial de ácido láctico e xilitol a partir de hidrolisado de hemicelulose	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Debaryomyces hansenii</i>	Produtividade: 2,9g. L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> e 0,218 g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> para ácido láctico e xilitol, respectivamente	(SALGADO et al., 2012)
CSTR	Biolixiviação de metais em lodo de tratamento de águas residuais de curtume	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Solubilização de Cr (49%), Cd (63%), Cu (71%) e Zn (80%)	(DROGUI et al., 2005)
PFR, três reatores em série	Produção de etanol por SSF de amido de mandioca AR inicial 163g.L <sup>-1</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> de panificação	Produtividade do etanol: 5,9g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> , com conversão do substrato de 97% e rendimento de 81% do teórico	(GIORDANO et al., 2008)
PFR, três reatores em série	*Produção de etanol por SSF de amido de mandioca AR inicial 154g.L <sup>-1</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> de panificação	Produtividade do etanol de 11,7g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> , com 97% de conversão do substrato e rendimento de 92% do teórico	(TROVATI et al., 2009)
CSTR, quatro reatores em série	Produção de etanol por SSF de amido de mandioca contendo borra da liquefação	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CHFY0321	Produtividade volumétrica, concentração final e rendimento de etanol: 2,41g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ; 86,1g.L <sup>-1</sup> e 91%, respectivamente.	(MOON et al., 2012)
PFR	Produção de etanol a partir de hexoses e pentoses utilizando culturas mistas geneticamente modificadas	<i>Escherichia coli</i> AFF01/pLOI297 e <i>Escherichia coli</i> CT1101/pLOI297	Produção do etanol: 34g.L <sup>-1</sup> com rendimento próximo aos 90% do teórico e produtividade de 2,2g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> . Cerca de 92% do açúcar foi consumido.	(UNREAN; SRIENC, 2010)

AR: concentração de açúcares redutores totais, SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas. \*A massa molar do substrato e o tamanho das partículas do biocatalisador foram reduzidas para em realção ao estudo anterior (GIORDANO et al., 2008).

### 2.5.1 Células imobilizadas na produção de etanol

Como já destacado no decorrer desta revisão, a produção de etanol a partir de fontes renováveis vem atraindo interesse mundial. Independentemente do substrato selecionado, a viabilidade econômica e o consumo de energia do processo são fatores importantes. Nesse cenário, parte da pesquisa tem sido direcionada para a produção de etanol por meio de cultivos contínuos empregando microrganismos imobilizados (GÖKSUNGUR; ZORLU, 2001). Sistemas que usam células imobilizadas se destacam por apresentarem muitas vantagens técnicas e econômicas sobre aqueles que empregam células livres (PRASAD; MISHRA, 1995; RAKIN et al., 2009):

- ✓ Aumento da estabilidade da levedura, devido à menor inibição provocada por concentrações elevadas do substrato;
- ✓ Diminuição dos custos do processo devido à facilidade de recuperação e reutilização de células e separação de produto;
- ✓ Aumento da produtividade volumétrica e facilidade de controle do processo.

Contudo, estudos descritos na literatura indicam que a eficiência destes sistemas pode ser comprometida, chegando a ser inferior àquela apresentada pelo sistema equivalente operando com células livres. A principal razão para isso é que as células no interior das partículas podem se tornar inativas, devido à privação de nutrientes essenciais ou ao acúmulo de produtos em concentrações inibitórias (PRASAD; MISHRA, 1995).

Dentre as diferentes técnicas de imobilização de células, o aprisionamento em gel de alginato de cálcio tem sido um dos mais utilizados, devido à sua simplicidade e característica não tóxica. Esta técnica de imobilização envolve a adição gota a gota da suspensão de células em alginato de sódio em uma solução de cloreto de cálcio, onde as células são imobilizadas em gel de alginato de cálcio precipitado sob a forma de pellets (partículas esféricas) (ROSEVEAR, 2008). Uma grande vantagem dessa metodologia de imobilização de células é a elevada densidade local de células que pode ser alcançada (WESTMAN et al., 2012).

Tem sido demonstrado que o aprisionamento de células de levedura melhora o desempenho fermentativo em hidrolisados lignocelulósicos intoxicados por produtos de degradação oriundos de etapas de pré-tratamento. Esse ganho justifica-se pela elevada concentração local de células, que possibilita a relação inibidor/célula tornar-se pontualmente inferior e, assim, as células lidam melhor com a toxicidade do hidrolisado (TALEBNIA;

TAHERZADEH, 2006). Alguns exemplos de uso de células de levedura imobilizadas descritos na literatura são resumidos a seguir.

A fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* de hidrolisados lignocelulósicos contendo compostos de degradação provenientes de tratamento com ácido foi estudada por Talebnia e Taherzadeh (2006). O nível de toxicidade do licor permitiu que células livres fermentassem continuamente numa taxa de diluição de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . Em 50 horas as células perderam 75% da viabilidade. Por outro lado, a encapsulação protegeu as células contra os inibidores presentes no hidrolisado. Nesse caso, a fermentação foi possível a taxas de diluição de até  $0,5 \text{ h}^{-1}$  e houve manutenção da viabilidade celular em níveis superiores a 75% em 21 dias de ensaio. Como resultado, um rendimento de etanol de  $0,44 \text{ g.g}^{-1}$  foi verificado.

A produção de etanol a partir de um hidrolisado hemicelulósico de milho contendo  $71,8 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose foi investigada usando *Saccharomyces cerevisiae* recombinante imobilizada em alginato de cálcio (ZHAO; XIA, 2010). De acordo com os autores, a fermentabilidade do licor previamente desintoxicado foi significativamente melhorada utilizando células imobilizadas. Após 72 horas de ensaio em batelada, a concentração e o rendimento do etanol foram  $31,1 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,41 \text{ g.g}^{-1}$ , respectivamente. Cinco bateladas repetidas foram realizadas e nesses experimentos a concentração de etanol foi mantido acima de  $30,1 \text{ g.L}^{-1}$  com o rendimento de etanol na faixa de  $0,39 \text{ g.g}^{-1}$ .

Giordano et al. (2008) estudaram a fermentação alcoólica contínua de xarope liquefeito de farinha de mandioca utilizando levedura de panificação e glicoamilase encapsuladas em gel de pectina. No estudo, avaliou-se o desempenho do sistema composto por três reatores de leito fixo operando em série. Como resultado, a produtividade e o rendimento do etanol foram  $5,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e 83%, respectivamente, com conversão de 94% de açúcares redutores totais.

Em continuidade ao trabalho de Giordano et al. (2008), Trovati e colaboradores (2009) reduziram ainda mais a massa molar do substrato e o tamanho das partículas do biocatalisador. Como resultado, a produtividade do etanol foi elevada para  $11,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , com 97% de conversão dos açúcares redutores totais e rendimento em etanol de 92% do teórico. Os pesquisadores mantiveram o sistema operando durante 45 dias. Nesse período a viabilidade celular foi mantida em no mínimo 80%.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

SUPORTES E ATIVADORES: foram utilizados como suportes para a imobilização os géis de quitosana com 85% de desacetilação adquirida da Polymar S. A. (Ceará, Brasil), agarose 4% (Sephacrose™ 4BCL) da Agarose Bead Technologies (Madri, Espanha) e alginato de sódio (Vetec/São Paulo, Brasil). Os reagentes empregados na ativação dos suportes foram: glutaraldeído 25% (Vetec/São Paulo, Brasil) e glicidol (Sigma-Aldrich/St. Louis, EUA). N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) e etilenodiamina (EDA) (Sigma-Aldrich/St. Louis, EUA) foram usados para aaminação enzimática. Demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

ENZIMAS: para a preparação do derivado imobilizado em quitosana utilizou-se a enzima glicose isomerase solúvel (E.C. 5.3.1.5, D-xilose cetol isomerase), comercialmente disponível como GENSWEET SGI, produzida por *Streptomyces rubiginosus*, cedida pela Genencor Internacional (Califórnia, EUA), cuja atividade medida a 60°C e pH 7 era 3400 UI.mL<sup>-1</sup>. Para alguns estudos comparativos utilizou-se a enzima glicose isomerase imobilizada GENSWEET IGI-HF cuja atividade medida a 60°C e pH 7 era 900 UI.g<sup>-1</sup>.

MICRORGANISMO: levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* (Itaiquara®, Brasil) comercializada na forma prensada com aproximadamente 70% de umidade.

SUBSTRATOS: Frutose (Synth/São Paulo, Brasil) foi utilizada como substrato para a dosagem da atividade da glicose isomerase. Nos experimentos de simultânea isomerização e fermentação utilizou-se xilose comercial (Sigma-Aldrich/St. Louis, EUA) e licor rico em xilose obtido por tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

O bagaço de cana com teor de umidade próximo aos 50%, proveniente da Usina Iracema (Iracemópolis – São Paulo), foi cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba – São Paulo).

#### 3.2 MEIOS DE SIF

Os meios utilizados na simultânea isomerização e fermentação de xilose são apresentados na Tabela 3.1. Dentre os descritos, A, B, C e D foram usados com a finalidade de avaliar o desempenho da levedura de panificação, em termos da produção de etanol, em diferentes meios, incluindo meios complexos, contendo extrato de levedura e/ou peptona de

soja e meio mínimo. Já os meios E e F foram preparados utilizando como substrato o hidrolisado de hemicelulose obtido por tratamento ácido do bagaço de cana *in natura*. Os hidrolisados foram enriquecidos com xilose comercial e demais componentes do meio D de modo a igualar as concentrações iniciais. Sais de magnésio e cobalto foram adicionados à formulação como agentes de ativação/estabilização da enzima glicose isomerase. da Uma descrição detalhada da preparação dos hidrolisados está disponível no item 3.2.1, abaixo.

Após a preparação, os meios de SIF foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm.

**Tabela 3.1** – Composição dos meios utilizados na simultânea isomerização e fermentação de xilose

Composição	pH	Meio A <sup>a</sup>	Meio B	Meio C	Meio D	Meio E <sup>b</sup>	Meio F <sup>c</sup>
Xilose, g.L <sup>-1</sup>	6,0	120	120	120	120	120	120
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , g.L <sup>-1</sup>	6,0	10	10	10	10	10	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, g.L <sup>-1</sup>	6,0	4	4	4	4	4	4
Extrato de levedura, g.L <sup>-1</sup>	6,0	10	10	-	-	-	-
Soytone, g.L <sup>-1</sup>	6,0	10	-	10	-	-	-
Ureia, g.L <sup>-1</sup>	6,0	3	3	3	3	3	3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, g.L <sup>-1</sup>	6,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O, g.L <sup>-1</sup>	6,0	4	4	4	4	4	4
Kamoran <sup>d</sup> , ppm	6,0	8	8	8	8	8	8

NOTA: <sup>a</sup>adaptado de Chandrakant et al. (2000), <sup>b</sup>meio composto por hidrolisado de hemicelulose obtido por tratamento ácido do bagaço de cana *in natura* acrescido de xilose e nutrientes do meio D, <sup>c</sup>hidrolisado neutralizado com Ca(OH)<sub>2</sub>, <sup>d</sup>hidrolisado tratado por fervura e supercalagem com Ca(OH)<sub>2</sub>, <sup>d</sup>Kamoran: antibiótico comumente utilizado na indústria sucroalcooleira, fornecido pela Química Real<sup>®</sup>

Como as partículas de biocatalisador apresentavam uma elevada quantidade de água (~84%), sua adição ao meio de fermentação promovia um efeito de diluição. De fato, as concentrações dos componentes descritos na Tabela 3.1 eram reduzidas praticamente à metade no início da SIF, uma vez que se utilizava 1g de biocatalisador para cada 1mL de meio.

### 3.2.1 Obtenção do caldo hidrolisado de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi submetido a tratamento ácido mantendo-se suas características físicas originais. Não foram realizadas operações de peneiramento, secagem ou redução de granulometria. Como o bagaço era mantido sob refrigeração a - 20°C, aguardava-se que este atingisse a temperatura ambiente antes de proceder-se a determinação da sua umidade.

Para a obtenção do hidrolisado de hemicelulose aplicou-se as melhores condições de tratamento descritas por Fogel et al. (2005), que utilizaram planejamento estatístico para otimizar a hidrólise ácida do bagaço de cana no sentido de maximizar a separação de hemicelulose na forma de açúcares monoméricos. Assim, no atual estudo, a biomassa foi submetida a tratamento com ácido sulfúrico 3% (v/v), aplicando-se uma relação sólido/líquido 1:4 (m/v). A umidade da biomassa foi considerada nos cálculos de relação sólido/líquido. O tratamento foi realizado em autoclave a 121°C durante 40 minutos. Ao final do tempo de reação, o recipiente contendo o material tratado foi resfriado em água corrente. A fração líquida foi extraída por compressão manual do material. O experimento foi realizado em triplicata, variando-se a quantidade de bagaço submetido ao tratamento (Tabela 3.2).

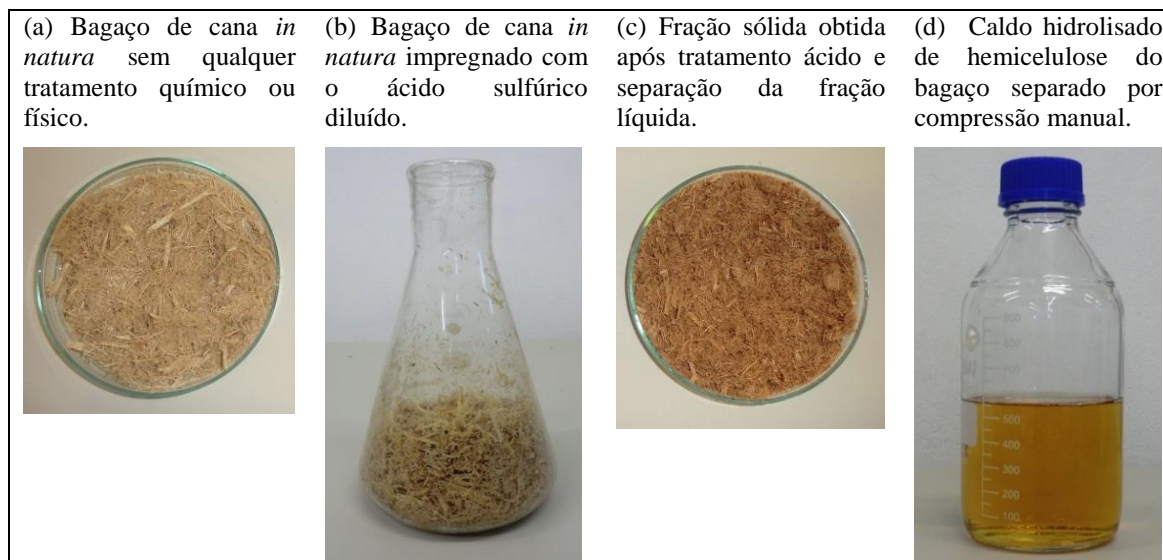
**Tabela 3.2** – Características do tratamento ácido do bagaço de cana *in natura*.

<b>Ensaio</b>	<b>MBU (g)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>MBS (g)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3% (mL)</b>
1	54,7	54%	25	70,3
2	300,0	47%	159	495,0
3	600,0	47%	318	990,0

NOTA: condições do tratamento: 121°C por 40 minutos em autoclave. MBU: massa de bagaço úmido e MBS: massa de bagaço seco.

Os recipientes usados para a extração da hemicelulose do bagaço eram vidrarias típicas usadas em laboratório. Foram utilizados recipientes de 1, 6 e 20 litros para o tratamento de 54,7 g, 300 g e 600 g de bagaço, respectivamente. Como a matéria-prima apresenta baixa massa específica, grandes volumes úteis são requeridos para o tratamento de maiores quantidades. Imagens obtidas durante o tratamento do bagaço de cana estão dispostas na Figura 3.1:

**Figura 3.1** – Imagens obtidas durante no decorrer do tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico a 3% (razão sólido/líquido 1:4) em autoclave a 121 °C por 40 minutos.



Fonte: arquivo pessoal.

Após filtração sob vácuo para remoção de sólidos suspensos presentes no hidrolisado, este foi caracterizado mediante quantificação das concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e lignina solúvel conforme descrito nos itens 3.3.7, 3.3.8 e 3.3.9.

Uma fração do hidrolisado resultante foi neutralizada com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  até pH 6,0 e outra parte foi submetida a detoxificação conforme descrito a seguir.

#### 3.2.1.1 Detoxificação do hidrolisado ácido de hemicelulose

Para diminuir a concentração dos compostos inibidores da fermentação gerados durante o tratamento ácido do bagaço, o hidrolisado de hemicelulose foi tratado por fervura durante 15 minutos e supercalagem com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  até pH 10, conforme descrito por (NIGAM, 2001). Em seguida, os sólidos insolúveis foram removidos por filtração sob vácuo. O hidrolisado foi reacidificado com ácido sulfúrico 2N até pH 6,0 e filtrado novamente.

#### 3.2.1.2 Preparação do meio de SIF contendo hidrolisado de hemicelulose

Em um balão volumétrico de 100mL adicionou-se 50mL do hidrolisado de hemicelulose no pH 6 e acrescentou-se as massas adequadas de xilose e dos nutrientes suficientes para preparar um “licor” com as concentrações do meio D (descrito no item 3.2). Por fim, o balão foi avolumado com água destilada e utilizou-se o meio final para o ensaio de SIF.



### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi verificada colorimetricamente por método enzimático utilizando um kit comercial contendo glicose oxidase e peroxidase (Laborlab, Brasil). Uma curva de calibração de glicose foi usada como referência.

#### 3.3.2 Determinação da concentração de proteína

A dosagem de proteína no extrato comercial GENSWEET SGI e no meio reacional de imobilização (sobrenadante) foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Albumina bovina cristalina foi usada como padrão para construção da curva de calibração.

#### 3.3.3 Eletroforese

A presença de proteínas no extrato enzimático GENSWEET SGI foi avaliada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

#### 3.3.4 Medida de atividade de glicose isomerase

A atividade de GI foi determinada medindo-se a velocidade inicial de conversão de frutose à glicose (LADISCH et al., 1977). Frutose 2 M foi preparada em tampão tris-maleato 50mM pH 7, contendo  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (50mM) e  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  (2,5mM). A reação era iniciada pela adição da enzima, convenientemente diluída, a 5mL de solução de frutose a 60 °C. Em intervalos regulares de reação (5, 10 e 15 minutos), recolhia-se uma amostra do meio reacional para quantificação da glicose formada. Cem microlitros do meio reacional eram adicionadas a 100  $\mu$ L de HCl 20% (v/v) para inativação da enzima (LIM; SAVILLE, 2007). A concentração de glicose foi determinada colorimetricamente utilizando o kit enzimático comercial contendo glicose oxidase e peroxidase, conforme descrito no item 3.3.1. Uma unidade (UI) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1  $\mu$ mol de glicose por minuto sob as condições de ensaio descritas anteriormente. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação 3.1:

$$\text{Atividade (UI.mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\Delta P / \Delta t) \times V_R}{MM_{\text{glic}} \times V_E} \times D \quad \text{Equação 3.1}$$

Sendo:

$\Delta P/\Delta t$  – Coeficiente angular da reta do produto *versus* tempo de reação [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ];

$V_R$  – Volume reacional [mL];

$V_E$  – Volume da solução/suspensão enzimática [mL];

$MM_{\text{glc}}$  – Massa molar da glicose [ $0,180 \text{ mg}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ ];

D – diluição da solução/suspensão enzimática.

### 3.3.5 Determinação de umidade

As medidas de umidade foram realizadas utilizando a Balança Determinadora de Umidade (Marte<sup>®</sup> – modelo ID50). O equipamento era provido de um programa de secagem automática no qual a amostra era seca até que não houvesse variação de peso. Nesse momento, o equipamento automaticamente informava o final do processo e o respectivo valor em% de umidade do material analisado.

### 3.3.6 Análise de composição do bagaço de cana *in natura*

A análise composicional do bagaço de cana foi feita em duplicata de acordo com o método padrão do NREL (National Renewable Energy Laboratory – U. S.) (SLUITER et al., 2010). Amostras de bagaço com umidade inferior a 10% foram peneiradas através de uma tela de 20 mesh (0,5mm) em um moinho de facas. Cerca de 3 g da amostra moída foi extraída sequencialmente com água e etanol a 96% durante 6 horas (cada extração) num aparelho Soxhlet. Os extrativos foram pesados após evaporação do solvente e bagaço livre de extrativos em água e etanol foi hidrolisado com ácido sulfúrico a 72%, a 30°C, durante 1 h (300mg de amostra e 3mL de ácido sulfúrico). O ácido então foi diluído por adição de 84mL de água e a mistura foi mantida em autoclave a 121°C e 1 atm durante 1 h. O material residual foi resfriado e filtrado através de um filtro de vidro poroso. Os sólidos foram secos até peso constante a 105°C para determinar o teor de lignina insolúvel. A concentração de lignina solúvel no filtrado foi determinada colorimetricamente. As concentrações de açúcares monoméricos na fração líquida foram determinadas por cromatografia. Os monossacáridos presentes nos hidrolisados foram convertidos em percentagem de polissacarídeo, ou seja, glicose a glicana, xilose a xilana e arabinose a arabinana. Os fatores usados para converter monômeros de açúcar para seus respectivos polímeros foram de 0,90 para glicose e 0,88 para xilose e arabinose. O teor de acetil foi calculado como a concentração de ácido acético multiplicado por 0,7. Esses fatores foram calculados com base na adição de água aos polissacarídeos durante a hidrólise. O teor de cinzas foi determinado por combustão controlada.

### 3.3.7 Quantificação de carboidratos e ácidos orgânicos

Açúcares e ácidos orgânicos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu SCL-10A equipado com detectores de índice de refração e de UV-visível. Para a quantificação de xilose e xilulose utilizou-se a coluna Aminex HPX-87C (300×7,8mm; BIO-RAD) utilizando água ultra pura como fase móvel num fluxo de 0,6mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 80°C. Já a identificação e quantificação dos produtos de fermentação (alcoóis e ácidos orgânicos) e dos açúcares presentes no hidrolisado de bagaço de cana foram realizadas utilizando a coluna Aminex HPX-87H (300×7,8mm; BIO-RAD), cuja fase móvel era H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005mol.L<sup>-1</sup> na vazão de 0,6mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 45°C. Antecedendo às análises, realizava-se uma etapa de filtração. Amostras de caldo fermentado eram filtradas em membranas de 0,2 µm. Já as amostras oriundas de tratamento de bagaço eram filtradas em cartucho de extração em fase sólida Sep-Pak<sup>®</sup> C-18 (Waters), para remoção de derivados da lignina e outros produtos de degradação.

### 3.3.8 Quantificação de furfural e hidroximetilfurfural

A quantificação dos compostos furfural e hidroximetilfurfural nas amostras de hidrolisado de hemicelulose foi feita por CLAE utilizando cromatógrafo Shimadzu SCL-10A equipado com coluna C-18 (Beckman) conectada ao detector de UV-visível (Waters – 486) a 274 nm. A fase móvel era acetonitrila/água 1:8 em ácido acético 1% (v/v) na vazão de 0,8mL.min<sup>-1</sup> e temperatura de 30°C. Antecedendo à determinação, realizava-se a filtração das amostras em membrana de 0,2 µm.

### 3.3.9 Quantificação de lignina solúvel em hidrolisado de hemicelulose

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro (JACKSON et al., 2009). O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 3.2.

$$C_{\text{lignina}} = 4,187 \cdot 10^{-2} (A_t - A_{\text{pd}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad \text{Equação 3.2}$$

onde:  $C_{\text{lignina}}$  – concentração de lignina solúvel, em g.L<sup>-1</sup>;  $A_t$  – absorvância, em 280 nm, da solução de lignina associada aos produtos de degradação dos açúcares (furfural e HMF);  $A_{\text{pd}}$  –  $c_1\varepsilon_1 + c_2\varepsilon_2$  - absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição furfural e HMF (cujas

concentrações  $c_1$  e  $c_2$  devem ser determinadas previamente).  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  são as absorvidades dos dois compostos, respectivamente, 146,85 e 114,00  $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ .

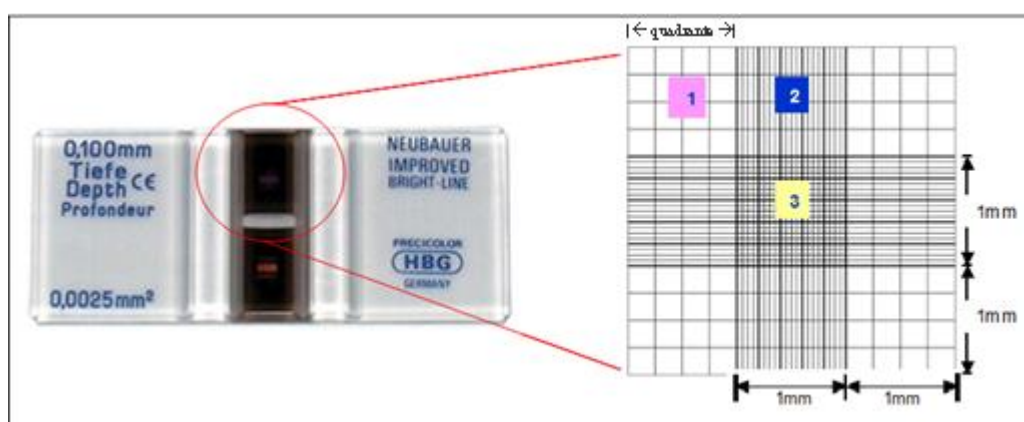
### 3.3.10 Análise da viabilidade e concentração celular

A viabilidade de *S. cerevisiae* foi avaliada utilizando-se o método de tingimento das células com azul de metileno. Suspensões de células adequadamente diluídas eram carregadas sobre uma câmara de Neubauer e procedia-se à contagem com auxílio de microscopia óptica. Um Microscópio Olympus BX 50 capaz de produzir ampliações de imagem da ordem de 100 a 1000 vezes foi usado para a análise. O equipamento estava conectado a um sistema de captura e armazenamento de imagens, permitindo a geração de um banco de dados, fato que possibilitava uma análise posterior à aquisição dos resultados (MORAES, 2013).

Para a análise da viabilidade de células imobilizadas em alginato de cálcio, inicialmente procedia-se a dissolução dos pellets em solução de citrato de sódio 8% (m/v), sob agitação magnética e temperatura ambiente. Nessa etapa, preparava-se uma suspensão contendo cerca de 25 mg de pellet.mL<sup>-1</sup> de solução.

Após a dissolução dos pellets, a suspensão resultante era sequencialmente diluída em água e corante azul de metileno e procedia-se a observação de células viáveis (não coradas) e não viáveis (tingidas de azul) por microscopia. A Figura 3.2 apresenta uma ampliação da câmara de Neubauer.

**Figura 3.2** – Detalhes da câmara de Neubauer utilizada para contagem de células. Dimensões do quadrante: profundidade: 0,1mM e largura 1mM



A contagem de células de levedura era realizada nos quadrantes do tipo 1, enquanto a contagem de células bacterianas, eventualmente presentes no caldo fermentado, era

feita no quadrante 3. Cada um dos quadrantes (1, 2 e 3) apresenta volume de  $10^{-4}$ mL. O quadrante 1 está subdividido em 16 campos de volume  $6,25 \times 10^{-6}$ mL enquanto o quadrante 3 é dividido em 400 campos de volumes individuais de  $2,5 \times 10^{-7}$ mL.

A viabilidade celular é definida como sendo a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas num espaço definido da câmara de contagem. Como descrito na Equação 3.3, a viabilidade celular foi expressa como sendo: a média da viabilidade verificada no total de 16 campos  $\pm$  desvio padrão.

$$\text{Viabilidade e (\%)} = (\overline{x/y} \pm \text{D.P.}) \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde:  $x$  – Número de células viáveis presentes no campo  $i$  (para  $i$  variando de 1 até 16), [células];  $y$  – Número de células totais presentes no campo  $i$  (para  $i$  variando de 1 até 16), [células] e  $\overline{x/y}$  – Representa a média da viabilidade de 16 campos.

### 3.3.11 Coloração Gram

A classificação das bactérias contaminantes do processo fermentativo, feita por reações de Gram, foi procedida de acordo com a metodologia descrita por Tortora et al. (2003). O processo consistiu nas seguintes etapas:

- ✓ Confecção do esfregaço: primeiramente colocou-se uma gota de água sobre uma lâmina de vidro. Com a alça de platina, retirou-se uma pequena porção da cultura de células, misturando-a a gota a fim de obter-se uma suspensão uniforme. Espalhou-se, de modo a formar-se um esfregaço fino. Em seguida, a preparação foi seca e afixada à placa por aproximação desta à chama do bico de gás. Esperou-se o resfriamento da lâmina;
- ✓ Coloração 1: cobriu-se o esfregaço com o corante cristal-violeta durante 60 segundos. Em seguida, o corante foi removido com um esguicho de água. Após isso, o esfregaço foi coberto com lugol durante 60 segundos;
- ✓ Lavagem: o esfregaço foi sequencialmente lavado com água, etanol 95% e água;
- ✓ Coloração 2: na etapa final, safranina foi adicionada como contracorante por 60 segundos;
- ✓ Lavagem e secagem: a lâmina foi lavada com água e seca próxima à chama do bico de gás;
- ✓ Caracterização: a lâmina foi examinada por microscopia.

### **3.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.4.1 Preparação do suporte glutaraldeído-quitosana**

Quitosana ativada com glutaraldeído foi preparada de acordo com Budriene et al., (2005). Quitosana em pó 2% (m/m) foi solubilizada em ácido acético 2% (v/v) e homogeneizada por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução homogênea foi aquecida e mantida a 50°C. Para cada 1mL de solução de quitosana, adicionava-se 1,5mL de KOH 0,5M, mantendo-se sob agitação durante 30 minutos. A ativação do suporte foi realizada mediante a adição de 0,8% (v/v) de glutaraldeído. Transcorridos 30 min de ativação a 50°C, procedeu-se imediatamente à lavagem do gel com excesso de água destilada à temperatura ambiente até a neutralização do mesmo. Procedeu-se à imobilização da enzima logo após a preparação do suporte.

#### **3.4.2 Preparação do suporte glioxil-agarose**

Agarose 4B CL foi ativada com glicidol para obtenção de glioxil-agarose. Inicialmente, 52,5 g do suporte foi lavado com água destilada em abundância e seco sob vácuo. Após esta etapa, adicionou-se 15mL de água destilada ao gel e a suspensão resultante foi mantida sob suave agitação em banho de gelo. Em paralelo, preparou-se 25mL de NaOH 1,7 M e adicionou-se 0,7125 g de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), em banho de gelo. Esta solução foi agregada à suspensão do suporte que era mantida a agitação suave. Adicionou-se gota a gota, 18mL de glicidol. A suspensão foi mantida sob agitação mecânica em recipiente aberto por 16 h, à temperatura ambiente, para a liberação de  $\text{H}_2$  formado no meio reacional. O suporte ativado foi lavado com água destilada até pH neutro e seco sob vácuo. Após isso, 10 g do gel foram suspensos em 100mL de água destilada e adicionou-se 50  $\mu\text{moles}$  de metaperiodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) por grama de suporte. Manteve-se sob agitação suave por 2 horas. O suporte foi então filtrado, lavado com água destilada estocado a 4 °C (GUISÁN, 1988).

#### **3.4.3 Aminoação da enzima glicose isomerase**

A aminoação da enzima glicose isomerase (conforme química da aminoação apresentada na Figura 3.3) foi realizada adotando-se a metodologia descrita por López-Gallego et al. (2005). Primeiramente, determinou-se a concentração de etilenodiamina (EDA), que visualmente gerava menos precipitação da proteína em solução. Para isso, preparou-se um conjunto de soluções da enzima glicose isomerase solúvel na concentração de 1,1 mg de proteína por mL, diluída em etilenodiamina (250mM - 1M) a pH 4,75. De posse da informação



A imobilização foi finalizada logo após 20 horas (maioria dos experimentos). Ao final da imobilização os derivados foram reduzidos com borohidreto de sódio (1 mg.mL<sup>-1</sup> de suspensão) durante 30 min. Ao final, os derivados obtidos foram lavados em filtro sob vácuo com tampão tris-maleato 200mM, pH 7, água destilada e tampão tris-maleato, 50mM, pH 7, para remoção de enzima residual e do borohidreto de sódio, obtendo-se um derivado em pH neutro (Montes et al., 2006). O derivado (denominado como IGI-Ch: *Immobilized Glucose Isomerase in Chitosan*) foi armazenado a 4°C em tampão tris-maleato pH 7 acrescido do conservante benzoato de sódio (0,1%).

### 3.4.5 Imobilização glicose isomerase em glioxil-agarose

A imobilização da glicose isomerase foi realizada em tampão bicarbonato 25mM e pH 10 para uma relação suporte/suspensão final de 1:10 (m/v). A suspensão contendo solução enzimática e o suporte foi mantida em suave agitação. Como a solução de enzima aminada apresentava baixa concentração de proteína (~1,1 mg.mL<sup>-1</sup>), a imobilização em alta carga no suporte foi realizada num processo de 5 ciclos de modo a oferecer ao final do processo 44 mg de proteína por grama de suporte. Após cada ciclo removia-se o sobrenadante por filtração sob vácuo e adicionava-se uma nova solução enzimática. Alíquotas do meio reacional eram retiradas ao final de cada ciclo para a quantificação de proteína. Após 4,5 h o processo de imobilização foi encerrado com a adição de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de borohidreto de sódio à suspensão. A mistura foi mantida sob agitação moderada por 30min. Após esse período, procedeu-se a lavagem e filtração do derivado com água estilada e tampão fosfato 25mM e pH 7. Por fim, media-se a atividade do derivado em solução de frutose 1M contendo 50mM de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e CoCl<sub>2</sub> 2,5mM a 55°C (a mudança na temperatura da reação foi necessária devido a limitações do laboratório onde o estudo foi realizado). O derivado obtido (denominado IGI-Aga, *Immobilized Glucose Isomerase in Agarose*) foi estocado a 4°C.

### 3.4.6 Caracterização do derivado IGI-Ch

#### 3.4.6.1 Efeito do pH e da temperatura

A atividade de glicose isomerase solúvel (SGI) e imobilizada em quitosana (IGI-Ch) foi determinada a diferentes temperaturas (30-90°C, pH 7) e pHs (5-9, a 60°C) e expressa como uma percentagem da atividade máxima obtida. O substrato era constituído por solução de frutose 2M, contendo MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (50mM) e CoC<sub>12</sub>·6H<sub>2</sub>O (2,5mM), que será intitulado como “padrão”.



#### 3.4.6.2 Estabilidade térmica

Quantidades iguais de glicose isomerase solúvel e imobilizada foram mantidas a 80°C, em solução tampão tris-maleato 50mM, contendo 50mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 2,5mM de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , a pH 7. As atividades residuais das enzimas foram determinadas ao longo do tempo em condições padrão (item 3.3.4).

#### 3.4.6.3 Efeito do etanol sobre a atividade enzimática

As atividades glicose isomerase solúvel e imobilizada no meio padrão, na presença de diferentes concentrações de etanol (0, 30 e 70g.L<sup>-1</sup>) foram determinadas a pH 5, 35°C e 150 rpm.

#### 3.4.6.4 Ensaio de reciclo para IGI-Ch

A atividade do derivado IGI-Ch foi avaliada após três bateladas repetidas de isomerização de frutose nas condições do protocolo padrão de medida de atividade de GI (item 3.3.4). Após cada batelada, o derivado era recuperado e lavado com solução tampão tris-maleato 50mM a pH 7.

#### 3.4.6.5 Isomerização de xilose em meio de SIF

Avaliou-se o desempenho da enzima solúvel e do derivado IGI-Ch na reação de isomerização de xilose 60g.L<sup>-1</sup>, em solução contendo  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2g.L<sup>-1</sup>),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,1g.L<sup>-1</sup>),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5g.L<sup>-1</sup>), soytone (5g.L<sup>-1</sup>) de levedura, extrato de levedura (5g.L<sup>-1</sup>),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2g.L<sup>-1</sup>), ureia (1,5g.L<sup>-1</sup>) e o antibiótico Kamoran (4 ppm). A reação foi realizada a 30°C e pH 5, sob agitação de 150 rpm. Amostras foram recolhidas em diferentes tempos de reação para quantificação de xilose e xilulose.

#### 3.4.6.6 Estabilidade de GI em condições SIF de xilose

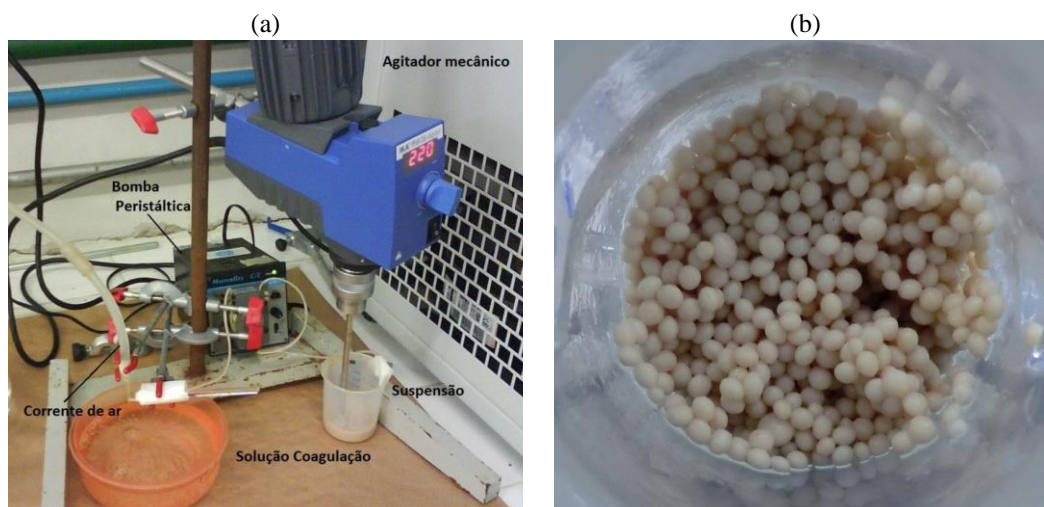
Quantidades iguais de GI solúvel e imobilizada foram adicionadas a frascos contendo diferentes concentrações de etanol (0, 30 e 70g.L<sup>-1</sup>) em meio de SIF a pH 5, nas concentrações descritas no item 3.4.6.5. As atividades residuais foram determinadas em condições padrão (item 3.3.4) para diferentes tempos de incubação e expressas como uma porcentagem da atividade inicial.

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

O processo de coimobilização da glicose isomerase imobilizada e levedura de panificação em alginato de cálcio foi iniciado com a preparação de uma solução de alginato de sódio em solução tampão, com auxílio de agitação mecânica. A concentração final do alginato era 1% em relação à massa total de suspensão de enzima e células a ser preparada. Nos estudos iniciais, utilizou-se tampão acetato de sódio 50mM a pH 6,0 para solubilização do alginato de sódio. Após a homogeneização, adicionava-se quantidades calculadas de levedura e enzima imobilizada, de modo a perfazer a concentração definida de enzima e de células por grama de biocatalisador. Após mistura sob agitação mecânica, a suspensão aquosa contendo células e a enzima imobilizada foi uniformizada por passagem em peneira de uso doméstico.

O sistema montado para coimobilização de enzima/levedura era composto por um agitador mecânico, mangueiras de silicone, bomba peristáltica e aspersor de ar comprimido, suporte e garras (Figura 3.4). A suspensão final contendo enzima, levedura e alginato, mantida sob agitação, foi gotejada em solução de  $MgCl_2$  e  $CaCl_2$  (0,25 M), mediante uso de uma bomba peristáltica capaz de produzir gotas de pequeno diâmetro (1,0-2,0mM) sob a ação de uma corrente de ar comprimido que acelerava o gotejamento dos pellets. A vazão da bomba foi ajustada de modo a permitir um gotejamento cadenciado e inibir a formação de fluxo contínuo (esguicho). O fluxo de ar foi ajustado visualmente, verificando-se os tamanhos dos pellets produzidos. Após a obtenção, as partículas foram recuperadas por filtração, transferidas para uma solução de cura e armazenadas em geladeira a 4 °C durante a noite. Nos estudos iniciais utilizou-se  $MgCl_2$  e  $CaCl_2$  (ambos 0,25 M) como meio de cura. Entretanto, no decorrer dos experimentos decidiu-se proceder à cura dos pellets no próprio meio de fermentação (sem xilose). Dessa forma, evitava-se a diminuição do pH inicial do meio de SIF, fato que comumente ocorria após cura em solução de  $MgCl_2$  e  $CaCl_2$ . Uma imagem do biocatalisador produzido é apresentada na (Figura 3.4).

**Figura 3.4** – Preparação do biocatalisador composto por GI immobilizada e levedura de panificação coimobilizadas em alginato de cálcio. (a) Aparato utilizado na preparação. (b) Pellets obtidos após coimobilização de IGI-Ch e levedura Itaiquara®



Fonte: arquivo pessoal.

Uma série de biocatalisadores foi preparada com variações na relação enzima/levedura oferecidas para coimobilização (Tabela 4.3). No primeiro conjunto preparado, a concentração de enzima immobilizada IGI-Ch foi mantida em 5% ( $\text{g}_{\text{enzima}} \cdot \text{g}^{-1}$  biocatalisador) enquanto a concentração de levedura variava entre 2 e 16%. No segundo conjunto, a concentração de células em massa seca (cms) foi mantida em 4% ( $\text{g}_{\text{cms}} \cdot \text{g}^{-1}$  biocatalisador), enquanto a carga de IGI-Ch variava desde 5% até o limite físico de coimobilização (38%). Além destes, foram preparados mais dois biocatalisadores: um com concentrações de IGI-Ch e levedura intermediárias entre as descritas anteriormente e outro contendo glicose isomerase immobilizada em glioxil-agarose. A preparação destes dois últimos envolveu a adição de  $\text{CaCO}_3$  como componente do biocatalisador. Este sal foi agregado à formulação como tentativa de solucionar um problema diagnosticado nos experimentos preliminares de SIF de xilose: o pH do meio caía ao longo do ensaio, chegando a valores nos quais a enzima glicose isomerase se tornava inativa. Portanto, era fundamental utilizar recursos capazes de manter o pH do meio de fermentação superior a 5,0 durante o tempo da batelada. Nas preparações onde havia adição de  $\text{CaCO}_3$ , a dissolução do alginato de sódio era feita em tampão fosfato 50mM a pH 8,0 pois este diminuía a solubilidade do sal, evitando a coagulação antecipada da suspensão.

**Tabela 3.3** – Composição dos biocatalisadores preparados por coimobilização de GI imobilizada e levedura de panificação em alginato de cálcio.

<b>Biocatalisador (enzima/levedura)</b>	<b>Enzima (%,g·g<sup>-1</sup>biocat.)</b>	<b>Levedura (%, g<sub>cms</sub>·g<sup>-1</sup>biocat.)</b>	<b>Alginato (%,g·g<sup>-1</sup>biocat.)</b>	<b>CaCO<sub>3</sub> (%,g·g<sup>-1</sup>biocat.)</b>
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:2)	5	2	1	-
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:4)	5	4	1	-
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:8)	5	8	1	-
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:16)	5	16	1	-
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:4)	20	4	1	-
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4)	38	4	1	-
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)	20	10	1	0,5
IGI-Aga/ <i>S. cerevisiae</i> (5:10)	5	10	1	0,5

### 3.4.8 Simultânea isomerização e fermentação de xilose em reator batelada

Uma série de experimentos de SIF de xilose (Tabela 3.4), em batelada, aplicando-se os biocatalisadores descritos no item 3.4.7 foi realizada no sentido de definir concentrações de enzima e de levedura mais adequadas para um bom desempenho da SIF e avaliar a influência da composição do meio. Essa avaliação incluiu a análise de parâmetros como: rendimento, produtividade e seletividade ao etanol.

Os experimentos foram conduzidos em tubos falcon fechados contendo 8mL de volume ocupado (4g do biocatalisador em 4mL de meio), a 35°C e 150 rpm. Em intervalos de tempo regulares tubos individuais eram recolhidos e procedia-se a medida de pH e quantificação de açúcares e produtos no sobrenadante.

**Tabela 3.4** – Ensaio de simultânea isomerização e fermentação de xilose

<b>Biocatalisador (enzima/levedura)</b>	<b>Meio de SIF</b>
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:2)	A
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:4)	A
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:8)	A
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:16)	A
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:4)	A
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4)	A/B/C
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)	D
IGI-Aga/ <i>S. cerevisiae</i> (5:10)	D
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)	E
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)	F

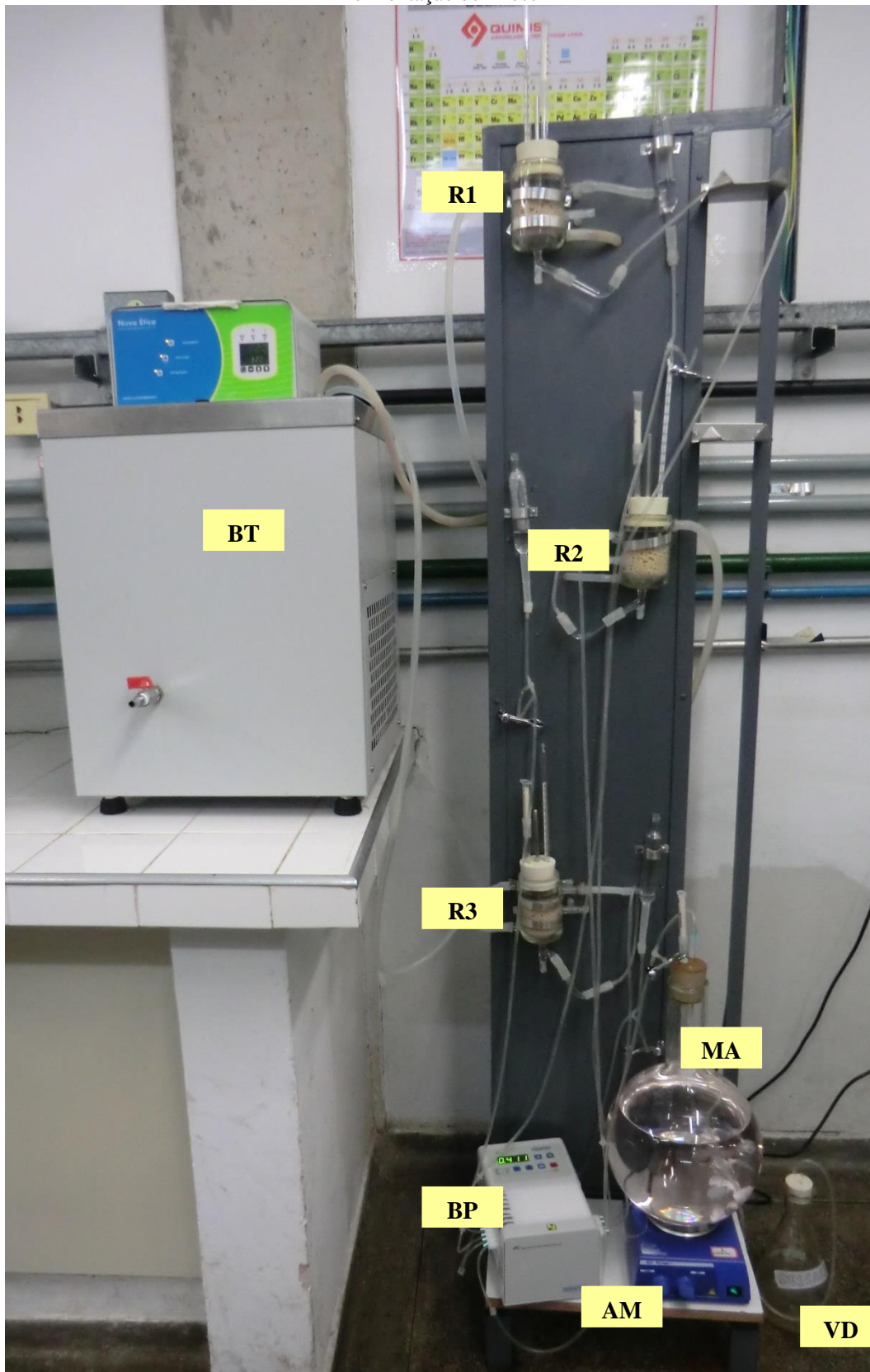
### **3.4.9 Viabilidade da levedura de panificação a diferentes temperaturas**

O biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10) foi empregado em bateladas repetidas de simultânea isomerização e fermentação de xilose com o objetivo de se avaliar a viabilidade da levedura em diferentes temperaturas (32, 35 e 37°C) por períodos prolongados. O conhecimento desse comportamento do microrganismo é essencial para uma escolha adequada da temperatura de fermentação em modo de operação contínua. O meio D descrito no item 3.2 foi utilizado nos ensaios. Os reatores (todos falcon com volume útil de 50mL) contendo inicialmente 4,0 g biocatalisador e 4,0mL de meio reacional foram incubados, em banho estático, nas temperaturas descritas anteriormente. A cada 24 horas monitorava-se o pH, removia-se cerca de 25 mg de pellets para avaliação da viabilidade celular e também trocava-se o meio fermentado por 4,0mL do meio de SIF (meio D). O experimento foi mantido por aproximadamente 30 dias.

### **3.4.10 Simultânea isomerização e fermentação da xilose em operação contínua**

O estudo da simultânea isomerização e fermentação de xilose em modo contínuo foi realizado no sistema composto por três reatores de leito fixo, conectados em série, conforme ilustrado na Figura 3.5. Essa configuração foi utilizada com sucesso na sacarificação e fermentação simultâneas de amido de mandioca por Giordano (1992) e Trovati (2002).

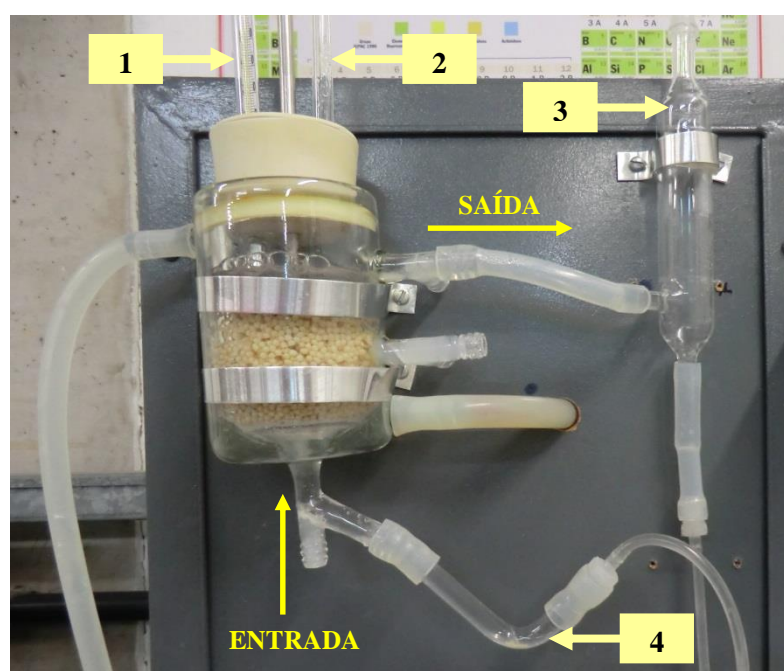
**Figura 3.5** – Imagem do sistema de reatores contínuos utilizado nos ensaios de simultânea isomerização e fermentação de xilose



NOTA: R1, R2, R3: reatores, BP: bomba peristáltica, MA: meio de alimentação, AM: agitador magnético, VD: vaso para descarte de meio fermentado, BT: banho termostático.  
Fonte: arquivo pessoal.

Cada reator de vidro apresentava volume útil de 100mL, sendo dotado de camisa que permitia o controle da temperatura (Figura 3.6). No interior do reator, os pellets (50 g do biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10)) ficavam confinados entre duas telas de aço inox. A tampa do reator consistia de uma rolha de borracha dotada de dois orifícios. Em um deles inseria-se um termômetro e o segundo permitia a saída do CO<sub>2</sub> formado. O tubo coletor de vidro conectado à saída do reator servia como reservatório para a bomba peristáltica e permitia também a liberação do CO<sub>2</sub> produzido.

**Figura 3.6** – Imagem do reator contínuo utilizado na SIF de xilose.



NOTA: 1. termômetro, 2. saída de CO<sub>2</sub>, 3: tubo coletor de meio, 4. tubo em L para depósito de sedimentos. Fonte: arquivo pessoal.

A entrada referente à alimentação de meio estava localizada na parte inferior do reator, enquanto o efluente escoava através de uma abertura lateral (vertedouro) situada na parte superior. Antecedendo a entrada do reator havia um tubo em L onde ficavam depositados os sedimentos provenientes do reator. Esse tubo impedia a entrada dos sedimentos na mangueira de alimentação, cujo pequeno diâmetro favorecia entupimentos. O efluente do sistema era bombeado até um vaso de descarte tampado, dotado de uma saída para eliminação do CO<sub>2</sub> (Figura 3.6).

O meio de SIF contendo xilose ( $\sim 65\text{g.L}^{-1}$ ) e demais nutrientes do meio D (metade da concentração descrita no item 3.2) a pH 5,6 era alimentado através de uma bomba peristáltica multicanal capaz de manter uma vazão constante das correntes de entrada e saída

dos reatores. A temperatura inicial e o tempo de residência do ensaio, 32°C e 11 horas, respectivamente, foram definidos tomando-se como referência os resultados obtidos nos ensaios descontínuos. A vazão do sistema era monitorada mediante coleta do efluente do reator durante um curto intervalo de tempo (cerca de 10 minutos).

O desempenho do sistema foi avaliado mediante monitoramento do pH do efluente e consumo de substrato ao longo do tempo. Amostras do efluente também eram submetidas à microscopia óptica para verificação das células presentes. Os produtos da SIF eram quantificados por CLAE.

No início e no final do experimento determinava-se a viabilidade celular após dissolução dos pellets em citrato de sódio 8%.

Em paralelo ao primeiro ensaio contínuo, realizou-se um ensaio ‘controle’ descontínuo, em *shaker* a 150 rpm, com o mesmo biocatalisador e as mesmas condições de temperatura e pH iniciais do ensaio contínuo.

Foram realizados três ensaios de SIF de xilose no modo contínuo. Cada ensaio foi realizado no sentido de agregar conhecimento ao tema, uma vez que ensaios de SIF de xilose em operação contínua praticamente não são descritos na literatura. Ao longo dos ensaios, as limitações do sistema foram identificadas e discutidas no sentido de propor soluções às dificuldades detectadas. As alterações testadas incluíram: tratamento ácido da levedura de panificação como etapa precedente à preparação do biocatalisador, aumento na concentração de antibióticos presentes no meio de alimentação e inclusão de um sistema de adição de solução de NaOH 0,1-0,5M ao reator para correção do pH.

Os antibióticos utilizados foram: *Kamoran*, *Kamoran WP*, *Corstan*, *HJ Gold* (utilizados na indústria sucroalcooleira e fornecidos pela Química Real®), cloranfenicol e ampicilina.

#### 3.4.10.1 Tratamento ácido da levedura

A levedura de panificação foi submetida a tratamento ácido no sentido de eliminar possíveis bactérias contaminantes. Para isso, 60 g da biomassa de levedura úmida foram suspensas em 170mL de água destilada estéril. Ácido sulfúrico a 2 N foi adicionado à suspensão de células até se atingir pH 2,0. Na etapa seguinte, a suspensão foi mantida a 30 °C sob agitação de 70 rpm durante 45 minutos. Transcorrido esse tempo, procedia-se à correção de pH do fermento até pH 6,0 e lavagem com o mesmo tampão utilizado na coimobilização (DORTA, 2006). Finalmente, centrifugava-se e se obtinha uma massa de células pronta para coimobilização.



### 3.5 METODOLOGIAS DE CÁLCULOS

#### 3.5.1 Cálculo dos parâmetros de imobilização

Para avaliar a eficiência dos procedimentos de imobilização descritos nos itens 3.4.4 e 3.4.5, foram estimados os parâmetros rendimento em proteína e em enzima, assim como a atividade recuperada, conforme descrito a seguir.

Rendimento de imobilização em proteína  $Y_p$  (%): foi calculado após a determinação da quantidade de proteína que desapareceu no sobrenadante, levando em consideração a diluição da solução enzimática oferecida para imobilização devido à adição do suporte, de acordo com a equação 3.6.

$$Y_p (\%) = \left( 1 - \frac{(PS_{tf})d}{PB_{tf}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.3}$$

Rendimento de imobilização em unidades de enzima –  $Y_{UI}$  (%): foi calculado de uma forma semelhante a  $Y_p$ , levando em consideração a inativação da enzima devido às condições de imobilização (medida no branco), de acordo com a equação 3.7.

$$Y_{UI} (\%) = \left( 1 - \frac{(ES_{tf})d}{EB_{tf}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.4}$$

Sendo:  $PS_{tf}$  e  $ES_{tf}$  – concentração de proteína e unidades de enzima, respectivamente, no sobrenadante no tempo final da imobilização

$PB_{tf}$  e  $EB_{tf}$  – concentração de proteína e unidades de enzima, respectivamente, no branco (controle) no tempo final da imobilização

$d$  – fator de diluição - (volume da solução de enzima a imobilização + volume de água presente na massa de suporte adicionada)/volume de solução de imobilização de enzimas.

Atividade Recuperada RA (%): foi calculada após a determinação da atividade da enzima imobilizada  $A_{der}$  (IU.g<sup>-1</sup>der), comparando-a com as unidades de enzima teoricamente imobilizada ( $A_t$ ), pela equação 3.8 (RODRIGUES et al., 2008):

$$RA(\%) = \left( \frac{A_{der}}{A_t} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde:  $A_t$  – Atividade teoricamente imobilizada (IU.g<sup>-1</sup> de suporte), representa a atividade esperada no derivado, calculada considerando a fração imobilizada ( $Y_{iu}$ ) do total de enzima oferecida (IU.g<sup>-1</sup> de suporte).

### 3.5.2 Desempenho da hidrólise ácida do bagaço de cana

O tratamento ácido do bagaço de cana *in natura* foi avaliado mediante análise de parâmetros do processo. O rendimento em xilose ( $Y_{xil}$ ), a eficiência de extração da xilose ( $\eta_{ext}$ ) e a eficiência de recuperação da xilose ( $\eta_{rec}$ ) foram calculados de acordo com as equações 3.1, 3.2 e 3.3, respectivamente (CANETTIERI et al., 2007). De maneira análoga calculou-se  $Y$ ,  $\eta_{ext}$  e  $\eta_{rec}$  para os demais constituintes do hidrolisado.

$$Y_{xil} = \frac{C_{xil} \cdot V}{M_{bag}} \quad \text{Equação 3.6}$$

$$\eta_{ext} = \frac{Y_{xil}}{M_{xil}} \times 100 \quad \text{Equação 3.7}$$

$$\eta_{rec} = \frac{C_{xil} \cdot V_{rec}}{M_{xil} \cdot \eta_{rec} \cdot M_{bag}} \times 100 \quad \text{Equação 3.8}$$

Sendo:

$Y_{xil}$  – Rendimento em xilose [g de xilose.g<sup>-1</sup> de bagaço seco];

$C_{xil}$  – Concentração de xilose no hidrolisado, determinada por HPLC [g.L<sup>-1</sup>];

$V$  – Volume usado para o tratamento =  $V_{\text{água}} + V_{\text{ácido}}$  [L];

$M_{bag}$  – Massa inicial de bagaço seco usado no tratamento ácido [g].

$\eta_{ext}$  – Percentual de extração de xilose [%];

$M_{xil}$  – Quantidade de xilose presente no bagaço, determinado por análise da composição química [g de xilose.g<sup>-1</sup> de bagaço seco];

$\eta_{rec}$  – Eficiência de recuperação de xilose [%];

$V_{rec}$  – volume de hidrolisado recuperado [mL];

### 3.5.3 Cálculo dos parâmetros da SIF

Além do rendimento, outros parâmetros são utilizados para avaliar o desempenho de um processo fermentativo. Geralmente são utilizados dois tipos de produtividade: produtividade volumétrica ( $g_{\text{etanol}} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ) e produtividade específica ( $g_{\text{etanol}} \cdot g_{\text{biomassa}}^{-1} \cdot h^{-1}$ ). A produtividade volumétrica é função da quantidade de células usadas na fermentação. O processo com alta densidade celular aumenta a produtividade volumétrica, porém aumenta os custos com aquisição de biomassa. Já a produtividade específica, mede a

eficiência do microrganismo, ou seja, uma produtividade específica mais alta significa que uma quantidade reduzida de biomassa é requerida na etapa de fermentação, sendo, portanto um parâmetro importante na comparação de espécies.

Na planta de produção de etanol com *S. cerevisiae*, a fermentação de sacarose e amido geralmente alcança 90–95% do rendimento teórico, o que equivale a aproximadamente 0,45–0,48 g<sub>etanol</sub>·g<sup>-1</sup><sub>açúcar</sub>. A produtividade volumétrica está na faixa de 1-3 g<sub>etanol</sub>·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> e a produtividade específica cerca de 2 g<sub>etanol</sub>·g<sup>-1</sup><sub>biomassa</sub>·h<sup>-1</sup> (BOTHAST et al., 1999).

O desempenho do processo de simultânea isomerização e fermentação de xilose foi discutido em termos de parâmetros operacionais tais como: conversão de substrato, rendimento, produtividade e seletividade etanol/xilitol. Os cálculos dos parâmetros são descritos no Quadro III:

Quadro III: Equações para cálculo dos parâmetros da SIF

Parâmetro	Equação	Descrição
Conversão do substrato S, [%]	$X = \frac{C_{S0} - C_S}{C_{S0}} \times 100$	C <sub>S0</sub> : concentração de açúcares totais no tempo inicial (processo descontínuo) ou na alimentação (processo descontínuo), (g.L <sup>-1</sup> ). C <sub>S</sub> : concentração de açúcares totais no caldo fermentado, (g.L <sup>-1</sup> ).
Fator de conversão (rendimento global): Y <sub>P/S</sub> [g <sub>P</sub> /g <sub>S</sub> ]	$Y_{P/S} = \frac{C_P}{C_S} \times 100$	C <sub>P</sub> : concentração de um determinado produto P formado tempo no t, (g.L <sup>-1</sup> ). C <sub>S</sub> : concentração de substrato consumido no tempo t, (g.L <sup>-1</sup> ). t: é final da reação, para o processo descontínuo e tempo de residência para o processo contínuo.
Produtividade volumétrica global: Pr <sub>P</sub> [g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	$Pr_P = \frac{C_P}{t}$	C <sub>P</sub> : concentração do produto P no tempo t, (g.L <sup>-1</sup> ). t: tempo final da reação, para processo descontínuo, e tempo de residência no caso do processo contínuo, (h).
Produtividade volumétrica máxima: Pr <sub>66ax,P</sub> [g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	$Pr_{máx,P} = \frac{dC_P}{dt}$	(dC <sub>P</sub> /dt): tangente da curva de produto P <i>versus</i> tempo, na faixa linear, (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ).
Velocidade específica de assimilação do substrato: q <sub>S</sub> [g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	$q_S = -\frac{1}{C_x} \times \frac{dC_S}{dt}$	C <sub>x</sub> : concentração inicial de células viáveis no reator (g.L <sup>-1</sup> ). (dC <sub>S</sub> /dt): tangente da curva de substrato <i>versus</i> tempo, na faixa linear (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ).
Velocidade específica de produção: q <sub>P</sub> [g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ]	$q_P = \frac{1}{C_x} \times \frac{dC_P}{dt}$	C <sub>x</sub> : concentração inicial de células viáveis no reator, (g.L <sup>-1</sup> ). (dC <sub>P</sub> /dt): tangente da curva de produto P <i>versus</i> tempo, na faixa linear, (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ).
Seletividade: S <sub>X/Y</sub> [mol.mol <sup>-1</sup> ]	$S = \frac{C_X \cdot M_Y}{C_Y \cdot M_X}$	C <sub>X</sub> , C <sub>Y</sub> : concentração dos produtos X e Y, respectivamente, (g.L <sup>-1</sup> ). M <sub>X</sub> , M <sub>Y</sub> : massa molar dos produtos X e Y, respectivamente, (g.mol <sup>-1</sup> ).
Carbono <i>in</i> (g) (carbono consumido)	$C_{in} = (C_{S0} - C_S) \times \frac{n_C \cdot MM_C}{MM_S} \times V$	C <sub>S0</sub> : concentração inicial do substrato, (g.L <sup>-1</sup> ). C <sub>S</sub> : concentração final do substrato, (g.L <sup>-1</sup> ). n <sub>C</sub> : mol de carbono na molécula de substrato, (mol.mol <sup>-1</sup> ). MM <sub>C</sub> : massa molar do carbono (g.mol <sup>-1</sup> ). MM <sub>S</sub> : massa molar do substrato). V: volume reacional, (L).
Carbono <i>out</i> (g) (carbono quantificado nos produtos formados)	$C_{out} = \sum \left( \frac{C_{Pi} \cdot n_C \cdot MM_C}{MM_{Pi}} \right) \times V$	C <sub>Pi</sub> : concentração final do produto Pi. i: xilitol, glicerol, ácido acético, glicerol e CO <sub>2</sub> .
Carbono recuperado (%)	$\text{Carbono Recuperado} = \frac{C_{out}}{C_{in}}$	C <sub>out</sub> : carbono quantificado nos produtos formados. C <sub>in</sub> : carbono consumido.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE GLICOSE ISOMERASE

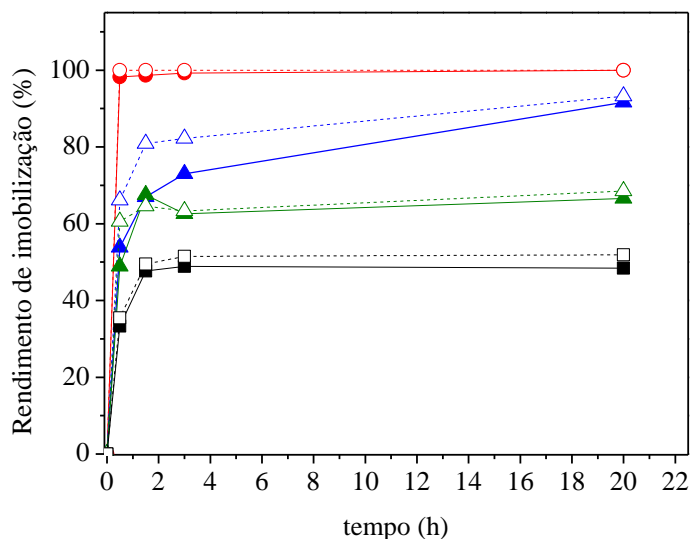
A primeira etapa deste trabalho consistiu na preparação de derivados de glicose isomerase mediante uso de dois diferentes suportes: quitosana-glutaraldeído e glioxil-agarose. Uma das principais diferenças entre os dois derivados obtidos a partir destes suportes é a interação enzima-suporte. Enquanto o suporte quitosana-glutaraldeído faz ligações uni pontuais com a enzima, glioxil-agarose faz ligações multipontuais.

Para alguns estudos comparativos, utilizou-se também o preparado comercial Gensweet IGI-HF (glicose isomerase imobilizada - Genencor), disponibilizado na forma de pellets de aproximadamente 1mM. Como a proposta deste trabalho era desenvolver um biocatalisador contendo a enzima imobilizada e levedura de panificação coimobilizadas em alginato, o uso da enzima imobilizada comercial nos estudos de SIF foi desestimulado porque certamente agregaria dificuldades ao processo de encapsulação devido ao tamanho das suas partículas. Ademais, realizar a preparação de derivados de GI possibilitaria uma avaliação detalhada da imobilização de diferentes cargas de enzima sobre o suporte e, numa visão otimista, poder-se-ia obter um biocatalisador com atividade superior à do derivado comercial. A seguir, estão descritos os resultados referentes à imobilização e caracterização de derivados da glicose isomerase.

#### 4.1.1 Imobilização de GI em glutaraldeído-quitosana

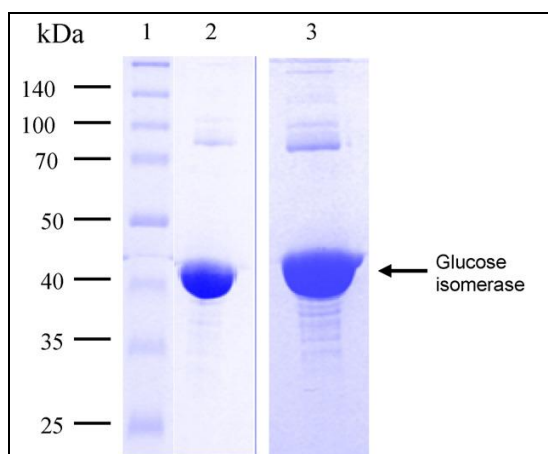
Quatro diferentes cargas de proteínas foram oferecidas para imobilização de GI: 30, 50, 70 e 100  $\text{mg}_{\text{prot.}}\cdot\text{g}^{-1}$  de suporte. O gel ativado tinha, em média, 95% de umidade, o que implicava um fator de diluição de 1,1 para a solução enzimática oferecida para imobilização após a adição do suporte. A determinação da atividade da solução de imobilização (branco ou controle) demonstrou que a enzima apresentou 100% de estabilidade em todas as condições de imobilização testadas. A Figura 4.1 apresenta a cinética de imobilização de glicose isomerase. Em síntese, demonstra o aumento dos rendimentos de imobilização de proteína e de unidades de enzima,  $Y_P$  e  $Y_{IU}$ , respectivamente, com o tempo de imobilização, para as quatro cargas de enzimas.

**Figura 4.1** – Cinética de imobilização de glicose isomerase em quitosana ativada com glutaraldeído.  $Y_P$  = rendimento da imobilização de proteína (- - -);  $Y_{UI}$  = rendimento de imobilização de unidades de enzimas (—); cargas oferecidas: 30 mg.g<sup>-1</sup> (●), 50 mg.g<sup>-1</sup> (▲), 70 mg.g<sup>-1</sup> (▲) 100 mg.g<sup>-1</sup> (◆).



Durante as horas iniciais do processo de imobilização,  $Y_P$  foi geralmente superior a  $Y_{UI}$ . Esta tendência foi mais evidente para a carga intermediária, 50 mg.g<sup>-1</sup> de suporte. Para as cargas superiores a esta, a diferença entre  $Y_P$  e  $Y_{UI}$ , embora ainda presente, é reduzida provavelmente por um efeito de entupimento na entrada dos poros. A presença de proteínas contaminantes com massa molecular menor que GI e, portanto, com maiores velocidades de imobilização, poderia explicar esses resultados. Um gel de SDS-PAGE do extrato da enzima comercial confirma essa hipótese (Figura 4.2).

**Figura 4.2** – Eletroforese SDS-PAGE de GENSWEET<sup>®</sup> SGI. (1) marcadores de proteína (Peso molecular em kDa); (2): extrato enzimático; (3): sobrecarga de extrato enzimático.



De acordo com a Figura 4.1 a imobilização das primeiras 30 a 40 mg.g<sup>-1</sup> de suporte pode acontecer em até 1 hora. A partir dos resultados da Figura 4.1 e da Tabela 4.1, verifica-se que quanto maior a concentração inicial da enzima oferecida para imobilização, mais baixo o rendimento de imobilização obtido em 20 h de imobilização. Aparentemente, cerca de 47 mg de proteína parece ser a quantidade máxima de enzima possível de ser imobilizada por grama de suporte. No entanto, quando o tempo de imobilização foi aumentado para 43h em um novo experimento no qual a carga oferecida foi 70 mg.g<sup>-1</sup> de suporte, um rendimento de 98% foi atingido, indicando que, embora lentamente, o processo de imobilização prosseguiu e um derivado mais ativo pôde ser obtido.

**Tabela 4.1** – Parâmetros da imobilização de glicose isomerase em glutaraldeído quitosana a pH 7,0 e 25°C.

<b>C<sub>P</sub></b> <b>(mg<sub>prot</sub>/g<sub>sup</sub>)</b>	<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>Y<sub>P</sub></b> <b>(%)</b>	<b>P<sub>t</sub></b> <b>(mg<sub>prot</sub>/g<sub>der</sub>)</b>	<b>A<sub>t</sub></b> <b>(UI/g<sub>der</sub>)</b>	<b>A<sub>der</sub></b> <b>(UI/g<sub>der</sub>)</b>	<b>AR</b> <b>(%)</b>
30	20	100	30	798	735 ± 17	92
50	20	93	46	1237	1129 ± 102	91
70	20	67	47	1257	1200 ± 26	95
70	43	97	68	1837	1700 ± 256	93
100	20	50	50	1344	1200 ± 100	89

NOTA: C<sub>P</sub>: carga de proteína oferecida; t: tempo de imobilização; Y<sub>P</sub>: rendimento de imobilização de proteínas, P<sub>t</sub>: proteína teoricamente imobilizada; A<sub>t</sub>: unidades de enzima teoricamente imobilizadas; A<sub>der</sub>: Atividade do derivado (com desvios padrão de triplicatas); AR: atividade recuperada.

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 demonstram que todos os derivados apresentaram elevada atividade recuperada (superior a 89%). Esses resultados indicam que dois fatores que reduzem a eficiência de um catalisador, efeitos de difusão nos poros e distorção da estrutura da enzima imobilizada devido à formação de múltiplas ligações com glutaraldeído, não foram significativos nestes experimentos. A utilização de baixa concentração de glutaraldeído, um agente ativador altamente reativo, pode ter contribuído para as elevadas atividades recuperadas, pois o entrecruzamento elevado entre cadeias de quitosana promove diminuição no diâmetro do poro. Porém, o uso de baixa concentração desse agente também apresenta desvantagens, como por exemplo, pode dificultar a formação de enlaces multipontuais entre o suporte e a enzima, os quais poderiam melhorar a estabilidade térmica da enzima, embora à custa de uma maior distorção da sua estrutura.

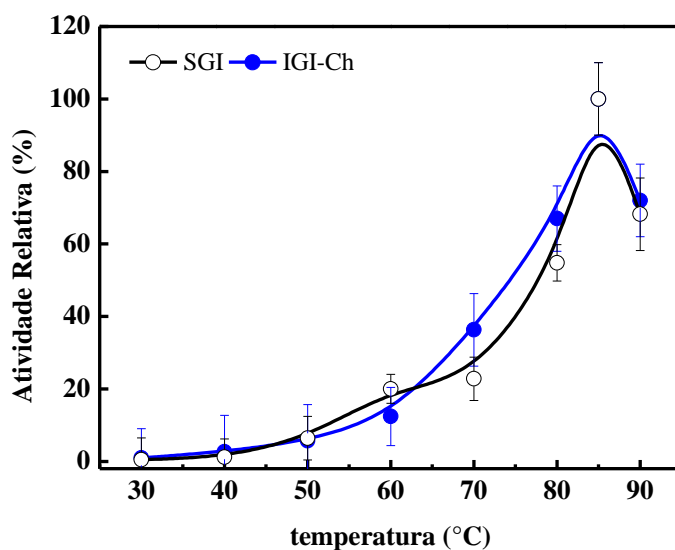
O melhor derivado (aquele que continha a mais elevada atividade aparente) apresentou 1700 UI.g<sup>-1</sup>, praticamente o dobro da atividade do catalisador comercial IGI-HF (Genencor), cuja atividade medida nas mesmas condições era 900 UI.g<sup>-1</sup>. Ressalta-se aqui que

quitosana é um produto barato, abundante e facilmente disponível no comércio brasileiro e que o protocolo de imobilização utilizado neste estudo é de fácil implementação. Portanto, este método parece ser adequado para a imobilização da enzima glicose isomerase, tendo em vista a sua utilização em escala industrial. Outro caso de sucesso de imobilização em glutaraldeído-quitosana preparado a quente, como neste estudo, foi descrito por Budriene et al. (2005) que imobilizaram a enzima galactosidase e obtiveram rendimento de imobilização de até 98%.

#### 4.1.2 Influência do pH e da temperatura na atividade de glicose isomerase

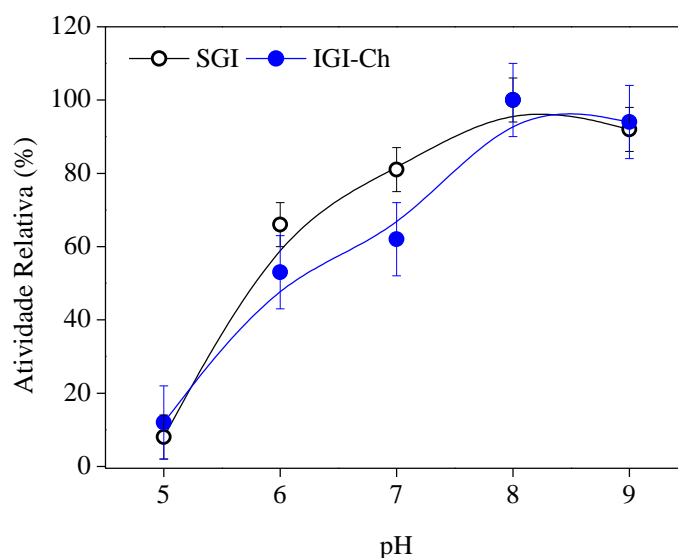
Atividades de GI solúvel e imobilizada foram determinadas em diferentes temperaturas (30-90°C) e pHs (5,0-9,0). Os resultados apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4 indicam tendências semelhantes para ambas às enzimas, solúvel e imobilizada. Tal comportamento indica que não houve alteração significativa na estrutura da proteína ou mesmo no microambiente químico no interior das partículas com a imobilização.

**Figura 4.3** – Influência da temperatura sobre a atividade de isomerase de glicose, pH 7,0. SGI: enzima solúvel; IGI-Ch: imobilizada GI em glutaraldeído-quitosana. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas.





**Figura 4.4** – Influência do pH sobre a atividade de glicose isomerase, a 60°C. SGI: enzima solúvel; IGI-Ch: imobilizada GI em glutaraldeído-quitosana. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas.



Na Figura 4.3, o perfil de atividade relativa indica que a temperatura na qual a atividade da enzima é maximizada é 85°C, fato que sugere que GI seja uma enzima muito estável em temperaturas usuais de processos fermentativos para produção de etanol. Essa elevada temperatura para a máxima atividade de GI proveniente de vários microrganismos já foi relatada na literatura (CALLENS et al., 1986; LÖNN et al., 2003; SEYHAN TÜKEL; ALAGÖZ, 2008; STRANDBERG; SMILEY, 1971). Glicose isomerase de *C. boidinii* parece ser uma exceção. Como é produzida por uma levedura, apresenta máxima atividade em temperaturas entre 30-35°C e pH ótimo na faixa 4,5-5,0 (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000). Por outro lado, neste estudo, apenas uma pequena percentagem da atividade apresentada pela enzima a 85°C será mantida a 30-40°C, o intervalo de temperatura adequado para a SIF de xilose. A 30°C, SGI e IGI-Ch apresentam menos de 2% da atividade enzimática a 85°C. Um comportamento similar é observado a pHs baixos.

A 60°C e pH 5, glicose isomerase solúvel e imobilizada apresentam cerca de 10% da atividade observada no pH ótimo, 8,0. Agregando este resultado ao anterior (perfil de atividade *versus* temperatura) pode-se prever que o efeito da combinação das duas variáveis, pH e temperatura baixos terá um impacto ainda mais negativo sobre a atividade enzimática em condições de SIF. Esses resultados estão de acordo com estudos descritos na literatura. Desde a década de 70 pesquisas demonstravam a sensibilidade de GI a certas condições de pH e temperatura. De acordo com Heady; Jacaway Jr. (1974), preparações de GI provenientes de microrganismos do gênero *Streptomyces* apresentam velocidade de isomerização muito mais elevada a 70°C do que a 60°C. Entretanto, em pH 6,2 as vantagens de realização da reação na

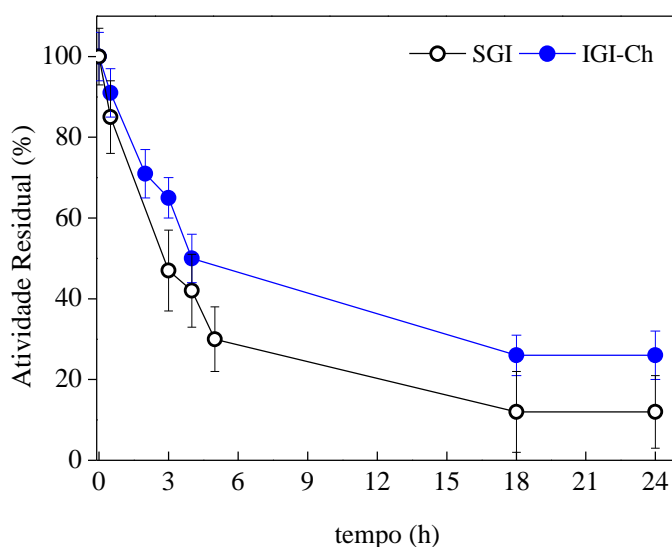
temperatura mais alta desaparecem, pois nesse pH levemente ácido, ocorre redução tanto na velocidade de isomerização quanto na estabilidade da enzima.

Os resultados apresentados nesta seção implicam na necessidade de utilização de cargas elevadas de enzimas no reator de SIF para alcançar velocidades de reação adequadas. Logo, serão requeridas imobilização de altas cargas de enzima no gel de quitosana para compensar a baixa velocidade de isomerização por unidade de enzima imobilizada presente no reator heterogêneo.

#### 4.1.3 Inativação térmica

A Figura 4.5 ilustra os perfis de desativação da GI solúvel e imobilizada em glutaraldeído-quitosana, a 80°C e pH 7,0.

**Figura 4.5** – Perfis de inativação de isomerase de glicose a 80°C. SGI: enzima solúvel; IGI-Ch: imobilizada GI em glutaraldeído-quitosana. Barras de erro: desvio padrão de triplicatas



A enzima imobilizada mostrou-se discretamente mais estável do que a enzima solúvel a 80°C. Em ambos os casos, houve uma queda acentuada de atividade durante o período inicial de 5 h e após esse período a desativação ocorreu mais lentamente. Aparentemente, após 18 h, alguma fração das enzimas preservou a sua atividade, sendo que a imobilizada estava num nível mais elevado do que a solúvel. Uma possível explicação para este comportamento é a ocorrência de alguma alteração na estrutura tridimensional da proteína, tornando a enzima mais estável. Em geral, a imobilização conduz a certo aumento na estabilidade da enzima, pois a proteína imobilizada é mantida num microambiente diferente, protegido de danos físicos (por exemplo, de agitação). De fato, o pequeno aumento na estabilização da enzima glicose

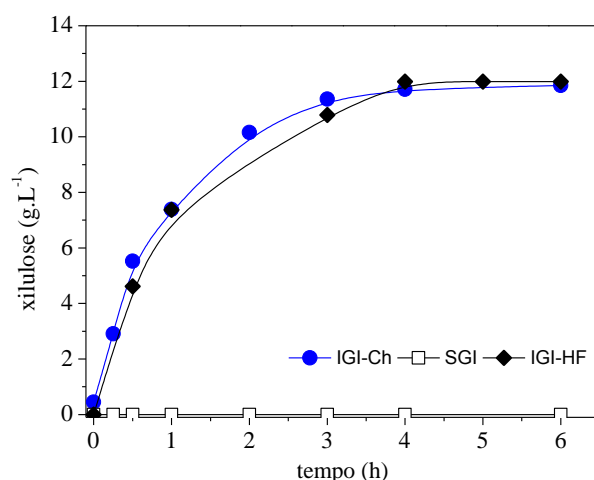
isomerase obtido com o protocolo de imobilização empregado neste trabalho já era esperado, pois ocorre apenas uma ligação entre enzima e suporte. Um elevado grau de estabilização da enzima após a imobilização requer a formação de múltiplas ligações entre a mesma molécula de enzima e o suporte ativado. Uma vez que glicose isomerase de *S. rubiginosus* é composta por quatro sub-unidades (Protein Data Bank), a estabilização da enzima se torna mais difícil, pois as unidades não ligadas ao suporte podem ser liberadas para o meio, e como consequência, ocorre desativação da enzima. Sendo assim, um protocolo de imobilização mais complexo seria necessário para atingir fatores de estabilização mais elevados (BOLIVAR et al., 2009; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R et al., 2001).

Estabilidade a elevadas temperaturas é extremamente importante na produção industrial de xarope de alta frutose. No entanto, é importante salientar que no atual estudo GI imobilizada é destinada ao uso em temperaturas muito inferiores a 80°C. Portanto, considerando-se que a enzima imobilizada mantém cerca de 30% de sua atividade inicial após 24 h a 80°C, uma vida muito longa é esperada na faixa de temperaturas de operação do processo de SIF de xilose.

#### **4.1.4 Isomerização de xilose a xilulose a pH 5,0 e 30°C**

A Figura 4.6 apresenta os resultados da isomerização de xilose catalisada por GI solúvel e imobilizada a pH 5,0 e 30°C, na presença de nutrientes típicos de fermentação, durante 6 h. O desempenho do derivado IGI-Ch foi comparado ao da enzima imobilizada comercial da Genencor (IGI-HF). Nas condições testadas, não ocorreu produção de xilulose quando a enzima solúvel era o catalisador. Utilizando enzimas imobilizadas, as concentrações de equilíbrio químico foram alcançadas após 4 h.

**Figura 4.6** – Isomerização de 60g. L<sup>-1</sup> xilose em condições operacionais de SIF, catalisada por GI solúvel e imobilizada, a 30°C e pH 5. (□) SGI: 12×10<sup>3</sup> IU.L<sup>-1</sup>; IGI-Ch (●): 12×10<sup>3</sup> IU.L<sup>-1</sup> (7 g derivado. L<sup>-1</sup>); IGI-HF (◆) 12×10<sup>3</sup> IU.L<sup>-1</sup> (13 g derivado. L<sup>-1</sup>)



#### 4.1.5 Influência da concentração de etanol sobre a atividade de GI em condições operacionais da SIF de xilose

A literatura reporta que o etanol favorece a produção de xarope de alta frutose catalisada por glicose isomerase porque uma concentração elevada desse solvente presente no meio reacional pode deslocar o equilíbrio químico de modo que a relação frutose/glicose de 49% (no equilíbrio) seja elevada para 55% (VISURI; KLIBANOV, 1987). Sendo assim, era esperado que a atividades das enzimas testadas no atual estudo fossem plenamente mantidas quando estas estivessem submetidas a sistemas contendo concentrações de etanol próximas aquelas tipicamente encontradas em fermentações alcoólicas.

A Tabela 4.2 ilustra a influência de duas concentrações de etanol (30 e 70g.L<sup>-1</sup>) nas atividades de SGI, IGI-Ch e IGI-HF, a pH 5 na presença de xilose e sais típicos da fermentação alcoólica. Com base nos resultados apresentados nas seções anteriores, decidiu-se avaliar as atividades a 35°C para favorecer a atividade enzimática.

**Tabela 4.2** – Influência da concentração de etanol sobre a atividade de glicose isomerase a pH 5,0 e 35°C em meio contendo xilose, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cobalto, soytone, extrato de levedura, ureia, cloreto de cálcio (concentrações descritas no item 3.4.6.5).

Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Atividade Enzimática					
	SGI		IGI-Ch		IGI-HF	
	(UI.mL <sup>-1</sup> )	(%)	(UI.g <sup>-1</sup> )	(%)	(UI.g <sup>-1</sup> )	(%)
0	2,8±5×10 <sup>-2</sup>	0,08	69±4	4,0	54 ± 3	6,0
30	2,2±6×10 <sup>-2</sup>	0,06	67±7	3,9	51 ± 2	5,6
70	3,3±6×10 <sup>-2</sup>	0,10	63±3	3,7	53 ± 1	5,9
Atividade (condição padrão)	3400	100	1700	100	900	100

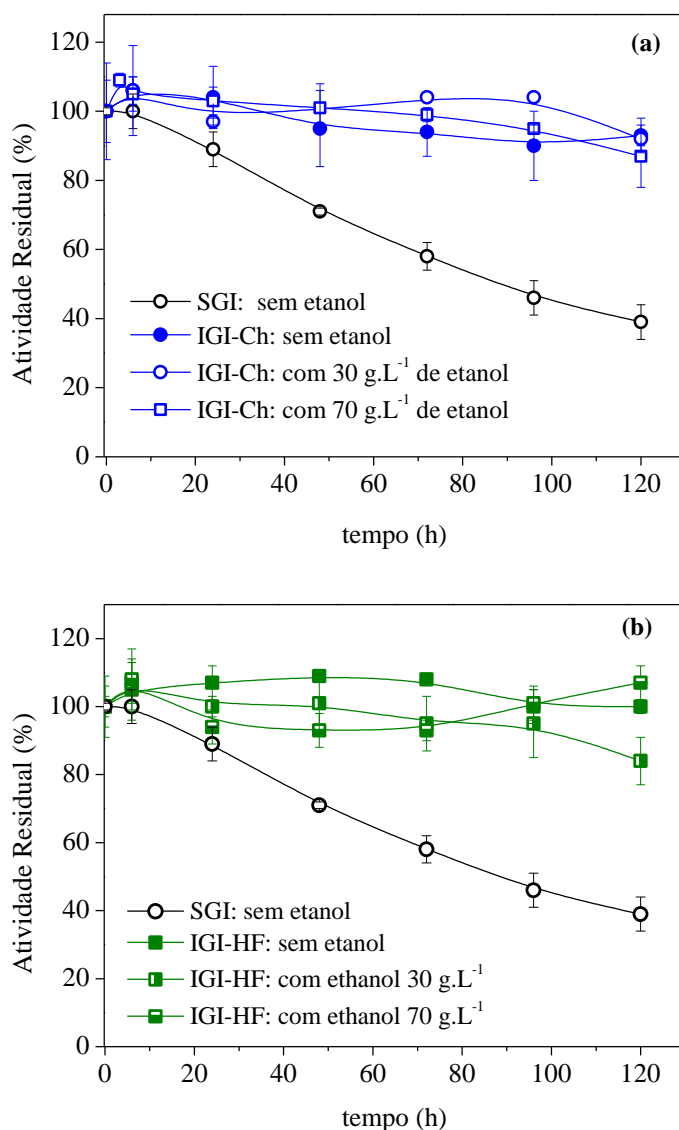
NOTA: as atividades em condições padrão, medidas a pH 7,0, 60° C são apresentadas para comparação.

Na Tabela 4.2 o desempenho do derivado IGI-Ch em presença de etanol pode comparado ao do preparado comercial IGI-HF. Os resultados apresentados em percentual correspondem às frações da atividade de GI medida em condições padrão. Os resultados apresentados comprovaram que a presença de etanol (até  $70\text{g.L}^{-1}$ ) não afeta a atividade da enzima a pH 5,0, quer esta esteja na forma solúvel ou na forma imobilizada. Tal como esperado, a atividade da enzima na combinação de temperatura e pH baixos (pH 5 e  $35^{\circ}\text{C}$ ) diminui consideravelmente. GI solúvel é praticamente inativada nestas condições, enquanto a forma imobilizada retém cerca de 5% da atividade apresentada nas condições padrão. Os derivados imobilizados apresentaram desempenhos similares.

#### **4.1.6 Estabilidade de GI nas condições de operação do processo de SIF de xilose**

A estabilidade operacional de GI foi avaliada a pH 5,0, num meio contendo etanol e nutrientes típicos necessários para fermentação de xilulose (descrito no item 3.4.6.5). Os resultados apresentados na Figura 4.7 indicam que as enzimas imobilizadas mantiveram no mínimo 90% da atividade inicial após 120 h de incubação. Por outro lado, a enzima solúvel perdeu mais que 50% da atividade inicial nas mesmas condições. A literatura reporta que a dissociação das sub-unidades é uma das causas mais importantes de desativação de enzimas multiméricas, como a glicose isomerase, tornando-as muito instáveis em solução (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 2001). A imobilização pode atenuar essa inativação, o que pode justificar a estabilização observada para os derivados IGI-Ch e IGI-HF. Entretanto, é provável que concentrações de etanol bem mais elevadas afetem a atividade da enzima. A literatura reporta que GI imobilizada obtida por ligações cruzadas de cristais da enzima com glutaraldeído, manteve apenas 2% da atividade catalítica inicial a pH 7,0 e  $50^{\circ}\text{C}$ , após incubação durante 24 h numa solução de etanol a 50% (v/v) (VILONEN et al., 2004).

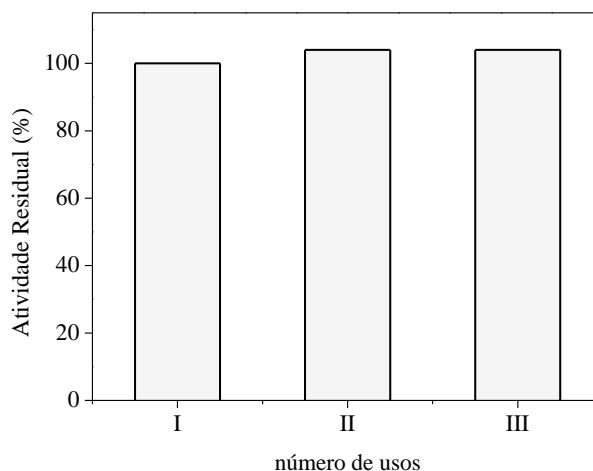
**Figura 4.7** – Atividades residuais da glicose isomerase, em condições padrão, após incubação em condições típicas da SIF xilose: pH 5,0; 35°C e meio contendo fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de cobalto, soytone, extrato de levedura, ureia, cloreto de cálcio e etanol. (a) SGI e IGI-Ch e (b) SGI e IGI-HF.



#### 4.1.7 Ensaios de reciclo usando GI imobilizada

Para confirmar a existência de ligações covalentes entre enzima e o suporte, a atividade de IGI-Ch foi determinada após três bateladas repetidas de isomerização de frutose, a pH 7 e 60°C. Após cada ciclo de reação o biocatalisador foi separado por filtração, lavado com tampão tris maleato 100mM e pH 7 e água destilada sob vácuo. Após isso o derivado foi reutilizado num novo ciclo de reação. As atividades residuais obtidas após cada batelada estão ilustradas na Figura 4.8. Os resultados indicam que não houve perda de atividade entre as bateladas e lavagens sucessivas, portanto não houve nenhuma dessorção da enzima imobilizada.

**Figura 4.8** – Atividades residuais de glicose isomerase imobilizada em quitosana (IGI-Ch) após três bateladas repetidas de isomerização de frutose a pH 7 e 60°C.



O derivado de IGI-Ch foi coimobilizado com levedura de panificação e seu desempenho na SIF de xilose foi estudado. Os resultados obtidos são descritos no item 4.3.

## 4.2 IMOBILIZAÇÃO DE GI EM GLIOXIL-AGAROSE

Nesta etapa do estudo, desenvolvida no Laboratório de Engenharia Enzimática do Instituto de Catálise e Petroquímica (ICP/Madri-Espanha), estudou-se a preparação de um novo derivado de glicose isomerase, utilizando glioxil-agarose como suporte e um método que possibilita a formação de ligações covalentes multipontuais enzima-suporte. Essa multiinteração modifica a estrutura tridimensional da enzima e pode levar a modificações em suas características, com conseqüente alteração na estabilidade operacional e no comportamento da atividade em função do pH. GI é enzima muito estável, com meia vida operacional de 200 dias a 60°C, na operação industrial da produção de xarope glicose-frutose. O aumento de estabilidade não é, portanto, o principal objetivo do estudo deste novo protocolo de imobilização. Contudo, uma vez que a enzima solúvel tem drástica redução de atividade a pHs iguais ou menores que cinco, obter uma nova estrutura da enzima que tenha mais alta atividade nessa região de pH seria, então, altamente desejável.

Na Tabela 4.3 pode-se verificar que o procedimento de imobilização da enzima glicose isomerase comercial no suporte glioxil-agarose resultou num baixo rendimento. Apenas  $1,3 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  dos  $11 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{g}_{\text{suporte}}^{-1}$  oferecidos foram imobilizados em 15 horas de reação. O baixo nível de imobilização indica que o número ou a disposição dos resíduos de lisina na superfície da proteína não favoreceu a ligação enzima-suporte. Sendo assim, seguiu-se uma abordagem alternativa que consiste na modificação química da enzima (aminação com etilenodiamina) com o objetivo de obter-se uma superfície proteica enriquecida com grupos

reativos, aumentando a possibilidade de elevar o nível de imobilização por ligação covalente mutipontual (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

**Tabela 4.3** – Parâmetros da imobilização de glicose isomerase em glioxil-agarose a pH 10,0 e 25°C.

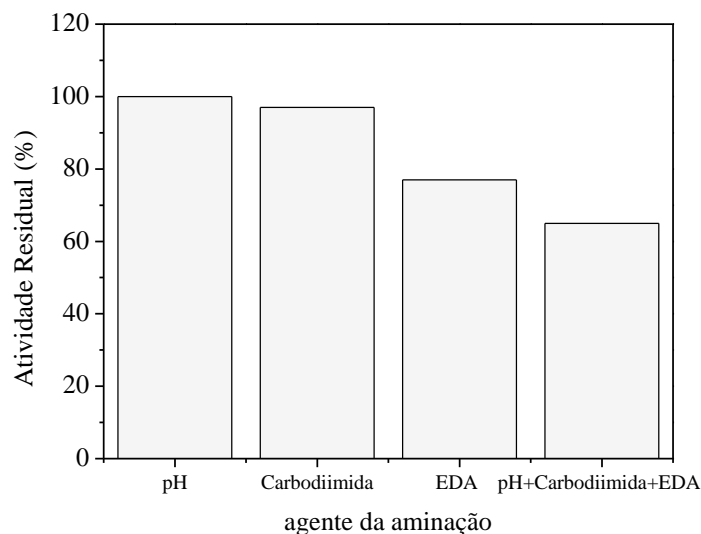
<b>Enzima</b>	<b>C<sub>P</sub></b> <b>(mg<sub>prot</sub>/g<sub>sup</sub>)</b>	<b>t</b> <b>(h)</b>	<b>Y<sub>P</sub></b> <b>(%)</b>	<b>P<sub>t</sub></b> <b>(mg<sub>prot</sub>/g<sub>der</sub>)</b>	<b>A<sub>t</sub></b> <b>(UI/g<sub>der</sub>)</b>	<b>A<sub>der</sub></b> <b>(UI/g<sub>der</sub>)</b>	<b>AR</b> <b>(%)</b>
<b>GI Comercial</b> (Não aminada)	11	15	12	1,3	-	-	-
<b>GI Aminada</b>	43	4,5	57	24,4	80,6	55,7±1,2	69

NOTA: C<sub>P</sub>: carga de proteína oferecida; t: tempo de imobilização; Y<sub>P</sub>: rendimento de imobilização de proteínas, P<sub>t</sub>: proteína imobilizada; A<sub>t</sub>: unidades de enzima teoricamente imobilizadas; A<sub>der</sub>: Atividade do derivado (média±desvios padrão de medidas em triplicata); AR: atividade recuperada. A atividade enzimática foi medida em frutose a 55°C e pH 7.

Durante o processo de aminação, grupos carboxílicos presentes nos resíduos ácidos glutâmico e aspártico reagem com etilenodiamina, disponibilizando grupos amino adicionais na superfície da proteína. Um dos aspectos negativos da técnica aminação de enzimas é a perda de atividade catalítica. No atual estudo, o tempo do procedimento e a concentração de etilenodiamina foram reduzidos em relação ao procedimento descrito na literatura de modo a minimizar esse efeito (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). Durante o procedimento, analisou-se a influência de cada um dos agentes da aminação. Os resultados são apresentados na Figura 4.9. O pH (4,75) isoladamente não afetou a enzima. Como o tempo definido para execução procedimento de aminação era curto (30min) já era esperado que o efeito negativo da variável pH fosse reduzido. Entretanto, carbodiimida (10mM) e etilenodiamimina (EDA, 250mM) reduziram em 3 e 23% a atividade enzimática, respectivamente. Com a combinação dos três agentes de aminação (pH, carbodiimida e etilenodiamimina), ao final do procedimento, as soluções enzimáticas apresentavam cerca de 60% da atividade inicial.



**Figura 4.9** – Fatores responsáveis pela redução da atividade catalítica da glicose isomerase durante procedimento de aminação a pH 4,75, em EDA 250mM e carbodiimida 10mM por 30 minutos.

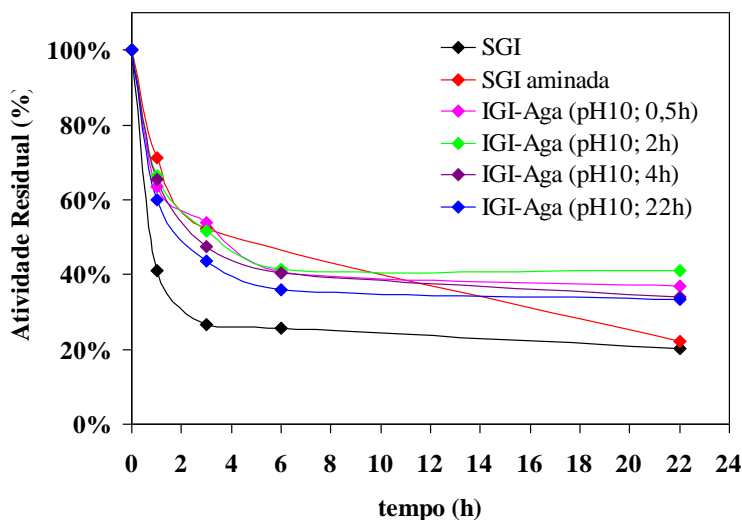


Após o procedimento de aminação, o processo de imobilização foi realizado com sucesso. Como demonstrado na Tabela 4.3), 24,4 mg<sub>proteína</sub>.g<sub>suporte</sub><sup>-1</sup> foram imobilizados em 4,5 horas (tempo final da imobilização). O rendimento de imobilização foi 57%, e a atividade recuperada no derivado 69%. A perda de atividade certamente está relacionada às distorções promovidas pelas ligações multipontuais enzima-suporte.

No decorrer dos estudos, provou-se que a imobilização da enzima aminada pode ser realizada em pH 9-10. Isso é possível graças ao pKa (9,2) dos grupos amino gerados sobre a superfície da enzima. Essa possibilidade é interessante porque determinadas enzimas apresentam estabilidade reduzida em pH 10 e tendem a inativar durante o processo de imobilização. Nesses casos, proceder a imobilização em pH 9 pode ser uma alternativa menos danosa. Essa limitação não foi encontrada durante a imobilização da glicose isomerase aminada. A enzima demonstrou elevada estabilidade durante todo do período de imobilização conduzido em pH 10.

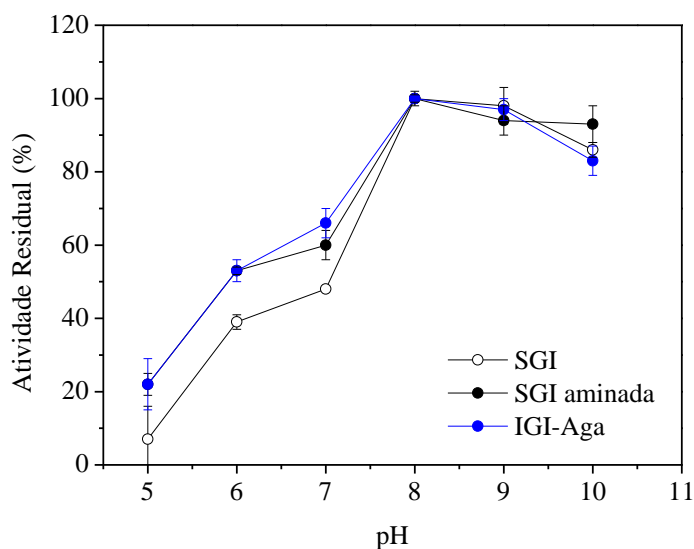
Apresentam-se na Figura 4.10 os resultados do estudo da estabilidade térmica dos derivados IGI-Aga (*Immobilized Glucose isomerase in agarose*) preparados em diferentes tempos de imobilização (0,5 h; 2 h; 4 h e 22 h). Pode-se observar que não houve aumento considerável de estabilidade dos derivados, o que já era esperado, pois a enzima é multimérica. Conforme já comentado, isso não é problema, pois a enzima será utilizada em temperaturas muito menores que a de máxima atividade, o que irá aumentar muito sua vida operacional.

**Figura 4.10** – Inativação de GI a 62°C e pH 5 em meio contendo 5mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 2,5mM COCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O. SGI: glicose isomerase solúvel, IGI-Aga: glicose isomerase imobilizada em quitosana.



A seguir, as atividades das enzimas solúveis antes e após a aminação e do derivado foram testadas em distintos pHs (entre 5 e 10). O perfil de atividade residual *versus* pH destacado na Figura 4.11 indica que não houve alteração no pH ótimo da enzima. Porém, após o processo de aminação, a enzima demonstrou maior atividade catalítica nos pHs 5 e 6, em comparação com a enzima original. Essa característica é interessante para a aplicação do biocatalisador no processo SIF de xilose uma vez que a questão da baixa atividade da enzima em pHs  $\leq 5$  é um dos entraves para o desenvolvimento pleno do processo.

**Figura 4.11** – Perfil de atividade de GI solúvel e imobilizada em glioxil-agarose em função do pH. Atividade em frutose 1M pH 7 a 55°C. SGI: glicose isomerase solúvel, IGI-Aga: glicose isomerase imobilizada em quitosana.



O derivado de GI imobilizada em glioxil-agarose foi coimobilizado com levedura de panificação e seu desempenho na SIF de xilose foi analisado. Os resultados obtidos, que serão mostrados e analisados no item a seguir, indicaram que esse derivado foi eficiente na isomerização da xilose. A mudança no comportamento do pH é uma vantagem desse derivado frente ao de quitosana-glutaraldeído. Contudo, a produção do biocatalisador IGI-Aga apresenta duas desvantagens que o tornam menos atraente do ponto de vista de aplicação. Primeiro, a perda de atividade enzimática durante a necessária aminação para a imobilização, que continua ainda a ocorrer durante a imobilização sem haver expressiva contrapartida de aumento de estabilidade do derivado. Segundo, o protocolo de imobilização é mais caro, demorado e difícil. Essa análise direciona assim para a seleção do derivado quitosana-glutaraldeído-GI (IGI-Ch).

### **4.3 SIF DE XILOSE EM BATELADA**

Os estudos de SIF de xilose utilizando a enzima glicose isomerase imobilizada e levedura de panificação Itaiquara<sup>®</sup> coimobilizadas em gel de alginato de cálcio foram inicialmente conduzidos utilizando como referência um meio de cultivo descrito na literatura (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000). Estes autores também estudaram a SIF de xilose, porém, com enzima e levedura livres no reator. O meio reacional utilizado pelos pesquisadores continha extrato de levedura, peptona, fosfato de potássio e sulfato de magnésio. Para o atual estudo, houve ainda a adição de ureia e cloreto de cobalto, componentes importantes para a estabilidade da glicose isomerase, além de cloreto de cálcio, requerido para garantir a integridade das paredes dos pellets de alginato de cálcio por longos períodos de tempo. *Kamoram*, um antibiótico utilizado na indústria sucroalcooleira para controle de bactérias gram (+) como *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Streptococcus* também foi adicionado. A composição detalhada do meio resultante (Meio A) encontra-se descrita no item 3.2.

Nos próximos itens serão apresentados os resultados das SIFs de xilose, em batelada, com uso de diferentes biocatalisadores e meios reacionais. Nesta etapa do estudo selecionou-se um biocatalisador e definiram-se condições para a operação da SIF de xilose no modo contínuo.

#### **4.3.1 Influência das concentrações de enzima e de levedura na produção de etanol**

O primeiro conjunto de experimentos de SIF de xilose, utilizando o meio A, teve como objetivo principal avaliar os efeitos da concentração da enzima glicose isomerase imobilizada (IGI-Ch) e da levedura de panificação (coimobilizadas em gel de alginato de

cálcio) na produção de etanol e em outros parâmetros do processo. Para isso, uma série de biocatalisadores foi preparada de modo que cada um deles fornecesse ao reator uma determinada razão entre a concentração de enzima e de levedura, conforme descrito na Tabela 4.4. As quantidades de enzima e levedura foram selecionadas de modo a abranger um intervalo considerável entre as concentrações mínimas e máximas. A temperatura de 35°C foi adotada no sentido de favorecer a atividade da enzima glicose isomerase. O pH inicial era aproximadamente 5,5.

**Tabela 4.4** – Concentrações de IGI-Ch e levedura de panificação adotadas para a SIF de xilose a 35°C.

Biocatalisador*	Concentração no reator		
	IGI-Ch		<i>S. cerevisiae</i>
	g.L <sup>-1</sup>	UI.L <sup>-1</sup>	(g <sub>cms</sub> .L <sup>-1</sup> )
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4)	190	228×10 <sup>3</sup>	20
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:4)	100	120×10 <sup>3</sup>	20
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:4)	25	30×10 <sup>3</sup>	20
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:2)	25	30×10 <sup>3</sup>	10
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:8)	25	30×10 <sup>3</sup>	40
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:16)	25	30×10 <sup>3</sup>	80

NOTA: \*Os valores entre parênteses indicam o percentual em massa de IGI-Ch e *S. cerevisiae* presentes no biocatalisador. Atividade de IGI-Ch: 1200 UI.g<sup>-1</sup> a pH 7 e 60°C. cms: células em massa seca.

Mediante avaliação da umidade dos pellets, verificou-se que estes apresentavam em média 84% de líquido na sua composição. Dessa forma, havia uma diluição do meio de SIF da ordem de 1,84 vezes quando se adicionava ao reator quantidades equivalentes de meio e pellets. Como o meio preparado para SIF continha 120g.L<sup>-1</sup> de xilose, considerou-se que a concentração inicial de xilose para todos os experimentos descritos neste item era 65g.L<sup>-1</sup>.

Os produtos identificados no caldo de SIF de xilose com levedura de panificação foram: xilitol, glicerol, ácido acético e etanol. A formação destes compostos na fermentação de xilulose também foi verificada por diversos pesquisadores (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000; JEPPSSON et al., 1996; YUAN et al., 2011). Arabitol, um álcool de açúcar, também é citado na literatura como produto da fermentação de xilulose por *S. cerevisiae* (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000; JEPPSSON et al., 1996; SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990). A formação deste composto é descrita com menos frequência em comparação às citações do xilitol. Moraes (2013) avaliou diferentes linhagens de *S. cerevisiae* (Fleischmann<sup>®</sup> e Itaiquara<sup>®</sup>, BG-1, CAT-1 e PE-2 e CENPK.113-7D) na SIF de xilose e

verificou que dentre as seis linhagens, apenas a BG-1 produziu arabitol, que estava presente em concentrações equivalentes às do xilitol.

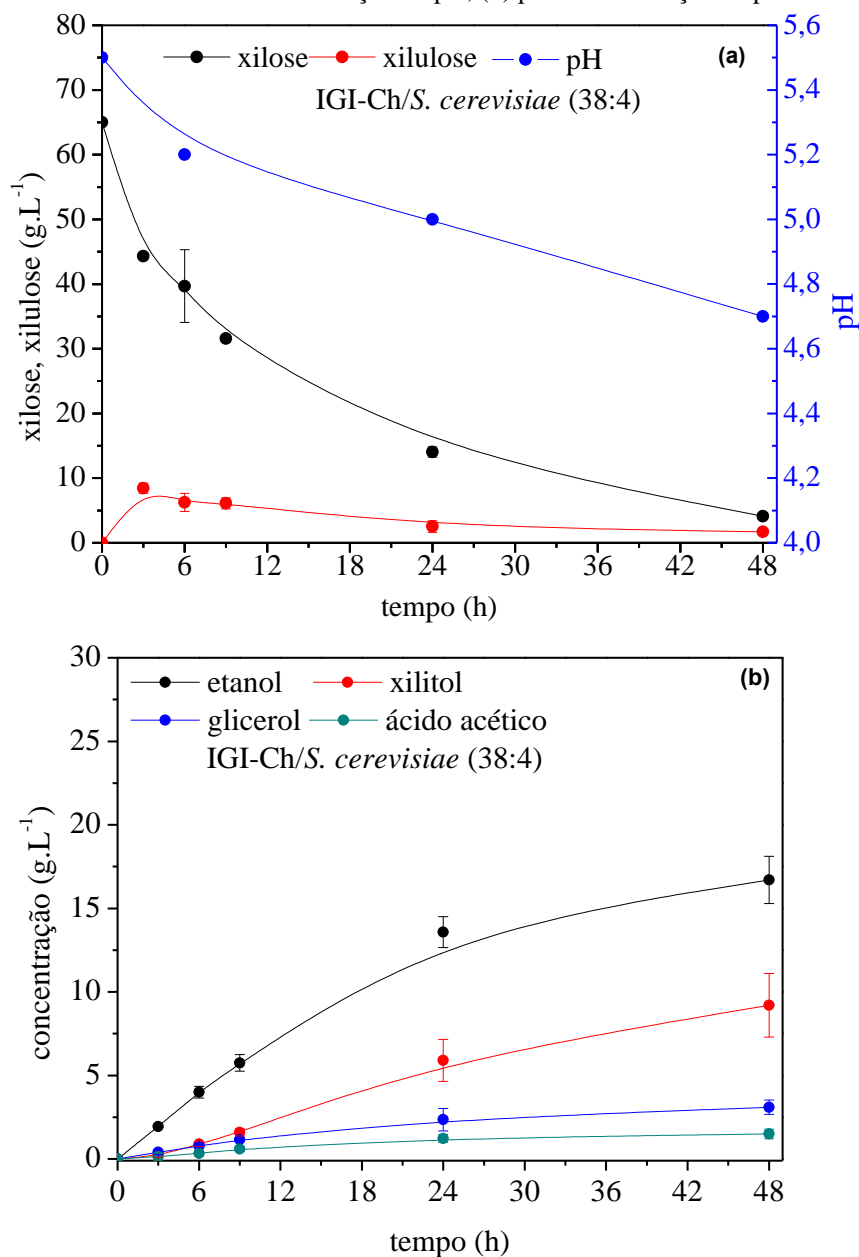
Durante a fermentação de xilulose também ocorre formação de CO<sub>2</sub>. Neste estudo, para cálculos de balanço de massa, assumiu-se que a produção de CO<sub>2</sub> está associada à formação de etanol e de acetato, ou seja, 1 mol de CO<sub>2</sub> é formado para cada mol de etanol ou ácido acético produzido, conforme descrito na literatura (KUYPER et al., 2005).

A literatura reporta que elevadas densidades celulares promovem mais rápida utilização da xilulose por *S. cerevisiae* (Chiang et al., 1981). De fato, essa é uma forma de compensar a baixa velocidade de assimilação desse substrato pela levedura. Senac e Hahn-Hagerdal (1990) destacaram que a velocidade de consumo de xilulose por *S. cerevisiae* é 10 vezes inferior à de glicose. A utilização de densidades celulares tão altas quanto 200g.L<sup>-1</sup> tem sido reportadas (YUAN et al., 2011).

No caso da SIF com enzima e levedura coimobilizadas, existe um limite máximo de células do microrganismo possível de ser adicionado ao reator. Esse limite está relacionado com a quantidade de massa do conjunto células-enzima factível de ser adicionado ao gel de alginato de cálcio para confecção do biocatalisador sem que ocorram problemas no gotejamento da suspensão final ocasionados pela elevada viscosidade. Durante o atual estudo, verificou-se que partículas esféricas ( $\Phi = 1-2,0\text{mM}$ ) eram facilmente produzidas nas menores cargas de enzima e levedura por grama de pellet. No entanto, o aumento da concentração de células tornava a suspensão mais viscosa e a produção do biocatalisador mais lenta. Nesse caso, ocorre uma tendência à formação de partículas alongadas devido às dificuldades no gotejamento da suspensão. Nessa etapa do atual estudo, uma baixa concentração de enzima imobilizada (5%) foi adotada para a confecção dos biocatalisadores, no sentido de maximizar a carga de levedura factível de ser adicionada por grama de suspensão.

A Figura 4.12 ilustra o perfil de consumo de substrato, de variação do pH e de formação de produtos em função do tempo da SIF conduzida com mais alta concentração de enzima dentre as avaliadas ( $228 \times 10^3 \text{ UI.L}^{-1}$ ) e concentração celular inicial de 20g.L<sup>-1</sup>.

**Figura 4.12** – SIF de 65g.L<sup>-1</sup> de xilose a 35 °C e 150 rpm catalisada por IGI-Ch/*S. cerevisiae* (38:4). (a) perfil de consumo de substrato e de variação do pH, (b) perfil de formação de produtos. □



NOTA: Relação biocatalisador/meio (1g.1mL<sup>-1</sup>). Concentração inicial de células no reator: 20g.L<sup>-1</sup>. Concentração de GI no reator: 228×10<sup>3</sup> UI.L<sup>-1</sup>. pH<sub>0</sub> 5,5 e pH<sub>f</sub> 4,7. Cada ponto no gráfico representa a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

Os resultados apresentados na Figura 4.12 mostram que os principais produtos da SIF foram etanol e xilitol. Glicerol e ácido acético também foram produzidos, porém em concentrações inferiores a 4 e 2g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Verificou-se que havia xilose remanescente mesmo após 48 h de SIF. A redução na velocidade de consumo de xilose está relacionada à diminuição do pH do meio reacional. Nos resultados da SIF apresentados na Figura 4.12 verifica-se que o pH diminuiu de 5,5 para 4,7. Mesmo o biocatalisador contendo elevada carga de enzima (38%, equivalente ao limite físico de coimobilização, mantidos os 4%

de levedura no pellet) não foi robusto o suficiente para manter níveis de isomerização apreciáveis para manutenção da fermentação a baixos pHs. Como se sabe, pHs inferiores a 5,0 tem efeito muito negativo sobre a atividade de GI. Nessa condição, a enzima torna-se praticamente inativa. A diminuição do pH e o consumo incompleto do açúcar se repetiu para os experimentos discutidos nesta seção.

Durante a fermentação, a diminuição do pH do meio naturalmente ocorre devido a metabolização do açúcar pela levedura, que conduz à formação de ácidos orgânicos. Além do acetato, o succinato é citado como um dos produtos minoritários da fermentação de xilulose por *S. cerevisiae* que podem contribuir para a diminuição do pH do meio (JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002). Contudo, no atual estudo a queda de pH não estava relacionada apenas à formação de ácidos. Durante adição dos pellets (curados em solução de cloreto de magnésio e cloreto de cobalto) ao meio de SIF preparado em pH 6,0, ocorria uma diminuição do pH do meio para valores entre 5,6 e 5,3.

A Tabela 4.5 apresenta um panorama geral dos resultados obtidos nas SIFs de xilulose com as diferentes cargas de enzima (mantidos  $20\text{g.L}^{-1}$  de células no reator) e de levedura (mantidos  $30 \times 10^3 \text{ UI.L}^{-1}$  no reator). De modo geral, a conversão de substrato foi favorecida com o aumento da carga de enzima no reator, chegando a 91,1% em 48 horas. Em termos da produção de etanol, a concentração mais elevada  $16,7 \pm 1,4\text{g.L}^{-1}$  também foi obtida no ensaio com a mais elevada concentração de enzima. Concentrações importantes de xilitol também foram verificadas em todos os experimentos. A concentração mais elevadas deste composto (cerca de  $14\text{g.L}^{-1}$ ) foi verificada nos experimentos com as mais elevadas concentrações de levedura. As produtividades volumétricas máximas do etanol, calculadas até 6 horas de reação, foram semelhantes (quando mantinha-se fixa a concentração de células), permanecendo no intervalo  $0,64\text{-}0,68\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Até 9 horas de ensaio, o pH do meio em todos os ensaios era  $\geq 5,0$  o que significa que a enzima permanecia ativa, disponibilizando xilulose para a levedura. Nesse ponto, a produtividade volumétrica dependia essencialmente da massa de células viáveis no reator, visto que o processo não estava limitado por ausência de substrato para a levedura. A produtividade volumétrica global do etanol variou entre  $0,20$  e  $0,33\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Mesmo sendo resultante de um processo não otimizado, estes valores são superiores ao resultado descrito na literatura ( $0,06\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) (CHANDRAKANT; BISARIA, 2000).

**Tabela 4.5** – Parâmetros da SIF de 65g.L<sup>-1</sup> de xilose a 35 °C e 150 rpm, catalisada por glicose isomerase imobilizada (IGI-Ch) e *S. cerevisiae* coimobilizadas em alginato de cálcio.

Biocatalisador	IGI-Ch <sup>a</sup> (U.LL <sup>-1</sup> )	Levedura <sup>b</sup> (g <sub>cms</sub> .L <sup>-1</sup> )	t (h)	X <sup>c</sup> (%)	ETOH <sup>c</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	XOH <sup>c</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Pr Max ETOH (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr ETOH (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr Max XOH (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr <sup>c</sup> XOH (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Y <sub>ETOH/S</sub> <sup>c</sup> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>XOH/S</sub> <sup>c</sup> (g.g <sup>-1</sup> )	S <sub>ETOH/XOH</sub> <sup>c</sup> (mol.mol <sup>-1</sup> )	pH <sub>0</sub> /pH <sub>6</sub> /pH <sub>24</sub> /pH <sub>48</sub>
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:4)	30×10 <sup>3</sup>	20	48	77,2	12,0	9,5	0,65±0,01	0,25	0,22±0,01	0,20	0,24	0,19	4,2	5,3/5,0/4,8/4,7
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:4)	120×10 <sup>3</sup>	20	48	88,8	15,9	7,8	0,68±0,07	0,33	0,17±0,02	0,16	0,28	0,14	6,7	5,5/5,3/5,0/4,8
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4)*	228×10 <sup>3</sup>	20	48	91,1	16,7±1,4	9,2±1,9	0,65±0,02	0,33	0,25±0,05	0,19±0,04	0,28±0,02	0,15±0,03	6,2±1,8	5,5/5,2/5,0/4,7
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (2:5)	30×10 <sup>3</sup>	10	48	80,5	11,4	7,4	0,43±0,03	0,23	0,18±0,03	0,15	0,22	0,14	5,2	5,5/5,1/4,9/4,9
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:8)	30×10 <sup>3</sup>	40	46	83,2	9,4	14,3	1,12±0,08	0,20	0,40±0,02	0,31	0,17	0,26	2,2	5,6/5,1/4,8/4,5
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:16)	30×10 <sup>3</sup>	80	46	86,4	12,8	14,2	1,78±0,10	0,28	0,51±0,05	0,31	0,23	0,25	3,0	5,4/5,0/4,9/4,8

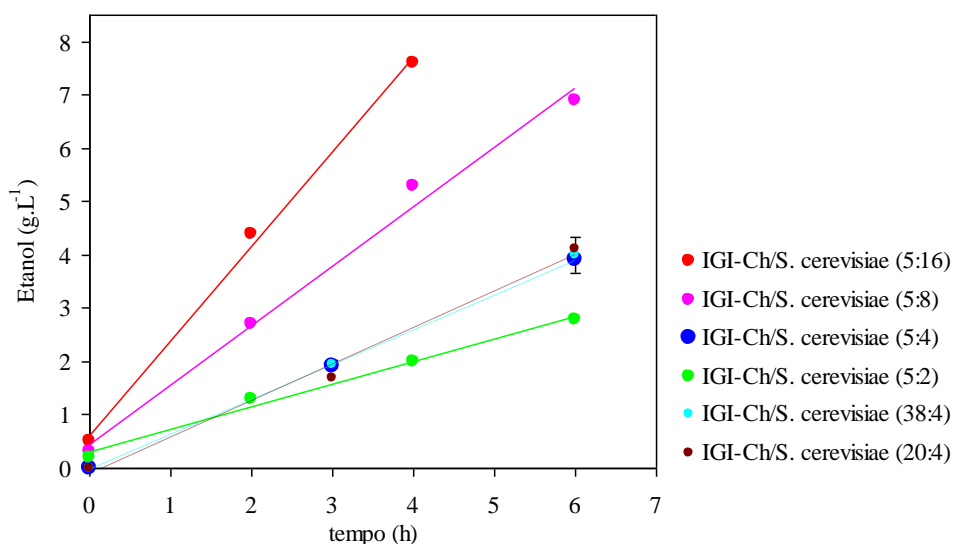
NOTA:<sup>a</sup>Concentração de enzima do reator. <sup>b</sup>Concentração inicial de células em massa no reator. t: tempo final da SIF, <sup>c</sup>Determinado no tempo final da SIF. ETOH: etanol, XOH: xilitol, S:substrato, Pr<sub>máx</sub>: produtividade máxima (calculada a partir da tangente do gráfico de produto *versus* tempo, na faixa linear), Pr: produtividade global (calculada no tempo final da SIF), Y<sub>ETOH/S</sub>: rendimento do etanol em relação ao substrato consumido, Y<sub>XOH/S</sub>: rendimento do xilitol em relação ao substrato consumido, X: conversão, S<sub>ETOH/XOH</sub>: seletividade do etanol em relação ao xilitol, \*média de três experimentos independentes ± desvio padrão. pH<sub>0</sub>/pH<sub>6</sub>/pH<sub>24</sub>/pH<sub>48</sub>: os índices 0, 6, 24 e 48 correspondem ao tempo de reação, em horas. Empregou-se uma relação biocatalisador/meio (1g.1mL<sup>-1</sup>).



Na Tabela 4.5, as produtividades volumétricas máximas do xilitol variaram entre 0,17 e 0,51 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, aumentando à medida que se eleva a concentração de células no reator. Os rendimentos em etanol mais elevados foram obtidos à medida que se aumentou a quantidade de enzima no reator, variando de 0,24 a 0,35±0,03 g por g de substrato consumido para os biocatalisadores contendo 5 e 38% de enzima, respectivamente. Similarmente, a seletividade do etanol em relação ao xilitol foi favorecida com o aumento da concentração de enzima no reator.

Como previsto, as concentrações iniciais do etanol (nas primeiras 6 horas) aumentaram consideravelmente quando a concentração inicial de células foi elevada (Figura 4.13). A partir das retas tangentes apresentadas na Figura 4.13, determinou-se as produtividades volumétricas máximas do etanol: 0,43; 0,65; 1,12 e 1,78 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para as SIFs com os biocatalisadores contendo 2, 4, 8 e 16% de levedura, respectivamente. De fato, a maior concentração de células resultou num aumento de produtividade da ordem de 4 vezes em relação à menor concentração.

**Figura 4.13** – Concentrações de etanol no início da SIF de 65 g.L<sup>-1</sup> de xilose a 35°C em diferentes concentrações de levedura no reator.



Na Figura 4.13, retoma-se os resultados anteriormente descritos, em que a concentração de enzima IGI-Ch não teve influência sobre a velocidade inicial de produção de etanol quando se manteve a concentração de levedura constante.

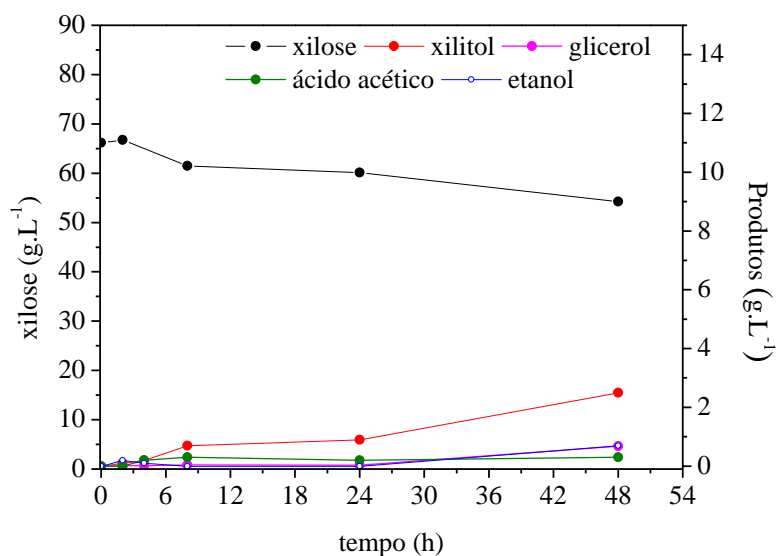
Mesmo nas concentrações celulares mais elevadas (8 e 16% no pellet), a conversão total de xilose não foi alcançada devido à ineficiente isomerização da xilose. Nestes dois experimentos, xilulose estava presente no meio reacional, em quantidades mensuráveis,

apenas até 9 horas de ensaio. Sua ausência a partir desse ponto indicava que o processo estava limitado pela etapa de isomerização. Já no experimento com a menor concentração celular (2% de levedura por grama de pellet), a presença de xilulose foi detectada, mesmo que em pequenas quantidades, até 48 h. Neste caso, o consumo de substrato certamente estava sendo influenciado pela velocidade de fermentação, além da isomerização, indicando, portanto, que concentrações celulares mais elevadas devem ser utilizadas para elevar a velocidade de consumo.

Em síntese, como os resultados finais da SIFs de xilose foram influenciados pelo efeito do pH baixo, não foram totalmente conclusivos no que diz respeito a concentrações de enzima e levedura mais adequadas para realização da SIF. Entretanto, deram um indicativo da direção a seguir. O biocatalisador ideal para o processo deve conter uma quantidade de enzima elevada (superior a 5%), no sentido a favorecer a seletividade do etanol em relação ao xilitol e uma concentração celular intermediária entre as estudadas. Se por um lado, as mais baixas concentrações de células no reator conduziram a baixas produtividades, por outro, concentrações celulares mais elevadas diminuíram a seletividade do etanol em relação ao xilitol.

Na análise preliminar dos resultados, presumia-se que a formação de xilitol poderia estar sendo favorecida pela ineficiente isomerização da xilose. Supostamente, na ausência de xilulose as células metabolizariam xilose para produzir xilitol. Para elucidar esta questão, foi realizado um experimento de fermentação de xilose com elevada concentração de levedura no reator ( $85\text{g.L}^{-1}$ ), nas mesmas condições descritas para a SIF. Como resultado, verificou-se uma baixíssima produção de xilitol; cerca de  $2,5\text{g.L}^{-1}$ , em 48 horas. Glicerol, ácido acético e etanol foram detectados, porém o somatório das suas concentrações era inferior a  $2\text{g.L}^{-1}$  (Figura 4.14). Similarmente, Gong et al. (1981) verificaram que em condições fermentativas, *S. cerevisiae* consome lentamente xilose para produzir xilitol, mas não etanol. Diante do resultado da fermentação, pôde-se supor que a elevada concentração de xilitol verificada nos experimentos em discussão era proveniente da metabolização de xilulose pela levedura.

**Figura 4.14** – Fermentação de xilose com *S. cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato de cálcio, a 35°C, pH<sub>0</sub> 5,4 e 150 rpm. Biocatalisador (17% de levedura em massa seca e 5% de gel de quitosana sem GI). Razão biocatalisador:meio (1:1).



A literatura reporta que a formação de xilitol a partir de xilulose, mediada por xilitol desidrogenase, tem equilíbrio favorável à produção de xilitol (RIZZI et al., 1989). Quando xilulose é rapidamente captada pelas células, xiluloquinase pode tornar-se saturada com o substrato, gerando uma espécie de bloqueio ao fluxo metabólico pela via pentose fosfato (LASTICK et al., 1989). Dessa forma, certas quantidades de xilitol naturalmente são excretadas pelas células, resultando na diminuição da produção de etanol. De fato, a formação de xilitol a partir de xilulose foi comprovada no grupo de pesquisa no qual está inserido o atual estudo, mediante realização de um experimento de fermentação da mistura xilulose-xilose (59g.L<sup>-1</sup>/9g.L<sup>-1</sup>) pela levedura *S. cerevisiae* de panificação. Durante a fermentação, xilose não foi consumida. Entretanto, xilulose foi convertida em cerca de 5 horas, gerando principalmente etanol e xilitol, sendo que este último era o produto majoritário (AQUINO, 2013). Entende-se, portanto, que a otimização da fermentação de xilulose para a máxima produção de etanol depende de um melhor entendimento da regulação das enzimas-chave na metabolização do açúcar.

É importante destacar que o xilitol também tem um importante valor agregado que não pode ser desconsiderado. Do ponto de vista econômico, deve-se estudar as vantagens e/ou limitações de um processo que gera concomitantemente etanol e xilitol, pois, o aproveitamento de ambas as frações agregaria ao processo global etapas adicionais de separação e purificação.

Como a formação de xilitol a partir de xilulose é uma característica inerente ao microrganismo, um ajuste rigoroso do processo SIF para a produção de etanol ou xilitol torna-

se um campo vasto para pesquisa. Nesse sentido, a seleção de linhagens da levedura com características apropriadas é uma alternativa no sentido de aumentar a produtividade para um destes dois produtos.

De modo geral, pode-se afirmar que SIFs de xilose conduzidas com elevadas concentrações de enzima no reator ( $120-228 \times 10^3$  U.I.L<sup>-1</sup>) conduzem a resultados muito semelhantes em termos de conversão, produtividade, rendimento e seletividade em etanol.

#### 4.3.1.1 Avaliação da viabilidade e do crescimento celular na SIF de xilose em batelada

Os resultados apresentados na Tabela 4.6 indicam que as condições adotadas para realização de SIF de xilose, cujos resultados foram apresentados no item anterior, foram adequadas para manutenção de elevadas concentrações de células viáveis durante todo período da SIF. A manutenção dessa característica por longos períodos de tempo é fundamental para a viabilização de um processo contínuo de produção de etanol.

**Tabela 4.6**– Viabilidade e concentração celular na SIF de 65g.L<sup>-1</sup> de xilose a 35°C com diferentes biocatalisadores.

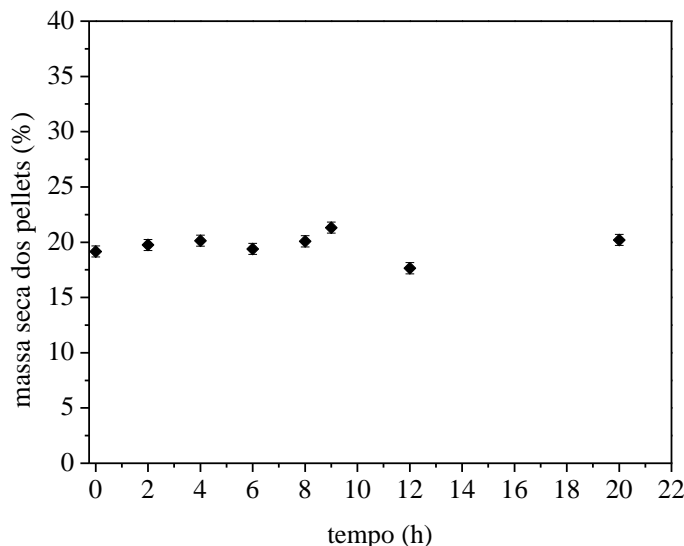
<b>Biocatalisador</b>	<b>tempo* (h)</b>	<b>Vi (%)</b>	<b>Vf (%)</b>	<b>Células viáveis/mL Inicial</b>	<b>Células viáveis/mL final</b>
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:4)	48	85	85	$3,99 \times 10^8$	$4,05 \times 10^8$
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:4)	48	83	91	$4,52 \times 10^8$	$5,44 \times 10^8$
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4)	48	96	96	$4,75 \times 10^7$	$5,13 \times 10^7$
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (2:5)	48	97	96	$3,07 \times 10^8$	$2,82 \times 10^8$
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:8)	46	96	98	$1,43 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:16)	46	97	99	$2,06 \times 10^9$	$2,00 \times 10^9$

NOTA: \*tempo total do ensaio, Vi: viabilidade inicial, Vf: viabilidade final.

No intuito de investigar a ocorrência de crescimento celular durante o processo em estudo, pellets recolhidos ao longo da SIF de xilose foram utilizados para determinação da massa seca. Os resultados apresentados na Figura 4.15 indicam que não ocorreu crescimento celular considerável até 20 horas de ensaio. De fato, este resultado era esperado, uma vez que a literatura reporta que o tempo de duplicação de *S. cerevisiae* em xilulose é superior a 30 horas (JOHANSSON e HAHN-HÄGERDAL, 2002). Ademais, as condições em que foram conduzidos os experimentos (tubos falcon fechados), foram programadas para favorecer a fermentação em detrimento do crescimento celular. De todo modo, existia certo nível de

oxigênio disponível no volume não ocupado pelo líquido, contudo, se houve crescimento, não foi apreciável segundo a metodologia adotada.

**Figura 4.15** – Massa seca dos pellets – biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10) – na SIF de xilose a 35°C e 150 rpm



### 4.3.2 Influência da composição do meio na produção de etanol

Sabendo que a fermentação de açúcares pode ser influenciada pela composição do meio, no atual estudo avaliou-se a influência das fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura e peptona de soja) sobre a produção de etanol e outros parâmetros da SIF de xilose, mediante ensaios de exclusão destes compostos do meio reacional. O meio de referência (Meio A), utilizado para comparação, continha todos os nutrientes em questão. A composição detalhada dos meios utilizados encontra-se no item 3.2. Resumidamente, os meios foram classificados da seguinte forma:

Meio A: meio de referência.

Meio B: meio A com eliminação da peptona de soja.

Meio C: meio A com eliminação do extrato de levedura.

Meio D: meio A com eliminação de extrato de levedura e peptona de soja.

O biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (38:4) foi selecionado para o estudo por apresentar a maior carga de enzima imobilizada dentre aqueles testados. Uma carga elevada de enzima favoreceria a isomerização e possibilitaria um estudo isento da influência da limitação de substrato para a levedura.

Os resultados apresentados na Tabela 4.7 indicam que o suplemento de peptona de soja e extrato de levedura ao meio de SIF, seja individualmente ou em combinação, não favoreceu a produção de etanol em batelada. A concentração de etanol variou entre  $13,6 \pm 0,9 \text{ g.L}^{-1}$  e  $15,1 \text{ g.L}^{-1}$  para os experimentos contendo os dois nutrientes e com exclusão de ambos, respectivamente. Considerando que existe um erro de aproximadamente 7% nas concentrações de etanol obtidas em experimentos independentes na mesma condição (verificado no experimento com meio A), pode-se apontar que não há vantagem prática na adição das duas fontes de nitrogênio ao meio de SIF de xilose, em termos da produção de etanol. Pelo contrário, aparentemente ocorre uma discreta melhoria na produção na ausência desses nutrientes. Similarmente, tanto a produtividade volumétrica quanto a seletividade do etanol em relação ao xilitol não foram reduzidas quando se disponibilizou meio mínimo para a levedura (Meio D). Estes resultados são interessantes, pois o uso de meios mínimos em comparação com meios complexos é economicamente muito vantajoso. O uso de peptona e extrato de levedura eleva o custo da produção.

**Tabela 4.7** – SIF de xilose  $65 \text{ g.L}^{-1}$  com biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (38:4) em diferentes meios a  $35^\circ\text{C}$  e 150 rpm.

Substrato	ETOH <sup>a</sup> ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Prod <sub>ETOH</sub> <sup>b</sup> ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	XOH <sup>a</sup> ( $\text{g.L}^{-1}$ )	S <sub>ETOH/XOH</sub> ( $\text{Mol.mol}^{-1}$ )	Conversão (%)	pH <sub>0</sub> /pH <sub>6</sub> /pH <sub>24</sub> <sup>c</sup>
Meio A*	$13,6 \pm 0,9$	$0,67 \pm 0,06$	$5,9 \pm 1,3$	$7,9 \pm 1,8$	$74 \pm 1$	5,5/5,2/5,0
Meio B	13,3	0,78	5,7	7,7	71	5,3/5,0/4,7
Meio C	13,9	0,73	5,7	8,1	75	5,3/5,0/4,7
Meio D	15,1	0,78	5,7	8,7	77	5,3/5,0/4,7

NOTA: \*média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. ETOH: etanol, XOH: xilitol, S<sub>ETOH/XOH</sub>: seletividade do etanol em relação ao xilitol em  $t=24$  h, <sup>a</sup>concentração em  $t=24$  h (final), <sup>b</sup>produtividade volumétrica máxima, calculada até 6 h. <sup>c</sup>os índices 0, 6 e 24 correspondem aos respectivos tempos de reação, em horas. Concentração inicial de células:  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Concentração de IGI-Ch:  $228 \times 10^3 \text{ U.I.L}^{-1}$

Na Tabela 4.7 verifica-se ainda que o açúcar disponibilizado ( $65 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose) não foi completamente convertido após 24 horas de experimento. Para o conjunto de ensaios em questão, de 71 a 77% do açúcar foi convertido. Similarmente ao ocorrido nos experimentos descritos na seção anterior, houve diminuição no pH do meio durante os experimentos: a variação foi de 5,3 para 5,0 após seis horas de ensaio e finalmente para 4,7 passadas 24 horas. A queda de pH certamente influenciou negativamente na conversão de xilose ao substrato utilizado pela levedura (xilulose), porém esta não foi a única razão para o consumo incompleto do açúcar. Pode-se verificar na Tabela 4.8 que havia xilulose disponível, às 24 horas de experimento, mesmo na condição de pH baixo. Desse modo, pode-se afirmar que a SIF também

estava limitada pela etapa de fermentação da xilulose. Esta limitação possivelmente estava relacionada à concentração de levedura no reator ( $20\text{g.L}^{-1}$ ), baixa em relação aos valores tipicamente descritos na literatura para a fermentação de xilulose.

No sentido de avaliar a recuperação de carbono na SIF de xilose sob as condições adotadas, foram efetuados os balanços de carbono para os quatro ensaios discutidos neste item. Os resultados são apresentados na Tabela 4.8. Em todos os casos, cerca de 25% do carbono utilizado não pôde ser contabilizado nos produtos analisados. Isto significa que a quantidade de carbono presente nos produtos era inferior à quantidade de carbono consumido. Essa baixa recuperação de carbono pode estar associada a valores subestimados de produção. Nesse sentido, realizar o monitoramento da produção de  $\text{CO}_2$  durante os experimentos seria uma importante alternativa para o ganho de informação do processo.

**Tabela 4.8** – Balanço de massa de carbono, recuperação de carbono e rendimentos de etanol para SIFs de xilose 65g.L<sup>-1</sup> em batelada com o biocatalisador (IGI-Ch/S. *cerevisiae* 38:4) a 35°C às 24 horas.

Composto	Massa molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Meio A*		Meio B		Meio C		Meio D	
		Conc. final	Carb.	Conc. Final	Carb.	Conc. Final	Carb.	Conc. Final	Carb.
		(g.L <sup>-1</sup> )	(g)	(g.L <sup>-1</sup> )	(g)	(g.L <sup>-1</sup> )	(g)	(g.L <sup>-1</sup> )	(g)
Xilose	150	14,1 ± 0,8	0,045±0,002	16,9	0,054	14,9	0,048	12,2	0,039
Xilulose	150	2,5 ± 0,9	0,008±0,003	1,7	0,006	1,5	0,005	2,6	0,008
Etanol	46	13,6 ± 0,9	0,057±0,004	13,3	0,055	13,9	0,058	15,1	0,063
<sup>a</sup> CO <sub>2</sub>	44	13,9 ± 0,7	0,030±0,002	13,5	0,030	14,2	0,031	15,0	0,033
Xilitol	152	5,9 ± 1,3	0,018±0,004	5,7	0,018	5,7	0,018	5,8	0,018
Glicerol	92	2,4 ± 0,7	0,007±0,002	1,7	0,006	1,4	0,004	2,2	0,007
Ácido acético	60	1,3 ± 0,3	0,004±0,001	1,0	0,003	1,2	0,004	0,8	0,002
<sup>b</sup> Carbono <i>out</i>	.....		0,118±0,006	.....	0,111	.....	0,115	.....	0,123
<sup>c</sup> Carbono <i>in</i>	.....		0,155±0,001	.....	0,149	.....	0,155	.....	0,161
<sup>d</sup> Carbono recuperado (%)	.....		75,7 ± 4,2	.....	75,0	.....	74,0	.....	76,9
g ETOH/g açúcar consumido.....			0,28 ± 0,02	.....	0,29	.....	0,29	.....	0,30

NOTA: \* média de três experimentos independentes ± desvio padrão. <sup>a</sup>A produção de CO<sub>2</sub> não foi medida, porém foi estimada com base na estequiometria 1:1 na formação de etanol e 1:1 na formação de ácido acético (KUYPER et al., 2005). <sup>b</sup>Carbono *out*: concentração total de carbono nos produtos do metabolismo da levedura em t=24 h. <sup>c</sup>Carbono *in*: concentração total de carbono no açúcar consumido em t=24 h. <sup>d</sup>O percentual de carbono recuperado foi calculado como a razão entre o conteúdo total de carbono nos produtos formados dividido pela quantidade total de carbono no açúcar consumido.

Meio A: meio de referência. Contém todos os nutrientes (Tabela 3.1).

Meio B: meio A com eliminação da peptona de soja.

Meio C: meio A com eliminação do extrato de levedura.

Meio D: meio A com eliminação de extrato de levedura e peptona.

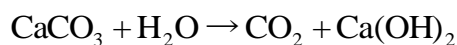
Carb.: carbono.



É evidente que a coleta de dados de CO<sub>2</sub> implica na utilização reatores adequadamente dotados de analisador de gases. Como os ensaios do atual estudo foram conduzidos em frascos, realizar a instalação de tal aparato era uma tarefa impraticável. Outra hipótese provável para a baixa recuperação de carbono é acúmulo de intermediários da via pentose fosfato não-oxidativa. Um estudo da fermentação de xilulose por *S. cerevisiae* indicou que a baixa taxa de produção de etanol estava relacionada ao bloqueio na via das pentoses fosfato causado pelo acúmulo de sedoheptulose 7-fosfato (S7P). No mesmo estudo, os autores verificaram que cerca de 25% do carbono consumido não foram contabilizados nos produtos (SENAC; HAHN-HÄGERDAL, 1990). A literatura reporta ainda que a via pentose fosfato não-oxidativa controla as velocidades de crescimento e de fermentação de *S. cerevisiae* em xilulose. Esse fenômeno foi comprovado em estudos de superexpressão de enzimas da via metabólica (ribulose 5-fosfato epimerase, ribose 5-cetol isomerase, transaldolase e transcetolase) com os quais se comprovou a melhoria nas velocidades de fermentação e de crescimento em comparação com a levedura sem as alterações genéticas (JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002). Na Tabela 4.8 foram descritos ainda os rendimentos do etanol em relação ao substrato consumido no tempo final da SIF (24 horas). Os valores obtidos 0,28±0,02; 0,29; 0,29 e 0,30g.g<sup>-1</sup> no processo conduzido com os meios A, B, C e D, correspondem respectivamente a 55, 57, 57 e 59% do teórico.

Tendo em vista os resultados apresentados neste item, adotou-se o Meio D (composição descrita no item 3.2) para novos experimentos de SIF de xilose.

Nessa etapa do trabalho, a questão mais crucial a ser solucionada para a viabilização técnica do processo SIF de xilose em batelada era a definição de estratégias adequadas para a manutenção do pH do meio em valores nos quais a atividade da enzima glicose isomerase fosse mantida, ou seja, superior a 5,0. Nesse sentido, Aquino (2013), sob a supervisão da orientadora do atual estudo, incorporou carbonato de cálcio à etapa de coimobilização da glicose isomerase imobilizada e levedura de panificação e comprovou que após adição do sal, o pH do meio de SIF em batelada foi mantido entre 5,4 e 5,6. A estratégia se baseou no fato de que o carbonato de cálcio é um sal com características básicas que aumenta o pH de soluções aquosas após sofrer uma hidrólise e produzir a base Ca(OH)<sub>2</sub>.



### 4.3.3 Novas estratégias para condução da SIF de xilose

As estratégias para manutenção do pH do meio de SIF em valores adequados para a retenção da atividade da glicose isomerase incluíram a adição de  $\text{CaCO}_3$  (0,5%, m/m) à etapa de coimobilização enzima/levedura e a cura dos pellets no próprio meio de SIF (sem xilose) em pH 5,6. Nesta etapa do estudo, utilizou-se o meio de cultivo simples (Meio D, descrito no item 3.2) visto que a adição de peptona de soja e extrato de levedura não agregou vantagens práticas para o processo SIF em batelada, como discutido anteriormente. A concentração dos componentes do meio usado para a cura dos pellets era metade daquela descrita para o Meio D.

A Tabela 4.9 apresenta um panorama comparativo entre parâmetros do processo SIF de xilose na configuração antiga e após a adoção das estratégias descritas acima. Os resultados obtidos por Aquino (2013), destacados na Tabela 4.9 confirmam a importância da manutenção do pH num nível superior a 5,0 para a condução da SIF de forma eficiente. Nos ensaios onde o carbonato de cálcio estava presente, o pH foi mantido entre 5,4 e 5,6 e parâmetros do processo como conversão e produtividade foram melhorados de forma expressiva em comparação ao sistema na configuração antiga, no qual o pH final chegava a 4,7. A combinação de pH controlado com elevada concentração de células no reator ( $85\text{g.L}^{-1}$ ), resultou no consumo rápido do substrato: 96% da xilose disponibilizada foi consumida em apenas 9 horas de ensaio. Por outro lado, o ensaio similar em termos de concentração de enzima ( $30 \times 10^3 \text{UI.L}^{-1}$ ) e células no reator ( $80\text{g.L}^{-1}$ ), porém sem controle do pH, resultou numa conversão de 86% em 46 horas. Nesse par de experimentos, a produtividade volumétrica global do etanol foi consideravelmente melhorada, passando de 0,28 para  $2,44 \pm 0,26\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . O rendimento em etanol também foi melhorado com o controle do pH, passando de 0,23 para  $0,34 \pm 0,04\text{g.g}^{-1}$ , que correspondem a 45 e 67% do teórico, respectivamente. Já o rendimento em xilitol foi mantido em cerca de  $0,25\text{g.g}^{-1}$  de substrato consumido. Dessa forma, houve um aumento também na seletividade que passou de 3,0 para  $4,2\text{mol.mol}^{-1}$ .

**Tabela 4.9** – Influência da adição do CaCO<sub>3</sub> nos parâmetros da SIF de xilose 65g.L<sup>-1</sup> a 35 °C e 150 rpm, catalisada por IGI-Ch e *S. cerevisiae* de panificação coimobilizadas em alginato de cálcio

<b>Biocatalisador</b>	<b>Enzima</b> <b>UI.L<sup>-1</sup></b>	<b>Levedura</b> <b>(g<sub>cms</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo<sup>c</sup></b> <b>(h)</b>	<b>X</b> <b>(%)</b>	<b>Pr<sub>ETOH</sub></b> <b>(g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pr<sub>XOH</sub></b> <b>(g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>EOH/S</sub></b> <b>(g.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>XOH/S</sub></b> <b>(g.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>ETOH/XOH</sub></b> <b>(mol.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>pH<sub>i</sub>/pH<sub>f</sub></b>
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:16) <sup>a</sup>	30×10 <sup>3</sup>	80	46	86	0,28	0,31	0,23	0,25	3,0	5,4/4,8
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (5:17)+CaCO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	30×10 <sup>3</sup>	85	9	96	2,44±0,26	1,90±0,12	0,34±0,04	0,26±0,02	4,2±0,2	5,6/5,4
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (38:4) <sup>a</sup>	228×10 <sup>3</sup>	20	48	91	0,33	0,19±0,04	0,28±0,02	0,15±0,03	6,2±1,8	5,5/4,7
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:4) <sup>a</sup>	120×10 <sup>3</sup>	20	48	89	0,33	0,16	0,28	0,14	6,7	5,5/4,8
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:5)+CaCO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	120×10 <sup>3</sup>	25	24	97	0,67±0,04	0,34±0,04	0,24 ± 0,01	0,12±0,01	6,7±1,2	5,6/5,5
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (10:10)+CaCO <sub>3b</sub>	60×10 <sup>3</sup>	50	11	99	2,04±0,12	0,81±0,17	0,34±0,02	0,13±0,02	8,5±1,3	5,6/5,4
IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)+CaCO <sub>3b</sub>	120×10 <sup>3</sup>	50	11	96	2,07±0,17	0,85±0,06	0,35±0,02	0,14± 0,01	7,3±3,3×10 <sup>-2</sup>	5,4/5,4

NOTA: <sup>a</sup>Processo conduzido sem controle do pH, <sup>b</sup>Processo conduzido com adição de CaCO<sub>3</sub> para controle do pH (Aquino, 2013), <sup>c</sup>tempo total da SIF, EOH: etanol, XOH: xilitol, Y<sub>EOH/S</sub>: rendimento do etanol em relação ao substrato consumido, Y<sub>XOH/S</sub>: rendimento do xilitol em relação ao substrato consumido, Pr: produtividade volumétrica global, calculada no tempo final da SIF, X: conversão, calculada no tempo final da SIF, S<sub>ETOH/XOH</sub>: seletividade do etanol em relação ao xilitol, pH<sub>i</sub>/pH<sub>f</sub>: pH inicial/pH final.

Foi sugerido, na discussão dos resultados das SIFs de xilose sem adição de  $\text{CaCO}_3$ , que o processo conduzido com uso do biocatalisadores contendo as mais baixas cargas de levedura apresentavam duas limitações importantes: uma relacionada à diminuição do pH e a outra inerente à concentração de células no reator. Esse fenômeno ficou comprovado no novo ensaio com pH controlado onde se verificou que uma carga de levedura de  $25\text{g.L}^{-1}$ , referente ao processo conduzido com uso do biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:5) requeria 24 horas para converter 97% do açúcar disponibilizado, mais que o dobro do tempo do processo conduzido com  $50\text{g.L}^{-1}$  de células no reator.

Na Tabela 4.9, mesmo nos ensaios sem controle de pH, havia um indicativo de que concentrações de enzima entre  $120 \times 10^3$  e  $228 \times 10^3$  UI.L<sup>-1</sup> correspondentes ao uso dos biocatalisadores IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:4) e IGI-Ch/*S. cerevisiae* (38:4), respectivamente, conduziam a resultados muito semelhantes em termos de conversão, produtividade, rendimento e seletividade, mantida fixa a concentração inicial de células. De fato, esta indicação foi confirmada, agora no sistema de SIF com carbonato de cálcio, mediante ensaios onde se manteve fixa a concentração de células no reator em  $50\text{g.L}^{-1}$  e enquanto a concentração de enzima variava de  $60 \times 10^3$  para  $120 \times 10^3$  UI.L<sup>-1</sup>. Mais uma vez, os resultados foram semelhantes e considerou-se que, mesmo a carga de  $60 \times 10^3$  UI. L<sup>-1</sup> era adequada para condução da SIF de xilose de forma eficiente. Nos dois casos, as produtividades volumétricas em etanol foram cerca de 85% daquela obtida com a mais elevada carga de levedura no reator ( $85\text{g.L}^{-1}$ ). A mais elevada seletividade do etanol em relação ao xilitol ( $8,5 \pm 1,3\text{mol.mol}^{-1}$ ) foi verificada nos experimentos cuja concentração de levedura era  $50\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.3.3.1 SIF de xilose com biocatalisador IGI-Aga/*S. cerevisiae*

Os resultados mostrados anteriormente foram obtidos utilizando o derivado IGI-Ch coimobilizado com levedura nos experimentos de SIF de xilose. Neste item, o uso do biocatalisador IGI-Aga/*S. cerevisiae* (5:10), preparado mediante a coimobilização da levedura de panificação com o derivado de glicose isomerase imobilizada em glioxil-agarose é avaliado. Como ilustrado na Tabela 4.10 o derivado foi eficiente em promover a isomerização da xilose, visto que 95% deste açúcar foi convertido em 20 horas de SIF. Contudo, o processo resultou em elevada produção de xilitol ( $15,2\text{g.L}^{-1}$ ). A concentração desse componente era praticamente igual à concentração do etanol verificada ( $17,4\text{g.L}^{-1}$ ). Dessa forma, uma baixa seletividade do etanol em relação ao xilitol foi verificada. Similarmente, um baixo rendimento em etanol,  $0,28\text{g.g}^{-1}$  foi verificado.

**Tabela 4.10** – Parâmetro da SIF de xilose 65g.L<sup>-1</sup> a 35°C e 150 rpm catalisada dor IGI-Aga/*S. cerevisiae* (5:10).

<b>Tempo (h)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>Pr<sub>ETOH</sub> (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pr<sub>XOH</sub> (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>EOH/S</sub> (g.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>XOH/S</sub> (g.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>S<sub>ETOH/XOH</sub> (mol.mol<sup>-1</sup>)</b>
20	95	0,87	0,76	0,28	0,25	3,8

Pr: produtividade global, Y: rendimento, S: seletividade.

Os resultados da SIF com o derivado IGI-Aga/*S. cerevisiae* (5:10), demonstram que seu uso não resultou em vantagens adicionais ao processo. Além disso, agarose é um suporte caro e o protocolo de imobilização requer uso de muitos insumos químicos, além de causar perdas consideráveis de atividade da enzima, parte durante a necessária aminação e parte na etapa de imobilização. Esses fatos direcionaram para a seleção dos biocatalisadores IGI-Ch/*S. cerevisiae* para continuidade dos estudos.

#### 4.3.3.2 Seleção de biocatalisadores para o SIF de xilose em operação contínua

Os resultados apresentados na Tabela 4.9, projetaram três biocatalisadores dentre os avaliados como boas opções para condução da SIF de xilose em modo de operação contínua: IGI-Ch/*S. cerevisiae* (5:17), o IGI-Ch/*S. cerevisiae* (10:10) e IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10) por dirigirem o processo a elevadas produtividades em etanol. Especialmente os dois últimos apresentaram desempenhos similares em termos de conversão, produtividade e seletividade ao etanol. A opção pelo IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10) se baseou no fato deste possuir a mais elevada carga de enzima dentre as alternativas. Como no processo contínuo o catalisador estará sujeito por longos períodos a condições sub-ótimas para sua atividade e estabilidade como, por exemplo, pH e temperatura baixos, presença de etanol e xilitol, descrito como inibidor, uma carga de enzima elevada supostamente favoreceria a operação em longos períodos. Os resultados da SIF em batelada conduzida com o biocatalisador selecionado indicam que um tempo de residência mínimo de 11 horas seria adequado para início dos estudos da SIF em modo contínuo, uma vez que 62,4g.L<sup>-1</sup> dos 65g.L<sup>-1</sup> de xilose disponibilizados foram convertidos nesse intervalo de tempo.

## 4.4 PRODUÇÃO DO HIDROLISADO DE HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE CANA E SUA UTILIZAÇÃO NO PROCESSO SIF

Nesta seção serão apresentados os resultados referentes à preparação do hidrodrolisado de hemicelulose de bagaço de cana e sua bioconversão por processo SIF, utilizando o biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10), selecionado no item anterior.

#### 4.4.1 Quantificação da hemicelulose presente no bagaço de cana

A composição química do bagaço de cana é apresentada na Tabela 4.11. Os resultados confirmam que a biomassa é formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Como esperado, celulose é o constituinte majoritário e representa (40,6±0,2)% do material. A fração hemicelulósica agrega os polímeros de xilose, arabinose e ácido acético e corresponde a (26,6±0,2)% do total, sendo que esta fração é constituída predominantemente por xilose (90,0%). Polímeros de arabinose e ácido acético constituíram em média 9,8% e 11,0% da hemicelulose. O conteúdo total de lignina referente às formas insolúvel e solúvel em ácido compõe (23,9±0,7)% do bagaço. Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por (BOUSSARSAR et al., 2009).

**Tabela 4.11** – Composição química média do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Componente	Percentagem <sup>a</sup>
Glicana	40,6 ± 0,2%
Xilana	21,1 ± 0,1%
Arabinana	2,6 ± 4,6×10 <sup>-3%</sup>
Acetil	2,9 ± 0,1%
Lignina solúvel	5,0 ± 0,2%
Lignina insolúvel	18,9 ± 0,5%
Cinzas	2,1 ± 0,1%
Extrativos em água	3,1 ± 0,1%
Extrativos em etanol 96%	2,6 ± 0,3%
Total	98,8 ± 1,6%

NOTA: <sup>a</sup>cada valor corresponde à média de dois experimentos ± desvio padrão.

#### 4.4.2 Avaliação da hidrólise ácida do bagaço de cana *in natura*

No atual estudo, o bagaço de cana *in natura* foi submetido a tratamento com ácido sulfúrico diluído sob condições favoráveis à liberação de açúcares monoméricos da fração hemicelulósica. O desempenho da hidrólise ácida foi discutido com base na média dos resultados obtidos para cada um dos três experimentos resumidos na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12** – Ensaio de hidrólise ácida do bagaço de cana *in natura*. Condições do tratamento: 121°C durante 40 minutos em autoclave. Relação sólido:líquido 1:4

Ensaio	Bagaço úmido (g)	Umidade do bagaço (%)	Bagaço seco (g)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3% (mL)	Líquido recuperado (mL)
1	54,7	54%	25	70,3	35,0
2	300,0	47%	159	495,0	575,0
3	600,0	47%	318	990,0	335,0

Na Tabela 4.12 estão descritas as massas de bagaço submetidas ao tratamento, com suas respectivas umidades e volumes de solução ácida requeridos no processo. Além disso, destacou-se o volume de líquido recuperado após compressão manual do material tratado. Nessa etapa do trabalho, constatou-se que reatores com grandes volumes úteis são requeridos para obtenção de volumes elevados de hidrolisado devido à baixa massa específica do bagaço e à elevada relação sólido:líquido selecionada para o estudo.

Os resultados apresentados na Tabela 4.13 demonstram que o tratamento gerou um licor com elevada concentração de xilose ( $61,0 \pm 3,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Esta concentração assemelha-se aos melhores resultados descritos na literatura (BETANCUR; PEREIRA JR, 2010; FOGEL et al., 2005). Além dos açúcares xilose e arabinose, compostos inibidores do metabolismo microbiano tais como ácido acético, derivados da lignina, furfural e hidroximetilfurfural também foram formados e liberados durante o tratamento. Os dois últimos estavam presentes em concentrações inferiores a  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . De fato, os principais produtos de degradação detectados foram o ácido acético e derivados da lignina cujas concentrações médias foram da ordem de 10,4 e  $4,3 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Como esperado, a liberação de glicose foi baixa, mostrando que a fração de celulose permaneceu praticamente não hidrolisada.

**Tabela 4.13** – Composição média do hidrolisado de hemicelulose obtido por tratamento bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído 3% (v/v) e relação sólido/líquido 1:4, em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 40 min.

Componente	Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>
Xilose	$61,0 \pm 3,2$
Arabinose	$7,3 \pm 0,2$
Glicose	$7,2 \pm 1,8$
Ácido acético	$10,4 \pm 0,1$
Furfural	$0,53 \pm 0,14$
Hidroximetilfurfural	$0,06 \pm 0,02$
Derivados da lignina	$4,3 \pm 0,9$

NOTA: <sup>a</sup> Cada valor corresponde à média de três experimentos  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados de rendimento apresentados na Tabela 4.14 indicam que o tratamento ácido resultou na hidrólise de toda a fração hemicelulósica da biomassa. Os polímeros de xilose, arabinose e ácido acético foram totalmente convertidos a seus constituintes monoméricos. Os resultados de eficiência apontam que  $(100,0 \pm 5,3)\%$ ;  $(98,4 \pm 3,1)\%$  e  $(98,0 \pm 0,9)\%$  da xilose, arabinose e ácido acético foram extraídos da matriz da biomassa, respectivamente. Apenas  $6,4 \pm 1,6\%$  da glicose presente na biomassa foi solubilizada.

Com o tratamento realizado neste estudo conseguiu-se agregar duas importantes características num único processo: elevada concentração de xilose e um excelente rendimento de hidrólise. Na hidrólise ácida da hemicelulose, a concentração de açúcares e o rendimento, usados como critérios de desempenho comumente se opõem devido ao uso de baixas relações sólido:líquido que geram hidrolisados muito diluídos (CANILHA et al., 2010; NIGAM, 2001). Similarmente, o uso de relações sólido:líquido muito altas, que favorecem a obtenção de um licor rico em açúcar pode prejudicar o rendimento. Em termos do teor de xilose presente no hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana, Betancur e Pereira Jr (2010), verificaram concentrações de até  $82\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  empregando solução de ácido sulfúrico 1,13% e relação sólido:líquido 1:1,17, porém o rendimento da hidrólise foi de 60%.

**Tabela 4.14** – Eficiência da hidrólise ácida do bagaço de cana *in natura* a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 40 min em autoclave.

Componente	$Y_{\text{teo}} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{bagaço})$	$Y_{\text{exp}} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{bagaço})$	$\eta_{\text{ext}} (\%)$	$\eta_{\text{rec}} (\%)$
Xilose	0,240	$0,240 \pm 0,013$	$100,0 \pm 5,3$	$44,3 \pm 8,9$
Glicose	0,451	$0,029 \pm 0,007$	$6,4 \pm 1,6$	$44,3 \pm 8,9$
Arabinose	0,030	$0,029 \pm 0,001$	$98,4 \pm 3,1$	$44,3 \pm 8,9$
Ácido acético	0,042	$0,042 \pm 4,00 \times 10^{-4}$	$98,0 \pm 0,9$	$44,3 \pm 8,9$

NOTA: Condições do tratamento: reação em ácido sulfúrico 3% (v/v) e relação sólido/líquido 1:4.  $Y_{\text{teo}}$ : rendimento teórico,  $Y_{\text{exp}}$ : rendimento experimental;  $\eta_{\text{ext}}$ : eficiência de extração;  $\eta_{\text{rec}}$ : eficiência de recuperação (metodologia de cálculo no item 3.5).

Como a recuperação do hidrolisado foi feita por compressão manual do material tratado e, inevitavelmente, parte dos açúcares liberados permaneceram aderidos à fração sólida, perdas de açúcares naturalmente ocorreram durante a recuperação da fração líquida. Na Tabela 4.14 verifica-se que a eficiência de recuperação da xilose e demais componentes do hidrolisado foi baixa, apenas 44,3% do material hidrolisado foi recuperado. Destaca-se, portanto que a otimização da etapa de recuperação de açúcares no licor é importante para elevar a eficiência do processo. Uma opção seria realizar uma embebição, como é feita na usina de etanol de primeira geração para aumentar a extração da sacarose da cana. Nesse procedimento, a lavagem da fração sólida associada ao uso de prensas de rolos, capazes de produzir um resíduo sólido com baixa umidade, conduz à máxima extração do açúcar. Ressalta-se, entretanto, que no contexto da produção de etanol de segunda geração, a relação custo/benefício da embebição deve ser avaliada, uma vez que hidrolisados diluídos possivelmente serão gerados. Durante o atual estudo de hidrólise ácida, realizou-se a lavagem com água morna do resíduo sólido do bagaço (celulignina) obtido após remoção do hidrolisado. Utilizando uma relação sólido:líquido de 1/4, obteve-se um hidrolisado com a seguinte composição: glicose ( $2,2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),



xilose ( $19,8\text{g.L}^{-1}$ ), arabinose ( $2,4\text{g.L}^{-1}$ ) e ácido acético ( $3,6\text{g.L}^{-1}$ ). Dessa forma, confirmou-se a existência de açúcares monoméricos facilmente recuperáveis na fração sólida.

Para minimizar o teor de compostos inibidores, conhecidos por alterar negativamente a cinética do processo fermentativo, o hidrolisado foi submetido a procedimento de detoxificação por fervura e alteração do pH (supercalagem até pH 10 seguida por reacidificação até pH 6). De acordo com Chandel et al. (2013), a supercalagem a pH 10 promove a precipitação de furfurais e fenólicos que podem então ser removidos por filtração. A Tabela 4.15 apresenta um comparativo das concentrações dos componentes dos hidrolisados tratado e não tratado.

**Tabela 4.15** – Comparação do hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana não tratado com o tratado por fervura durante 15 min seguido de supercalagem até pH 10 e reacidificação até pH 6.

Componente	Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ )		Perda <sup>b</sup> (%)
	Hidrolisado sem tratamento <sup>a</sup>	hidrolisado tratado	
Xilose	57,4	80,0	26,8
Arabinose	7,3	9,5	31,6
Glicose	5,2	9,2	7,1
Ácido acético	10,3	10,4	47,0
Furfural	0,4	0,03	96,1
Hidroximetilfurfural	0,05	0,01	89,5
Derivados da lignina	5,3	3,7	63,3

NOTA: <sup>a</sup>Hidrolisado obtido por tratamento de bagaço de cana (600 g) com ácido sulfúrico diluído 3% (v/v) e relação sólido/líquido 1:4, em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 40 min. <sup>b</sup>Perda: massa do componente disponibilizada para tratamento/massa recuperada no volume final. Volume inicial: 200mL. Volume após fervura: 146mL. Volume final 105mL.

Durante a etapa de fervura parte do líquido evaporou e verificou-se que o hidrolisado foi concentrando aproximadamente 1,37 vezes por evaporação (Tabela 4.15). Considerando este fator, a eficiência de remoção dos compostos furfural, HMF, fenólicos e ácido acético foi de 94,5; 85,4; 49,0 e 26,3%, respectivamente. A concentração de ácido acético permaneceu praticamente inalterada, logo, o tratamento realizado foi pouco eficiente em remover este composto. Este resultado está de acordo com aqueles descritos por diversos autores que corroboram o baixo nível de remoção do ácido acético por calagem (CANILHA et al., 2010; CHANDEL et al., 2013; MARTINEZ et al., 2000).

Na etapa de calagem recuperou-se aproximadamente 72% do volume tratado. Como ilustrado na Tabela 4.15, o tratamento gerou perdas de xilose, arabinose e glicose de 26,8; 31,6 e 7,1%, respectivamente.

Os resultados apresentados nesta seção demonstram que o tratamento ácido do bagaço de cana nas condições estudadas representa uma excelente alternativa para a produção de hidrolisados contendo elevada concentração de xilose ( $\sim 60\text{g.L}^{-1}$ ), uma importante fonte de substrato para processos de bioconversão. No atual estudo, o hidrolisado foi enriquecido com xilose comercial e nutrientes e utilizado no processo SIF com a finalidade de produzir etanol.

É importante destacar também que o resíduo sólido, ou seja, a fração de celulignina resultante da hidrólise ácida da hemicelulose pode ser transformada, aproveitando-se as frações de celulose e lignina para geração de uma gama de produtos. A celulose pode ser convertida a glicose e servir de insumo para uma série de processos dentre eles a produção de etanol, etileno, buteno, propileno, butadieno, butanol, isopropanol, glicerol, acetona, ácido acético, ácido butírico, hidroximetilfurfural, ácido levulínico, ácido fórmico, dentre outros. Já a lignina pode ser queimada para geração de energia ou ser transformada em produtos de grande interesse da indústria química, como exemplos, óleos, fenol, vanilina, ácido acético, gás de síntese, entre outros (SCHUCHARDT et al., 2001). Uma descrição da composição química da celulignina obtida após a remoção do licor por compressão manual encontra-se na Tabela 4.16.

**Tabela 4.16** – Composição média da fração sólida obtida após remoção da fração líquida resultante do tratamento do bagaço de cana com ácido sulfúrico diluído 3% (v/v) e relação sólido/líquido 1:4, em autoclave a 121°C por 40 minutos.

<b>Componente</b>	<b>Percentagem<sup>a</sup></b>
Celulose	51,7 ± 0,1%
Hemicelulose	6,3 ± 0,3%
Extrativos em água	14,3 ± 0,1%
Lignina	27,5 ± 1,3%
Cinzas	1,8 ± 0,1%
<b>Total</b>	<b>101,6 ± 1,9%</b>

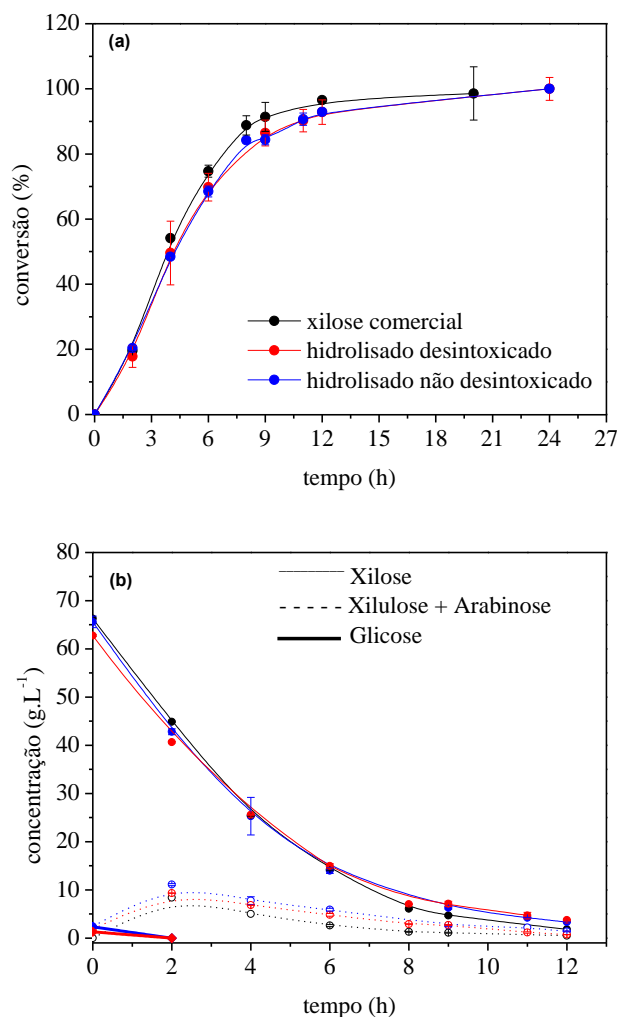
NOTA: <sup>a</sup>Cada valor corresponde à média de dois experimentos simultâneos ± desvio padrão.

Na Tabela 4.16, o elevado percentual de material extrativo em água presente na fração sólida remanescente do tratamento ácido do bagaço se deve, em grande parte, à presença de componentes da hemicelulose remanescentes da extração da fração líquida por compressão manual. A análise destes extrativos por CLAE revelou a presença majoritária de xilose. Arabinose e glicose também estavam presentes, porém suas concentrações eram cerca de 7 e 10 vezes inferiores à de xilose, respectivamente.

#### 4.4.3 Avaliação do Processo SIF utilizando hidrolisado de hemicelulose

Os hidrolisados de hemicelulose foram suplementados com xilose pura, sais diversos e antibiótico, conforme descrito no item 3.2, e avaliados no processo SIF em batelada. A adição de xilose foi feita no sentido de padronizar as concentrações iniciais dos meios de SIF em  $120 \text{ g.L}^{-1}$ , uma vez que após a adição dos pellets ao meio ocorre uma diluição da aproximadamente 2 vezes. O processo foi bem sucedido. As Figuras 4.16 (a) e (b) ilustram os perfis de conversão de xilose e consumo de açúcares em função do tempo de reação, respectivamente.

**Figura 4.16** – SIF de xilose pura e dos hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana não desintoxicado e desintoxicado por fervura e supercalagem suplementados com xilose pura, sais nutrientes e antibiótico (a) conversão da xilose, (b) perfil de consumo de substrato. Reação conduzida em batelada a  $35^\circ\text{C}$  e 150 rpm com uso do biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10) acrescido de carbonato de cálcio 0,5% (m/m). Símbolos: (●,○) xilose comercial, (●,○,◆) hidrolisado desintoxicado, hidrolisado não desintoxicado (●,○,◆).



NOTA: Concentração de IGI-Ch no reator:  $120 \times 10^3 \text{ UI.L}^{-1}$ . Concentração de células em massa seca no reator:  $50 \text{ g.L}^{-1}$ . Relação biocatalisador meio  $1 \text{ g:1 mL}^{-1}$ . Cada ponto no gráfico representa a média de três experimentos simultâneos  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados apresentados na Figura 4.16 (a) demonstram que os perfis de conversão da xilose nas SIFs conduzidas com hidrolisado desintoxicado e não desintoxicado foram semelhantes entre si. Além disso, as SIFs foram apenas discretamente mais lentas comparadas ao processo com o substrato comercial (xilose pura). Em 12 horas, as conversões computadas foram  $96,5 \pm 0,2\%$ ,  $92,8 \pm 3,7\%$  e  $92,9 \pm 0,9\%$  para o substrato comercial, hidrolisado desintoxicado e hidrolisado não desintoxicado, respectivamente.

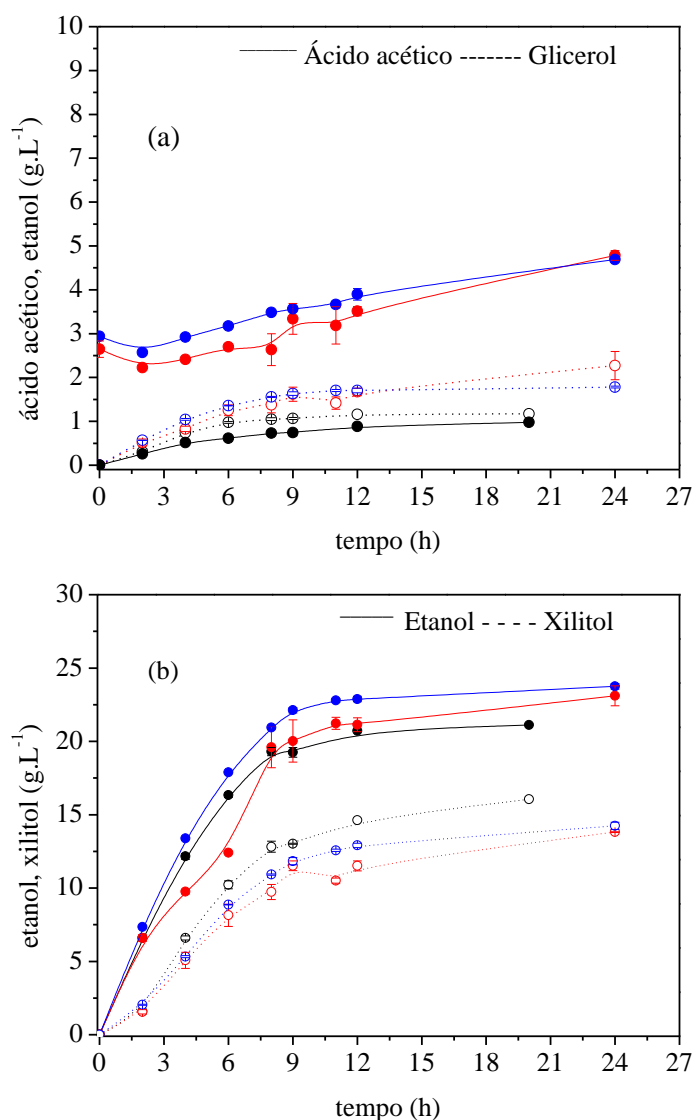
Além da xilose, pequenas quantidades de glicose e arabinose estavam presentes nos hidrolisados. No tempo inicial da SIF, o meio preparado com o hidrolisado não desintoxicado apresentava cerca de 1,4 e  $2,0 \text{g.L}^{-1}$  de glicose e arabinose, respectivamente. Já no meio proveniente do hidrolisado desintoxicado, essas concentrações eram de 2,5 e  $2,6 \text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Como a glicose é facilmente assimilada pela levedura *S. cerevisiae*, sua metabolização pode contribuir com a geração de pequenas quantidades de etanol nos meios provenientes dos hidrolisados. De fato, nenhum traço de glicose foi verificado após duas horas de reação (4.16 b). Por outro lado, arabinose não é fermentescível por *S. cerevisiae* (BETTIGA et al., 2009).

Durante a análise dos meios fermentados por CLAE, verificou-se que xilulose e arabinose coeluem, em função disso, suas concentrações não foram determinadas separadamente. Na SIF de xilose pura, xilulose estava presente em concentrações de equilíbrio durante todo o período de esgotamento da xilose. Essa tendência se repetiu nos experimentos com os hidrolisados, visto que as relações xilulose/xilulose eram sempre superiores a 20%.

Após 12 horas de ensaio, a concentração da mistura arabinose/xilulose nos meios de SIF provenientes dos hidrolisados não tratado e tratado eram 1,4 e  $0,7 \text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. A redução na concentração de arabinose pode estar relacionada a algum grau de assimilação por *S. cerevisiae*, face à elevada concentração de células no reator ou a presença de microrganismos contaminantes que consomem este açúcar.

A Figura 4.17 destaca o perfil de formação dos produtos durante as SIFs. Como previsto, etanol e xilitol foram os produtos majoritários, enquanto glicerol e ácido acético acumularam em concentrações inferiores.

**Figura 4.17** – Produtos da SIF de xilose pura e dos hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana não desintoxicado e desintoxicado por fervura e supercalagem suplementados com xilose pura, sais nutrientes e antibiótico (a) perfil de formação de glicerol e ácido acético (b) perfil de formação de etanol e xilitol. Reação conduzida em batelada a 35°C e 150 rpm com uso do biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10) acrescido de carbonato de cálcio 0,5% (m/m). Símbolos: (●,○) xilose comercial, (●,○) hidrolisado desintoxicado, hidrolisado não desintoxicado (●,○).



NOTA: Concentração de enzima no reator:  $120 \times 10^3$  UI.L<sup>-1</sup>. Concentração de células em massa seca no reator: 50g.L<sup>-1</sup>. Relação biocatalisador meio 1g:1mL<sup>-1</sup>. Cada ponto no gráfico representa a média de três experimentos simultâneos  $\pm$  desvio padrão.

O ácido acético era o componente tóxico majoritário presente no início das SIFs dos hidrolisados, com concentração de aproximadamente 3g.L<sup>-1</sup>. A literatura reporta que concentrações deste ácido entre 2-5g.L<sup>-1</sup> tem efeito inibitório sobre leveduras (NIGAM, 2001).

Os resultados de conversão dos hidrolisados descritos anteriormente apontaram uma diferença de apenas de 3% em relação ao processo conduzido com o substrato puro. Sendo assim, pode-se afirmar que o conteúdo de compostos tóxicos presentes no meio preparado com hidrolisados, mesmo aquele que não passou por processo de detoxificação, praticamente não

teve influência sobre o metabolismo da levedura durante a bioconversão. É importante destacar que no processo em estudo, a presença de células imobilizadas e em elevada concentração favorece a minimização dos efeitos de compostos tóxicos naturalmente presentes nos hidrolisados lignocelulósicos. Dessa forma, pode-se conjecturar que o biocatalisador preparado é suficientemente robusto para tolerar concentrações de inibidores mais elevadas que aquelas presentes durante os ensaios discutidos nesta seção. Obviamente, esta hipótese deve ser estudada com maior minúcia, especialmente no que diz respeito à tolerância por longos períodos de tempo, uma característica importante para aplicação em processos contínuos.

Os resultados apresentados na Figura 4.17 mostram que em 12 horas de SIF, etanol estava presente nas concentrações de  $20,7 \pm 0,1$ ;  $22,9 \pm 0,2$  e  $21,1 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Já as concentrações do xilitol, outro importante produto do processo, são  $14,62 \pm 0,3$ ;  $10,5 \pm 0,2$  e  $12,6 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$ , para os ensaios conduzidos com xilose comercial e hidrolisados não tratado e tratado, respectivamente.

Os resultados de eficiência de utilização da xilose, produtividades volumétricas e específicas, rendimentos, seletividade e balanços de carbono da SIF dos hidrolisados tratado e não tratado são apresentados na Tabela 4.17, ilustram que as produtividades volumétricas máximas em etanol foram muito próximas, ficando entre  $2,3 \pm 0,2$  e  $2,7 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Os valores do rendimento em etanol e da seletividade do etanol em relação ao xilitol foram superiores nos processos conduzidos com hidrolisados em comparação à SIF conduzida com xilose pura. O mais elevado rendimento  $0,35 \pm 3,21 \times 10^{-3} \text{ g.g}^{-1}$ , referente ao processo conduzido com hidrolisado tratado, corresponde a 68,6% do teórico. Já os rendimentos em xilitol, foram inferiores nas SIFs dos hidrolisados. Dados de velocidade específica de assimilação de xilulose praticamente não são descritos na literatura. Os valores desse parâmetro verificados no atual estudo variam entre  $136 \pm 7$  e  $174 \pm 13 \text{ mg.g}^{-1}_{\text{ms}} \cdot \text{h}^{-1}$  e são cerca de três vezes superiores ao descrito por Senac e Hahn-Hagerdal (1990). A literatura reporta velocidades de assimilação específica superiores a  $200 \text{ mg.g}^{-1}_{\text{ms}} \cdot \text{h}^{-1}$ , porém são referentes a *S. cerevisiae* geneticamente modificada por superexpressão de quatro enzimas da via pentose fosfato não oxidativa (JOHANSSON; HAHN-HÄGERDAL, 2002).

Em termos do balanço de carbono, os processos conduzidos com hidrolisado ou xilose pura também foram similares entre si e, 90 a 92% do carbono consumido nas 12 horas iniciais de SIF foram recuperados na forma de etanol, xilitol, glicerol, ácido acético e gás carbônico (estimado). Este resultado demonstra que a conversão rápida do substrato no sistema

com controle de pH favoreceu a recuperação de carbono em comparação ao sistema sem  $\text{CaCO}_3$ , onde as recuperações foram da ordem de 75%.

**Tabela 4.17** – Parâmetros da produção de etanol e xilitol a partir da SIF de xilose pura e de hidrolisados de hemicelulose do bagaço de cana a conduzida a 35°C e 150 rpm.

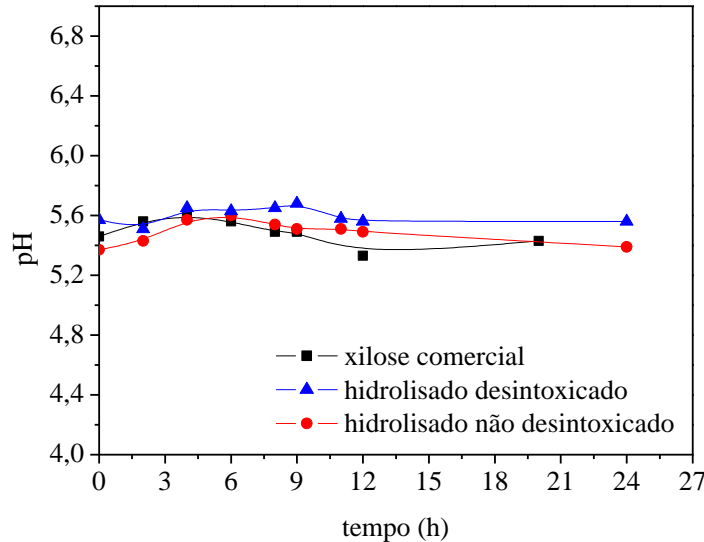
Parâmetro	Origem da fonte de açúcares do meio de SIF		
	Xilose Pura (comercial)	Hidrolisado não tratado	Hidrolisado Tratado
Conversão (%) <sup>a</sup>	96,5±0,2	92,9±0,9	92,8±3,7
Pr máx <sub>ETOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	2,4±0,2	2,3±0,2	2,7±0,3
Pr máx <sub>XOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	1,7±0,1	1,3±0,2	1,4±0,2
Pr <sub>ETOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	1,7±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1
Pr <sub>XOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	1,2±1,89 x10 <sup>-3</sup>	1,0±2,8x10 <sup>-2</sup>	1,1±0,01
Y <sub>ETOH</sub> (g.g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0,32±4,42x10 <sup>-3</sup>	0,34±0,01	0,35±3,21 x10 <sup>-3</sup>
Y <sub>XOH</sub> (g.g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	0,23±3,54 x10 <sup>-3</sup>	0,19±5,50x10 <sup>-3</sup>	0,20±1,26 x10 <sup>-3</sup>
S <sub>ETOH/XOH</sub> (mol.mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	4,7±0,7	6,1±0,3	5,9±0,7
q <sub>S</sub> (mg <sub>S</sub> /g <sup>-1</sup> <sub>ms</sub> .h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	174 ± 13	136 ± 7	158 ± 12
q <sub>ETOH</sub> (mg <sub>ETOH</sub> .g <sup>-1</sup> <sub>ms</sub> .h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	48 ± 4	45 ± 5	53 ± 5
q <sub>XOH</sub> (mg <sub>XOH</sub> .g <sup>-1</sup> <sub>ms</sub> .h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	34 ± 3	26 ± 2	29 ± 1
Carbono <i>in</i> (g)	0,205±0,001	0,198±0,002	0,211±0,002
Carbono <i>out</i> (g)	0,184±0,003	0,180±0,006	0,194±0,006
Carbono recuperado (%) <sup>a</sup>	90±2	91±4	92±2

NOTA: Processo conduzido com adição de  $\text{CaCO}_3$  para controle do pH. <sup>a</sup> Parâmetro calculado em t=12 h. <sup>b</sup> Parâmetro calculado a partir da reta tangente à curva de produto *versus* tempo, na faixa linear. <sup>c</sup> Parâmetro calculado a partir da reta tangente a curva de consumo *versus* tempo, na faixa linear. EOH: etanol, XOH: xilitol, Y: rendimento, Pr: produtividade volumétrica máxima (calculada a partir da reta tangente ao curva de produto *versus* tempo, na faixa linear), Pr: produtividade volumétrica global (calculada em 12 h), S<sub>ETOH/XOH</sub>: seletividade do etanol em relação ao xilitol. q<sub>S</sub>: velocidade específica de assimilação de xilulose, q<sub>ETOH</sub>: velocidade específica de produção de etanol, q<sub>XOH</sub>: velocidade específica de produção de xilitol, gms: gramas de célula em massa seca. Carbono *out*: concentração total de carbono nos produtos do metabolismo da levedura em t=12 h. <sup>c</sup>Carbono *in*: concentração total de carbono no açúcar consumido em t=12 h.

Em resumo, o biocatalisador selecionado para os estudos demonstrou excelente desempenho na conversão de hidrolisados hemicelulósicos. Um resultado importante foi constatado: os perfis de consumo de xilose pura e de açúcares do hidrolisado hemicelulósico não desintoxicado foram semelhantes. Portanto, nas condições estudadas, o processo de detoxificação mostrou-se desnecessário. Este resultado tem consequências diretas na economia do processo, pois as técnicas de detoxificação comumente apresentam desvantagens. Neste estudo, foi demonstrado que durante a supercalagem ocorrem perdas significativas de açúcares. Além disso, há um gasto adicional com insumos químicos que contribuem para elevar os custos do processo.

Comprovou-se, portanto, com esse conjunto de experimentos, a elevada eficiência do sistema de SIF conduzido em condições adequadas de pH. A Figura 4.18 apresenta os perfis de variação do pH referentes aos ensaios em discussão. Nos três experimentos, os pHs inicial e final estavam entre 5,6 e 5,4, respectivamente.

Figura 4.18 – Perfil de pH em função do tempo da SIF de xilose catalisada por glicose isomerase e *S. cerevisiae* coimobilizadas com carbonato de cálcio 0,5% em alginato de cálcio.



#### 4.5 ESTABILIDADE DE *S. CEREVISIAE* EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Bateladas repetidas de SIF de xilose a diferentes temperaturas (32, 35 e 37°C) foram realizadas no sentido de verificar o efeito da temperatura sobre a viabilidade da levedura de panificação e determinar a temperatura mais adequada para condução da SIF de xilose em sistema contínuo. Os ensaios foram acompanhados por um período de 27 dias.

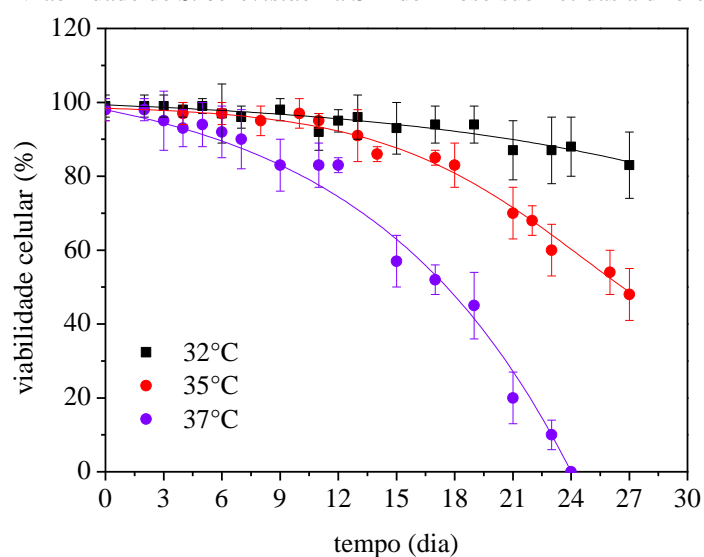
Os perfis de viabilidade celular em função do tempo são apresentados na Figura 4.19. Na temperatura de 37 graus, a levedura manteve viabilidade superior a 90% até o 7º dia. Após esse período ocorreu uma queda gradual até o 12º dia. Na sequência, a perda de viabilidade foi acelerada de modo que em 17 dias de ensaio  $52 \pm 4\%$  das células presentes nos pellets estavam viáveis e após 24 dias o ensaio foi encerrado, pois já não havia células viáveis no reator. Na SIF conduzida a 35°C, a perda de viabilidade naturalmente foi mais lenta em comparação ao ensaio mantido a 37°C. Viabilidade superior a 90% foi verificada até o 13º dia. A partir desse ponto, a perda foi mais acentuada e após 27 dias a viabilidade era  $48 \pm 7\%$ , ou seja, a 35°C as células toleraram 10 dias a mais para atingiram aproximadamente o mesmo nível de perda em comparação ao ensaio mantido a 37°C. O melhor resultado foi observado no



ensaio mantido a 32°C, onde a viabilidade celular se manteve elevada durante todo o período avaliado. Após 27 dias, 83±7% das células permaneceram viáveis.

Os resultados apresentados indicam claramente que conduzir a SIF de xilose em modo contínuo por longos períodos em temperaturas de 35°C e 37°C, que favorecem a atividade da enzima glicose isomerase, não é praticável. Já a temperatura de 32°C, na qual se mantém elevada viabilidade celular por pelo menos 27 dias, é indicada para estudos de SIF de xilose em operação contínua.

**Figura 4.19** – Viabilidade de *S. cerevisiae* na SIF de xilose submetidas a diferentes temperaturas.



Durante os experimentos verificou-se novamente a diminuição do pH do meio. Como os experimentos foram conduzidos sem assepsia, microrganismos contaminantes foram detectados no meio de SIF. É certo que a diminuição do pH do meio está associada a geração de ácidos orgânicos, parte pela levedura e parte pelos microrganismos contaminantes. Dessa forma, a manutenção do sistema livre de contaminante torna-se crucial para a eficiência do processo.

#### 4.6 SIF DE XILOSE EM SISTEMA CONTÍNUO

Nos ensaios de SIF de xilose em batelada, demonstrou-se que o uso de elevada concentração de glicose isomerase no reator (60-120 U.L<sup>-1</sup>), vinculada a cargas de levedura da ordem de 50g.L<sup>-1</sup> e adição de CaCO<sub>3</sub> à etapa de coimobilização da enzima com a levedura para manter o pH do meio da SIF entre 5,4 e 5,6, são estratégias interessantes para condução do

processo com elevada eficiência de conversão. Essas informações foram utilizadas para condução de ensaios de SIF de xilose em operação contínua a 32°C.

O estudo SIF de xilose em modo contínuo foi iniciado utilizando um sistema composto por três reatores de leito fixo conectados em série, conforme descrito no item 3.4.10. A opção pelo uso de três reatores se baseou nos estudos de Giordano (1992) e Trovati (2001) que utilizaram, com sucesso, um sistema similar para experimentos de hidrólise e fermentação simultâneas de amido de mandioca liquefeito. Conduzir o processo nessa configuração possibilita ganhos em produtividade, e principalmente minimiza problemas relacionados ao acúmulo de dióxido de carbono e perda de carga no sistema, em comparação à operação com uma única coluna. Na Tabela 4.18 estão descritas as condições gerais em que foram conduzidos os ensaios no sistema contínuo.

**Tabela 4.18** – Condições gerais da SIF de xilose em operação contínua.

Biocatalisador	IGI-Ch/ <i>S. cerevisiae</i> (20:10)+CaCO <sub>3</sub> 0,5%
pH inicial do meio de alimentação	5,6
Temperatura inicial	32°C
Massa do biocatalisador no reator	50 g
Volume útil do reator	100mL
Concentração de enzima no reator	120x10 <sup>3</sup> UI.L <sup>-1</sup>
Concentração inicial de células no reator <sup>a</sup>	50g.L <sup>-1</sup>
Tempo de residência <sup>b</sup>	11-12 h
Concentração de xilose na alimentação	65g.L <sup>-1</sup>
Viabilidade celular inicial	~ 98%

NOTA: <sup>a</sup> células em massa seca <sup>b</sup>Ensaio 1 e 2: 11 h. Ensaio 3: 12 h.

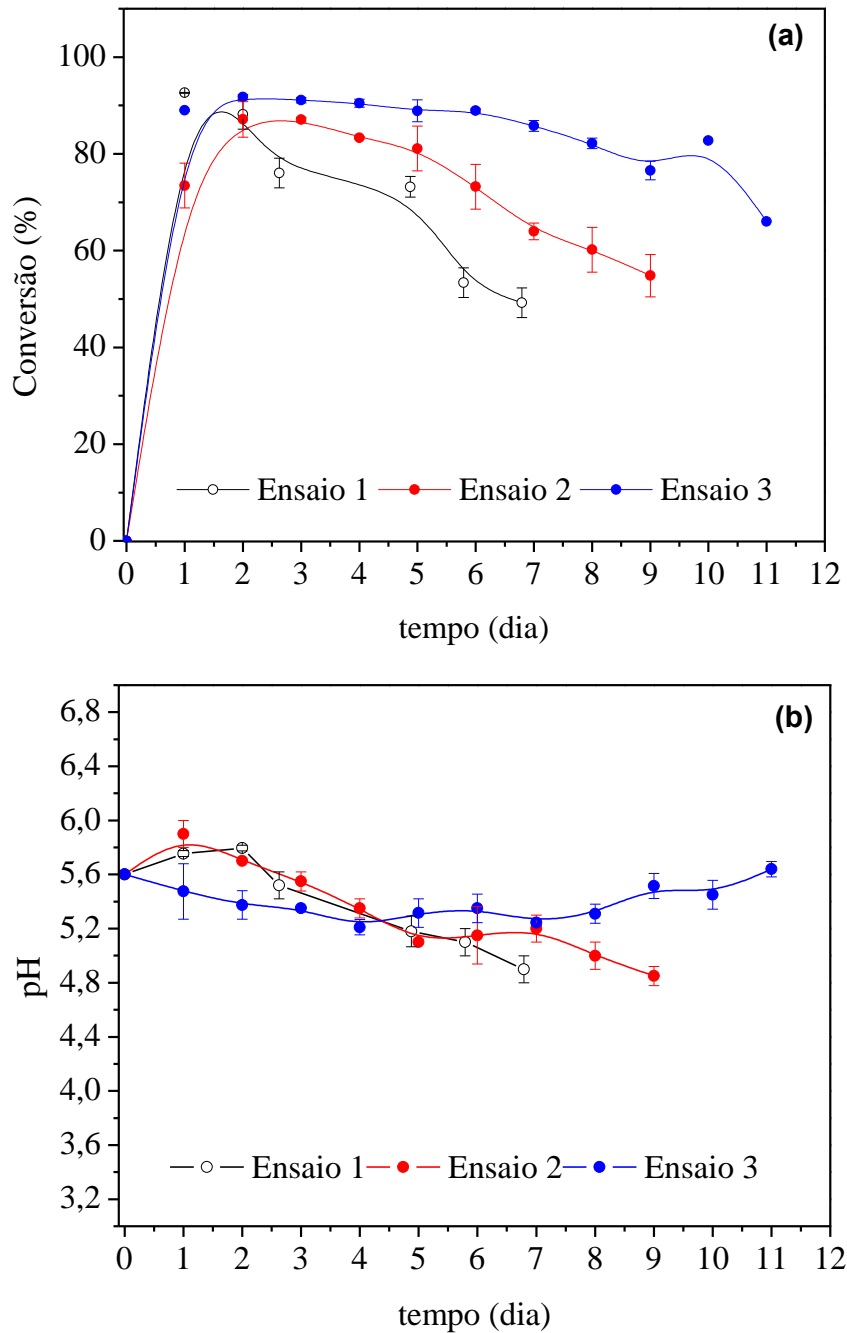
No decorrer dos ensaios de SIF em bateladas repetidas verificou-se novamente a diminuição no pH do meio, mesmo com adição de CaCO<sub>3</sub> aos pellets. Em função disso, durante os ensaios contínuos, decidiu-se adicionar o sal em excesso (1,5g.L<sup>-1</sup>) ao meio de alimentação. Para evitar problemas de entupimento durante o bombeamento do líquido, o sal foi confinado em membrana de diálise. Os perfis de conversão de xilose em função do tempo para os três ensaios realizados são apresentados na Figura 4.20.

O primeiro experimento foi monitorado durante 163 horas (aproximadamente 7 dias). Entre 12 e 48 horas, a conversão do açúcar foi mantida acima dos 86%. A partir do 3º dia de ensaio, o sistema foi operado com apenas dois reatores devido a entupimentos causados por precipitados que se acumulavam na entrada do leito de um dos reatores, impossibilitando uma alimentação adequada do mesmo. O estado estacionário não foi estabelecido. Após a modificação no sistema, houve uma rápida diminuição na eficiência de conversão,

acompanhada pela diminuição no pH do meio (Figura 4.20). Essa diminuição foi atribuída principalmente à formação de ácidos orgânicos, parte pela levedura e parte por microrganismos contaminantes, que visivelmente cresciam no meio de alimentação (o nível de turbidez do meio aumentava ao longo do tempo). A análise direta do efluente dos reatores por microscopia indicou a presença de microrganismos com elevada mobilidade, forma de bastões e dimensões consideravelmente inferiores às apresentadas pela levedura de panificação; sendo aparentemente bactérias. A presença de acetato, lactado, malato, succinato, formiato e butirato foi comprovada mediante a análise dos efluentes por CLAE. Dessa forma, durante o primeiro experimento contínuo constatou-se que o antibiótico *Kamoran* (4 ppm), adicionado ao meio de alimentação não impediu o crescimento de microrganismos contaminantes.

Diante da complexidade do processo contínuo em estudo, optou-se por conduzir os experimentos seguintes operando apenas um reator. As estratégias traçadas para a condução do segundo experimento incluíram: o tratamento ácido da levedura de panificação como etapa preliminar ao processo de coimobilização e a adição periódica do antibiótico *Kamoran* ao meio de alimentação. O tratamento ácido teve por objetivo eliminar possíveis microrganismos contaminantes presentes no fermento de padaria. Como resultado, o sistema apresentou desempenho superior ao verificado no primeiro ensaio: pôde ser operado com eficiência de conversão superior a 80% até o 5º dia. Porém, as estratégias adotadas não foram suficientes para manter o sistema em operação por um período mais prolongado.

**Figura 4.20** – SIF de 65g.L<sup>-1</sup> xilose em operação contínua a temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10)+CaCO<sub>3</sub> 0,5%. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL<sup>-1</sup>. Concentração inicial de células no reator: 50g.L<sup>-1</sup>(a) Perfil de conversão da xilose (b) perfil de variação do pH.

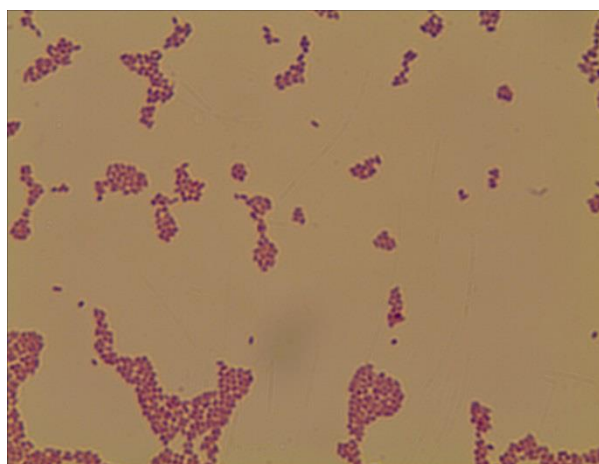


**NOTA:** **Ensaio 1** – adição do antibiótico *Kamoran* (4 ppm) no meio de alimentação apenas no tempo inicial da SIF. **Ensaio 2** – tratamento ácido da levedura antecedendo a etapa de coimobilização e adição periódica do antibiótico *Kamoran* ao meio de alimentação a partir de das 60 h de ensaio (a concentração acumulada após 9 dias foi aproximadamente 15 ppm). A temperatura foi elevada para 35°C após 109 horas de ensaio. **Ensaio 3** – tratamento ácido da levedura antecedendo a etapa de coimobilização, adição de solução de solução NaOH 0,1-0,4 M ao meio contido no reator e adição periódica de antibióticos de amplo espectro ao meio de alimentação. Concentração final dos antibióticos: *Kamoran*, *Kamoran WP* e *Corstan* (23 ppm); HJ Gold (13 ppm), aplicados no intervalo de 1-4 dias; cloranfenicol e ampicilina (2,1g.L<sup>-1</sup>), aplicados no intervalo (5-11 dias). Os pontos no gráfico representam a média ± desvio padrão de duas amostras retiradas no intervalo de 24 horas.

Novamente a diminuição contínua do pH do meio foi observada e microrganismos contaminantes foram detectados na saída do reator a partir de 60 horas, momento em que se iniciou a adição periódica de 3 ppm do antibiótico *Kamoram* (a concentração acumulada após 9 dias foi aproximadamente 15 ppm). O ensaio foi encerrado no 9º dia, momento em que o pH do meio era inferior a 5 e menos de 55% do açúcar fora convertido. Os produtos dos ensaios 1 e 2 não foram quantificados.

A estratégia adotada para o terceiro experimento contínuo incluiu: confecção dos pellets em câmara de fluxo laminar e manutenção dos mesmos em solução do antibiótico *Kamoram* 30 ppm durante a noite precedente ao início do ensaio de SIF, carga do reator sob condições assépticas, adição periódica de solução de NaOH 0,1-0,5 M ao reator para manutenção do pH acima de 5,0, além de tratamento ácido da levedura e adição periódica de antibióticos de amplo espectro ao meio de alimentação. Além disso, o tempo de residência foi alterado para 12 horas, visto que nos experimentos anteriores a conversão do açúcar estava abaixo da observada nos experimentos em batelada. Nestas condições, o sistema foi monitorado por um período de 11 dias, exibindo os melhores resultados dentre os três ensaios (Figura 4.20). A conversão do açúcar manteve-se superior a 85% durante os 7 primeiros dias e caiu para 66% após 11 dias. A adição periódica de solução de NaOH mostrou-se eficiente, uma vez que o pH foi mantido sempre acima de 5,0 (Figura 4.21b). Porém, a principal limitação para a condução do ensaio contínuo de forma eficiente foi que persistiu a presença de contaminação. As reações de Gram indicaram se tratar de células gram-negativas (Figura 4.21).

**Figura 4.21** – Micrografia obtida após reações de Gram em microrganismos contaminantes detectados durante a SIF de xilose em reator contínuo (ampliação de 1000 ×).



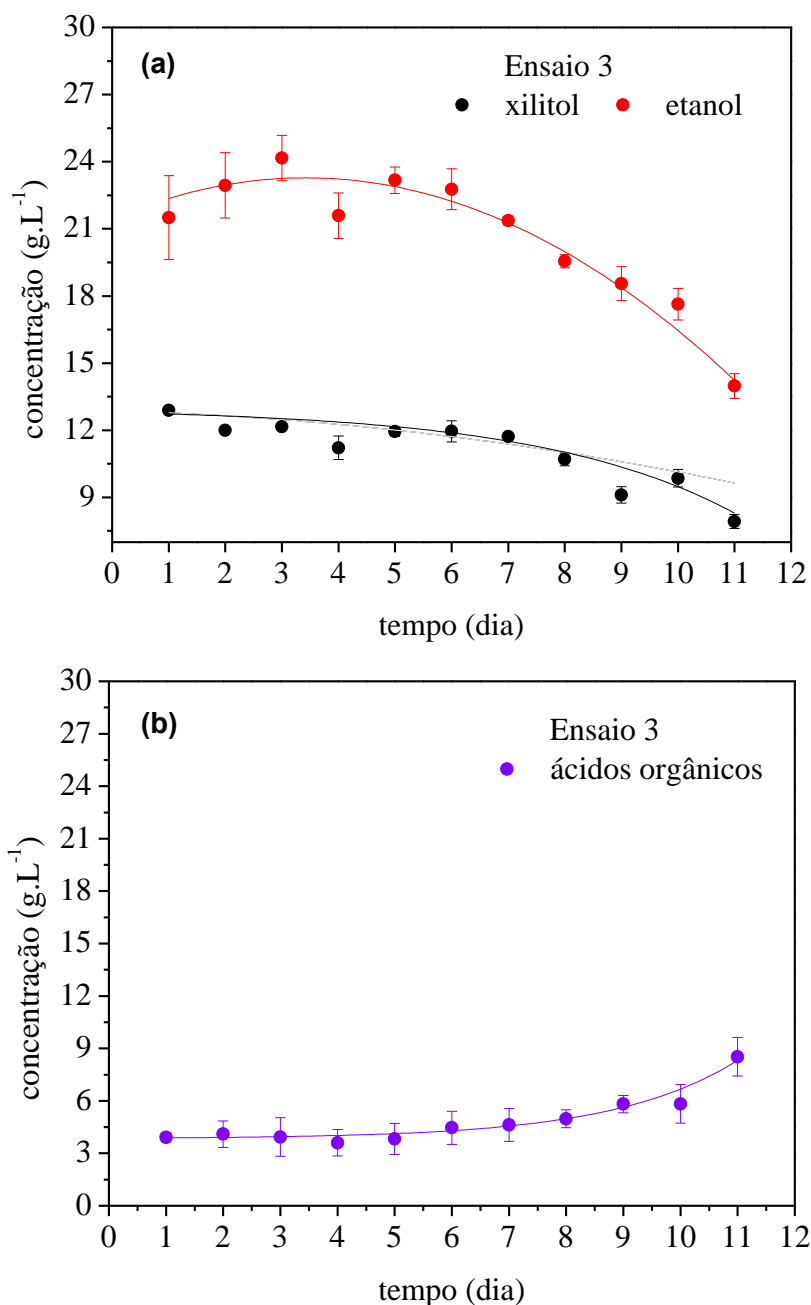
Mesmo com os cuidados na assepsia, a presença de microrganismos contaminantes mostrou-se elevada após 66 horas de ensaio, sendo que a mais elevada

concentração de  $3,4 \pm 0,2 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> foi percebida no 5º dia. Mesmo após a adição de elevada dosagem de antibióticos (conforme descrito no rodapé da Figura 4.20, acima), um esforço para manter o sistema em operação, a concentração de contaminantes no efluente diminuiu para  $1,2 \pm 0,1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, no 11º dia, que ainda assim é superior aos níveis aceitáveis em escala industrial ( $10^5$ - $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Isto inviabiliza a condução do processo por um longo período, em função da perda da fonte de carbono na produção de produtos indesejáveis. No controle de bactérias nas plantas de produção industrial certamente existe um efeito sinérgico entre a ação do antibiótico e do etanol, que também é um antisséptico. No atual estudo, a concentração final do etanol é aproximadamente quatro vezes inferior àquelas comumente atingidas em usinas (70-85g.L<sup>-1</sup>), sendo assim efeito sinérgico não acontece da mesma forma, o que explicaria a baixa eficiência dos antibióticos no controle da contaminação.

O conteúdo total de ácidos orgânicos no efluente do reator contínuo aumentou ao longo do tempo, chegando a 8,5g.L<sup>-1</sup> no final do experimento (Figura 4.22). As concentrações individuais variaram nos seguintes intervalos: acetato 0,4-0,6g.L<sup>-1</sup> formiato 0,3-0,7g.L<sup>-1</sup>; malato 0,9-4,3g.L<sup>-1</sup>; succinato 1,7-2,7g.L<sup>-1</sup>; butirato 0,1-0,4g.L<sup>-1</sup> e lactato 0,1-0,3g.L<sup>-1</sup>. Seguramente, a presença destes ácidos afetou a viabilidade celular final ( $75 \pm 3\%$ ).

Assim como nos experimentos em batelada, os principais produtos da SIF em operação contínua foram etanol e xilitol. Glicerol também foi formado e sua concentração encontra-se no intervalo de 0,4-1,1g.L<sup>-1</sup>, durante os 11 dias de ensaio. Na Figura 4.22), verifica-se que o etanol estava presente em concentrações superiores a 20g.L<sup>-1</sup> até o 7º dia de ensaio. Nesse período, a concentração de xilitol se manteve praticamente constante em 12g.L<sup>-1</sup>. Já a análise do meio de alimentação no tempo final da SIF revelou a presença dos seguintes ácidos: succinato 0,6g.L<sup>-1</sup>; formiato 0,4g.L<sup>-1</sup>; acetato 0,1g.L<sup>-1</sup>; lactato 0,1g.L<sup>-1</sup> e butirato 0,6g.L<sup>-1</sup>. Dessa forma, pode-se afirmar que a maior quantidade de ácidos orgânicos gerados no final do processo, tinham origem no reator. Além dos ácidos, etanol também foi detectado (4,5g.L<sup>-1</sup>). Parte do etanol (cerca de 1,5g.L<sup>-1</sup>) pode ser justificada pela dosagem periódica de solução de antibióticos de uso industrial, previamente dissolvidos em solução água/etanol (1:1). Quanto ao restante, provavelmente é metabólito do metabolismo dos microrganismos contaminantes.

**Figura 4.22** – Perfil de formação de produtos durante SIF de 65g.L<sup>-1</sup> de xilose em operação contínua a temperatura inicial 32°C e pH inicial 5,6 com biocatalisador IGI-Ch/*S. cerevisiae* (20:10)+CaCO<sub>3</sub> 0,5%. Concentração de enzima do reator 120 UI.mL<sup>-1</sup>. Concentração inicial de células no reator: 50g.L<sup>-1</sup> (a) principais produtos (b) somatório dos ácidos orgânicos formados (acetato, formiato, malato; succinato; butirato e lactato). Os pontos nos gráficos representam: média± desvio padrão de duas amostragens no período de 24 horas.



Na Tabela 4.19, foram destacados alguns parâmetros do processo. A conversão, o rendimento e a produtividade dos dois principais produtos da SIF e a seletividade do etanol em relação ao xilitol obtidos no ensaio contínuo são comparados aos parâmetros do processo conduzido em batelada, nas mesmas condições iniciais. De modo geral, os parâmetros do processo contínuo durante os primeiros sete dias foram muito semelhantes aos do processo

conduzido em batelada. Nesse período, as produtividades do etanol e xilitol foram em média 1,9 e 1,0g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente. O rendimento em xilitol no mesmo período estava no intervalo 0,19-0,22g.g<sup>-1</sup>, ou seja, diferiam em no máximo 10% do rendimento obtido na batelada. Já os rendimentos em etanol foram mais elevados no ensaio contínuo. Entretanto, o aumento verificado é justificável porque durante o cálculo do parâmetro  $Y_{\text{ETOH/S}}$  levou-se em consideração todo o álcool quantificado no efluente, que inclui alguma contribuição de concentrações de etanol presentes no meio de alimentação. A seletividade do etanol em relação ao xilitol também foi superior no ensaio contínuo. Porém, faz-se a mesma ressalva feita para  $Y_{\text{ETOH/S}}$ . A partir do 8º dia de ensaio, as produtividades volumétricas e os rendimentos diminuíram em relação ao ensaio em batelada. Esse fato está relacionado ao desvio de açúcar causado pelos contaminantes.

É importante relatar que durante os 11 dias de experimento, nenhum dano aparente aos pellets foi detectado. Uma imagem do reator carregado no tempo final da SIF é apresentada na Figura 4.23.

**Figura 4.23** – Imagem do reator contínuo contendo bicatalisador IGI-Ch/S. *cerevisiae* (20:10) após 11 dias de ensaio.





**Tabela 4.19** – Parâmetros da SIF de 65g.L<sup>-1</sup> a 32°C conduzida em reatores batelada e contínuo a pH inicial 5,6 com biocatalisador IGI-Ch/S. *cerevisiae* (20:10)+CaCO<sub>3</sub> 0,5% (m/m). Concentração de enzima do reator 120 UI.mL<sup>-1</sup>. Concentração inicial de células no reator: 50g.L<sup>-1</sup>

SIF DE XILOSE EM BATELADA						
Tempo (h)	Conversão (%)	Y <sub>ETOH/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>XOH/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Pr <sub>ETOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr <sub>XOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	S <sub>ETOH/XOH</sub> (mol.mol <sup>-1</sup> )
12	98,5	0,35±0,04	0,21±0,01	1,9±0,2	1,1±2,9 x10 <sup>-2</sup>	5,7±0,4
SIF DE XILOSE EM OPERAÇÃO CONTÍNUA (ENSAIO 3)						
Tempo (dia)	Conversão (%)	Y <sub>ETOH/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>XOH/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Pr <sub>ETOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Pr <sub>XOH</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	S <sub>ETOH/XOH</sub> (mol.mol <sup>-1</sup> )
1	89,0	0,37±0,03	0,22±1,14x10 <sup>-3</sup>	1,8±0,2	1,1±3,2x10 <sup>-3</sup>	5,5±0,5
2	91,7	0,38±0,02	0,20±1,23x10 <sup>-3</sup>	1,9±0,1	1,0±1,2x10 <sup>-2</sup>	6,3±0,3
3	91,1	0,41±0,01	0,21±8,90x10 <sup>-4</sup>	2,0±0,1	1,0±4,9x10 <sup>-3</sup>	6,6±0,2
4	90,5	0,37±0,01	0,19±4,17x10 <sup>-3</sup>	1,8±0,1	0,9±4,4x10 <sup>-2</sup>	6,4±3,06x10 <sup>-3</sup>
5	88,9	0,40±0,01	0,21±2,64x10 <sup>-3</sup>	1,9±4,9x10 <sup>-2</sup>	1,0±1,7x10 <sup>-2</sup>	6,4±0,1
6	88,9	0,39±0,01	0,21±4,52x10 <sup>-3</sup>	1,9±0,1	1,0±4,7x10 <sup>-2</sup>	6,3±3,03x10 <sup>-3</sup>
7	85,8	0,38±0,01	0,21±2,28x10 <sup>-3</sup>	1,8±1,7x10 <sup>-2</sup>	1,0±5,1x10 <sup>-3</sup>	6,0±0,1
8	82,2	0,37±5,76x10 <sup>-4</sup>	0,20±2,64x10 <sup>-3</sup>	1,6±2,4x10 <sup>-2</sup>	0,9±2,4x10 <sup>-2</sup>	6,0±0,1
9	76,5	0,37±0,01	0,18±2,86x10 <sup>-3</sup>	1,5±0,1	0,8±3,1x10 <sup>-2</sup>	6,7±4,0x10 <sup>-2</sup>
10	82,7	0,33±0,01	0,18±2,87x10 <sup>-3</sup>	1,5±0,1	0,8±0,1	5,9±0,1
11	66,0	0,33±5,13 x10 <sup>-4</sup>	0,18±2,43x10 <sup>-3</sup>	1,3±0,1	0,7±3,9x10 <sup>-2</sup>	5,8±0,1

NOTA: Batelada: conduzido com adição solução de CaCO<sub>3</sub> ao pellets para controle do pH do meio. ETOH: etanol, XOH: xilitol, Y: rendimento, Pr: produtividade volumétrica global (calculada em tempo de residência de 12 h), S<sub>ETOH/XOH</sub>: seletividade do etanol em relação ao xilitol. Ensaio 3: conduzido com adição de NaOH 0,1-0,5M ao reator para ajuste de pH e adição periódica de antibióticos ao meio de alimentação.

Diante do exposto, pode-se afirmar que os resultados obtidos durante a SIF contínua de xilose são promissores, contudo a questão da prevenção da contaminação é a mais urgente a ser solucionada.

Após o término do terceiro ensaio, a análise microscópica da suspensão resultante da dissolução dos pellets, não revelou a presença de células de microrganismos contaminantes, reforçando a hipótese de que a contaminação ocorria durante a realização do experimento. A presença de microrganismos contaminantes pode estar relacionada a diferentes fontes. Eles podem se desenvolver a partir de pontos mais difíceis de limpar, como, por exemplo, ângulos agudos, cantos e juntas, uma vez que depósitos nestas áreas protegem os organismos do calor durante esterilização. Outra importante fonte de contaminação é o ar. No caso de sistemas com células e enzima coimobilizadas, conduzir um experimento totalmente estéril é uma tarefa complexa, pois o processo completo desde a confecção do catalisador até o início da SIF compreende inúmeras etapas e uso de materiais e equipamentos que dificultam uma assepsia total. As etapas de adição dos pellets ao reator e de amostragem do meio fermentado, realizadas em condições não estéreis, certamente favoreceram a presença de microrganismos contaminantes no sistema. Além disso, existem limitações adicionais no sistema de SIF de xilose que favorecem o crescimento de microrganismos indesejados: a primeira delas está relacionada ao fato de a levedura não crescer no meio (fora dos pellets) de modo a poder competir com microrganismos contaminantes consumidores de xilulose.

Contudo, nos experimentos de hidrólise e fermentação simultâneas de amido de mandioca, realizados por Trovati (2001), o problema da contaminação não foi verificado, com operação contínua por mais de 30 dias. A chave para a manutenção do sistema livre de contaminantes certamente devia ser o crescimento da levedura fora dos pellets, cuja concentração era da ordem de  $10^6$  a  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. Porém, no processamento de xilose por SIF, o crescimento de células de *S. cerevisiae* fora dos pellets não seria suficiente para manter o sistema livre de microrganismos contaminantes porque a levedura não compete por xilose, o principal açúcar disponível no meio.

Durante o atual estudo, o uso de antibióticos diversos provou ser uma alternativa pouco eficiente. Além disso, esta forma de controle pode ser economicamente inviável e não aconselhável de um ponto de vista ambiental. O uso de compostos naturais com o extrato lúpulo para controle de contaminação bacteriana em plantas de fermentação de lignocelulósicos vem sendo discutida, como alternativa aos biocidas sintéticos (SAKAMOTO; KONINGS, 2003).

A solução para o problema da contaminação durante a SIF em operação contínua requer a adoção de estratégias de prevenção e controle diferenciadas daquelas aqui

apresentadas. Uma opção, seria operar o reator contínuo com implementação de um sistema de barreira térmica. Nessa estratégia de controle preventivo o meio de alimentação deve passar por um sistema de aquecimento antecedendo a sua entrada no reator. Esse procedimento tem por finalidade promover uma pasteurização contínua do meio de alimentação evitando a proliferação de microrganismos contaminantes. Uma visão ainda mais avançada desse processo contempla a adição de uma coluna de isomerização de xilose, onde ao mesmo tempo se faz a isomerização do açúcar a xilulose pela ação da enzima glicose isomerase e a pasteurização do meio por ação da temperatura, uma vez que a temperatura de máxima atividade da enzima está entre 60-70°C. A vantagem adicional dessa última abordagem é a alimentação direta do meio pré-isomerizado, favorecendo a velocidade de consumo do açúcar e o crescimento de uma população de levedura no meio externo para competir com eventuais contaminantes. Mudanças no procedimento de amostragem com a introdução de septos para retirada asséptica de pequenos volumes do meio de alimentação e dos efluentes dos reatores também é necessária. O acompanhamento da vazão de alimentação poderia ser feito colocando-se o frasco de meio sobre uma balança.

#### **4.7 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM INFORMAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA**

Neste trabalho, a viabilidade do processo descontínuo de simultânea isomerização e fermentação de xilose e hemicelulose de bagaço de cana com levedura de panificação e glicose isomerase coimobilizadas em gel de alginato de cálcio foi demonstrada. Além disso, os resultados obtidos no processo SIF contínuo mostraram-se bastante promissores. A grande vantagem que se destaca para o processo estudado é a conversão eficiente da xilose num processo que engloba a mesma espécie de levedura utilizada na planta industrial atual de produção de etanol. Uma limitação verificada está relacionada ao desvio de açúcar para a produção de xilitol, diminuindo consideravelmente o rendimento em etanol. Na Tabela 4.20 foram destacados alguns resultados descritos na literatura no que diz respeito à utilização de xilose/xilulose para produção de etanol em comparação aos resultados obtidos durante o atual estudo.

Como se sabe grande parte dos estudos voltados à produção de etanol a partir de pentoses refere-se a modificações genética da levedura *S. cerevisiae*. Nesse sentido, Johansson e Hahn-Hägerdal (2002) estudaram a fermentação de xilulose mediante condução do processo com a levedura *S. cerevisiae* TMB 3026, uma mutante que expressa genes de xilose redutase e

xilitol desidrogenase de *P. stipitis*, xiluloquinase endógena e mais quatro enzimas da via pentose fosfato. Como resultado, um rendimento em etanol de  $0,39\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , que corresponde a cerca de 75% do teórico. Similarmente ao observado no atual estudo, xilitol era um importante co-produto.

Yuan e colaboradores (2012), conduziram a SIF da mistura glicose/xilose ( $60/30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) num sistema que engloba o uso de glicose isomerase coimobilizada com urease e elevada concentração de células de *S. cerevisiae* YSC2 livres no reator ( $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Apesar da elevada concentração de células, apenas 46% ( $13,8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) da xilose foi consumida em 10 horas de ensaio, um desempenho muito inferior ao verificado no atual estudo, no qual se verificou consumo de aproximadamente  $65\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  em 12 horas, com uma concentração inicial de células quatro vezes inferior.

Kuyper e colaboradores (2005) reportaram resultados interessantes de fermentação da xilose por *S. cerevisiae* geneticamente modificada. Uma única estratégia de mutação, a superexpressão de xilose isomerase do fungo *Piromyces sp. E2* (ATCC 76762) foi suficiente para que a levedura produzisse etanol com elevado rendimento ( $0,42\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , equivalente a 82% do teórico) e baixo rendimento em xilitol  $0,02\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Zhao e Xia (2010) utilizaram uma estratégia de modificação genética (expressão de xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase) distinta daquela abordada por Kuyper et al. (2005). Porém, os rendimentos da fermentação de hidrolisado desintoxicado de hemicelulose de palha de milho pela cepa resultante, *S. cerevisiae* ZU-10, foram muito parecidos:  $0,42\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e  $0,06\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , em etanol e xilitol, respectivamente. Em comparação, no atual estudo, a SIF do hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana (não desintoxicado) resultou em rendimentos médios de etanol e xilitol de  $0,34$  e  $0,19\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente. Neste caso, o rendimento em etanol é inferior, porém do ponto de vista da recuperação de carbonos em produtos de elevado valor agregado, o processo SIF teve desempenho mais interessante.

**Tabela 4.20** – Eficiência de utilização de xilose/xilulose e hemicelulose na produção de etanol por diferentes tipos de levedura.

Processo <sup>Referência</sup> Tipo de reator	Substrato (G.L <sup>-1</sup> )	Microrganismo/ concentração inicial	Xilose Inicial (g.L <sup>-1</sup> )	tempo (h)	X (%)	*Y <sub>ETOH</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>XOH</sub> (g.g <sup>-1</sup> )
Fermentação <sup>1</sup> Batelada	Xilulose	<i>S. cerevisiae</i> TMB3026 (recombinante) (5g.L <sup>-1</sup> )	54,0	45	99,9	0,39	0,17
SIF <sup>2</sup> Batelada	Mistura glicose-xilose (60-30)	<i>S. cerevisiae</i> YSC2, tipo II (200g.L <sup>-1</sup> )	30,0	10	46	0,48	0,13
Fermentação <sup>3</sup> Batelada	Xilose	<i>S. cerevisiae</i> RWB202 recombinante (< 1g.L <sup>-1</sup> )	20,0	110	100	0,42	0,02
Fermentação <sup>4</sup> Batelada	Hidrolisado hemicelulose de palha milho (desintoxicado)	<i>S. cerevisiae</i> ZU-10 imobilizada, recombinante (8,9 × 10 <sup>9</sup> cels.mL <sup>-1</sup> )	71,8	72	97	0,42	0,06
Fermentação <sup>5</sup> Batelada	Hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana (não desintoxicado)	<i>Pachysolen tannophilus</i> DW06 (< 1g.L <sup>-1</sup> )	45,0	40	9	0,33	n.r.
Fermentação <sup>5</sup> Batelada	Hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana (desintoxicado)	<i>Pachysolen tannophilus</i> DW06 (< 1g.L <sup>-1</sup> )	42,8	36	94	0,34	n.r.
SIF <sup>6</sup> Batelada	Xilose	<i>S. cerevisiae</i> de panificação (50g.L <sup>-1</sup> )	66,3	12	96,5	0,32 (4,42x10 <sup>-3</sup> )	0,23 (3,54 x10 <sup>-3</sup> )
SIF <sup>6</sup> Batelada	Hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana (não desintoxicado)	<i>S. cerevisiae</i> de panificação (50g.L <sup>-1</sup> )	65,3	12	92,9	0,34 (0,01)	0,19 (5,50x10 <sup>-3</sup> )

Referência: 1. Johansson e Hahn-Hägerdal (2002); 2. Yuan et. al. (2012); 3. Kuyper et al. (2005); 4. Zhao e Xia (2010); 5. Cheng et al., 2008; 6. Atual Estudo.

X: conversão; Y<sub>ETOH</sub>: rendimento do etanol, Y<sub>XOH</sub>: rendimento do xilitol.

\*Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, n.r.: informação não relatada.

A levedura *Pachysolen tannophilus* metaboliza xilose anaerobicamente e naturalmente produz etanol como produto majoritário. O uso desse microrganismo na fermentação de hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana (desintoxicado e não desintoxicado) foi reportada por Cheng et al. (2008). Categoricamente ficou comprovando que a levedura é consideravelmente afetada por inibidores resultantes do tratamento ácido do bagaço. Na presença de furfural e ácido acético (2,0 e 8,4g.L<sup>-1</sup>, respectivamente), a eficiência de utilização de xilose foi muito baixa: apenas 9g.L<sup>-1</sup> dos 45g.L<sup>-1</sup> disponíveis foram metabolizados em 40 horas de ensaio. Quando o hidrolisado foi desintoxicado e as concentrações de furfural e ácido acético diminuíram para 1,1 e 0,8g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em termos de consumo 40,2g.L<sup>-1</sup> de xilose foram metabolizados em 36 horas. Neste caso, o rendimento em etanol foi exatamente igual ao verificado na SIF do hidrolisado de hemicelulose do bagaço de cana empregado no atual estudo.

Diante dos resultados descritos pode-se afirmar que em termos de rendimento em etanol, os melhores resultados foram aqueles obtidos em processos conduzidos com levedura geneticamente modificada. Entretanto, o uso de organismos geneticamente modificados em escala industrial ainda é uma questão duvidosa. Já a fermentação de xilose por *Pachysolen tannophilus* resultou em rendimentos equivalentes aos obtidos nas SIFs conduzidas no atual estudo. Neste caso, o processo SIF é vantajoso por utilizar o microrganismo naturalmente presente no processo convencional.

É obvio que o *scale-up* de um processo envolve muitas outras questões não discutidas no atual estudo. Os resultados aqui apresentados são um simples indicativo de viabilidade técnica e contribuem para agregar conhecimento a uma opção de processo de produção de etanol a partir de xilose cujas discussões ficaram estagnadas na década de 80 do século passado. O processamento de xilose em operação contínua, por exemplo, praticamente não é citado na literatura. No decorrer da revisão bibliográfica realizada, apenas um trabalho foi identificado (CHIANG et al., 1982b).

## 5 CONCLUSÕES

Quanto à obtenção de derivados da enzima glicose isomerase:

- ✓ Derivados de glicose isomerase com elevada atividade catalítica foram obtidos mediante imobilização da enzima em quitosana ativada com glutaraldeído. O melhor derivado continha  $1700 \text{ UI.g}^{-1}$  de catalisador. IGI-Ch reteve aproximadamente 90% da atividade inicial após 120 horas de incubação em condições típicas de operação para produção de etanol. Enquanto glicose isomerase solúvel é praticamente inativa a pH 5 e  $30^\circ\text{C}$ , a isomerização xilose/xilulose catalisada por IGI-Ch atinge concentrações de equilíbrio em cerca de quatro horas e usando apenas  $7\text{g.L}^{-1}$  do catalisador em meio contendo  $60\text{g.L}^{-1}$  de xilose e outros nutrientes típicos para a produção de etanol por *S. cerevisiae*.
- ✓ A imobilização de GI no suporte glioxil-agarose requisitou a aaminação química da estrutura proteica. Durante este procedimento a enzima solúvel perde 40% da sua atividade inicial. Além disso, após a imobilização apenas 69% da atividade foi recuperada.
- ✓ Considerou-se o primeiro derivado uma boa opção para aplicação na SIF de xilose porque quitosana é um suporte barato e de fácil aquisição no país e, além disso, o procedimento de imobilização da enzima é prático e possibilita aquisição de derivados com cargas superiores a 60 mg de proteína de ativa por grama de suporte.

Quanto à definição de condições adequadas para a SIF de xilose:

- ✓ A adição do carbonato de cálcio como componente do biocatalisador obtido pela coimobilização de glicose isomerase imobilizada e levedura de panificação foi uma estratégia eficiente para manutenção do pH do meio de SIF em valores adequados para garantia de atividade de GI a  $35^\circ\text{C}$ . Nestas condições, concentrações de enzima e levedura no reator da ordem de  $60\text{-}120 \times 10^3 \text{ UI.L}^{-1}$  e  $50\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, foram consideradas adequadas para condução da SIF em batelada, levando a bons resultados em termos de rendimento e seletividade a etanol.
- ✓ Em se tratando SIF contínua, adotou-se a concentração celular equivalente à usada na batelada e a concentração de enzima mais elevada ( $120 \times 10^3 \text{ UI.L}^{-1}$ ). Neste caso

temperaturas menores que 32°C são requeridas para a garantia de elevada viabilidade celular por longo período.

Quanto aos produtos, rendimentos, produtividade e seletividade ao etanol na SIF de xilose em batelada a 35°C e concentração de enzima e células no reator de 120 UI.L<sup>-1</sup> e 50g.L<sup>-1</sup>:

- ✓ A SIF de 65g.L<sup>-1</sup> de xilose cuja conversão foi de 96,5±0,2% em 12 horas de reação, resultou em 20,7±0,1g.L<sup>-1</sup> de etanol e 14,6±0,3g.L<sup>-1</sup> xilitol, que correspondem a produtividades volumétricas globais da ordem de 1,7 e 1,2g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente. O rendimento em etanol 0,32±4,42x10<sup>-3</sup>g.g<sup>-1</sup> corresponde a aproximadamente 63% do teórico. Em termos de seletividade ao etanol, cerca de 5 mols de etanol foram formados para cada mol de xilitol produzido.
- ✓ Glicerol e ácido acético também foram produzidos, porém o somatório das suas concentrações era inferior a 5g.L<sup>-1</sup>.

Quanto à obtenção do hidrolisado de hemicelulose do bagaço de cana e utilização na produção de etanol:

- ✓ Um hidrolisado com concentração de xilose superior a 60g.L<sup>-1</sup> foi obtido por tratamento da biomassa com ácido sulfúrico diluído.
- ✓ A utilização do hidrolisado não desintoxicado na preparação de meios de SIF resultou em produções de etanol e xitol equivalentes aos obtidos no processo conduzido com xilose pura.

Quanto a SIF de xilose em operação contínua:

- ✓ A SIF contínua de xilose foi conduzida com rendimentos equivalentes aos do processo descontínuo por um período de 7 dias. A continuidade do processo nesse intervalo de tempo foi garantida a custos da dosagem de elevadas quantidades de antibióticos e adição de solução de NaOH para correção do pH do meio.
- ✓ Os resultados obtidos são animadores, porém estratégias mais eficientes para prevenção contra contaminações microbianas devem ser adotadas.



## Conclusão Geral

Em síntese, conclui-se que é tecnicamente possível, através da rota de isomerização e fermentação simultânea, produzir etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana utilizando a levedura comumente aplicada na usina sucroalcooleira. No atual estudo, etanol foi produzido a partir de xilose com produtividade significativamente mais elevada se comparada aos valores frequentemente descritos na literatura (seja com uso de microrganismos geneticamente modificados ou com aplicação daqueles que naturalmente fermentam xilose).

O trabalho iniciado neste estudo é bastante promissor e apresenta uma série de desafios que devem ser considerados em trabalhos futuros. A questão da produção do subproduto xilitol, a necessidade de monitoramento e controle do pH do meio reacional, a tolerância da levedura, em processos contínuos, aos inibidores presentes no caldo hidrolisado e os custos gerais do processo em devem ser estudados.

### Sugestões para continuidade do trabalho

- ✓ Operar o reator contínuo de SIF com elevada concentração de xilose na alimentação, por exemplo  $200\text{g.L}^{-1}$ , de modo a equiparar a produção de etanol com a fermentação alcoólica praticada a nível industrial ( $70\text{-}85\text{g.L}^{-1}$ ). Dessa forma espera-se diminuir o nível de contaminação no meio de alimentação devido à elevada pressão osmótica e no reator, devido à presença de elevadas concentrações de etanol.
- ✓ Operar o reator contínuo com implementação de um sistema de barreira térmica ou coluna de pasteurização/isomerização;
- ✓ Avaliar a SIF de xilose em outras configurações de reatores que permitam condições mais adequadas de operação estéril e controle do pH. Reatores de leito fluidizado podem ser uma boa opção, pois permitem a recirculação do meio em níveis adequados para garantir condições ideais de mistura e adequado controle do pH;
- ✓ Estudar a SIF de xilose mediante a presença de inibidores da enzima xilitol desidrogenase, no sentido de desfavorecer a reação de xilulose a xilitol que supostamente limita o rendimento de etanol durante o processo;
- ✓ Agregar analisador de gases ao sistema reacional para obter dados do  $\text{CO}_2$  formado durante a SIF;

- ✓ Verificar a influência da concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na formação de xilitol. A literatura reporta que durante a fermentação de xilose por *C. guilliermondii* a suplementação de fosfato de potássio eleva o rendimento e a produtividade em xilitol (CORTEZ; ROBERTO, 2006);
- ✓ Seguir uma tendência mundial de diminuição do uso de antibióticos sintéticos em favor dos antibióticos naturais;
- ✓ Otimizar a recuperação de açúcares do hidrolisado obtido por tratamento ácido do bagaço de cana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S. et al. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2170–2179, 2008.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção Na Fermentação: Como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, v.2, n.5, p.12-18, 1982.

AQUINO, Patrícia Marina de. Produção de Etanol a partir de xilose com glicose isomerase e *Sacharomyces cerevisiae* coimobilizadas em gel de alginato. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 2013.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35-52 2004.

BETANCUR, J. V.; PEREIRA Jr, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. **Biotechnology Industry**, v. 13 n. 3, 2010.

BETTIGA, M.; BENGTTSSON, O.; HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 40, 2009.

BHOSALE, S. H. RAO, M B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase, **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 280–300, 1996.

BIERMANN, C. J. **Handbook of pulping and papermaking**. 2. Ed. Oregon: Academic Press, 1996. 754 p.

BLANCO, R.M.; CALVETE, J.J.; GUISÁN, J.M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine) –agarose (aldehyde) multipoint attachment. **Enzyme and Microbial Technology**. v.11, p.353-359. 1989.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation and fractionation of saccharides and polysaccharides. In: DUMITRIU, Severian. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. New York: Ed. Marcel Dekker, 2005. p. 893-932.

BOLIVAR, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; GODOY, C. et al. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6-7, p. 477–483, 2009.

BOTHAST, R. J.; NICHOLS, N. N., DIEN B. S. Fermentations with new recombinant organisms. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 867–875, 1999.

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6537–6542, 2009.

BOYER, L. J.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T. et al. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 1992.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3241–3246, 2011.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862–4874, 2010.
- BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; et al.  $\beta$ -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization, **Central European Journal of Chemistry**, v. 3, p. 95–105, 2005.
- CALLENS, M.; KERSTERS-HILDERSON, H.; OPSTAL, O. VAN; et al. Catalytic properties of d-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 11, p. 696–700, 1986.
- CANETTIERI, E. V.; ROCHA, J. M.; CARVALHO, et al. Evaluation of the kinetics of xylose formation from dilute sulfuric acid hydrolysis of forest residues of *Eucalyptus grandis*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 7, p. 1938–1944, 2007.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. D, et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 84–92, 2010.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.
- CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. F.; ANJOS, V. et al. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA V. S. Application of a compatible xylose isomerase in simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, p. 32-39, 2000 a.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 301-309, 2000 b.
- CHENG, K.-K.; CAI, B.-Y.; ZHANG, J.-A. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105–109, 2008.
- CHIANG, L. C.; GONG, C. S.; CHEN, L. F.; TSAO, g. T. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 42, n. 2, p. 284–289, 1981.
- CHIANG, L. C.; HSIAO, H. Y.; FLICKINGER, M. C.; et al. Ethanol production from pentoses by immobilized microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 2, p. 93–95, 1982.
- CHU, B. C. H., LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 425–441, 2007.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Effect of phosphate buffer concentration on the batch xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 321–325, 2006.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996.

DORTA, CLAUDIA. Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26. Tese (Doutorado) Rio Claro Estado de São Paulo Universidade Estadual Paulista, 2006.

DROGUI, P.; MERCIER, g.; BLAIS, J.F. Bioproduction of ferric sulfate used during heavy metals removal from sewage sludge. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, n. 3, p. 816–24, 2005.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). Balanço energético nacional 2012 – Ano base 2011: Síntese do Relatório Final. Rio de Janeiro, 2012. 56 p. Disponível em: < <https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioFinal2012.aspx> >. Acesso em: 10 de março de 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, g. Wood: **Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; MATEO, C; et al. Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 95–104, 2001.

FOGEL, R.; GARCIA, R. R.; OLIVEIRA, R. D. S. 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.

FROLLINI, E.; PIMENTA, M. J. A. Lignin: utilization as a macromonomer in the synthesis of phenolic type resins. **Anais da Associação Brasileira de Química**; v. 9, p. 46-43, 1997.

GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 24–34, 2007.

GARGOURI, B.; KARRAY, F.; MHIRI, N.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, n. 1-2, p. 427–34, 2011.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on sílica and agarose: comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.4, p.313-327. 1998.

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.

GIORDANO, Raquel de Lima Camargo. Estudo da coimobilização de glicoamilase e levedura para a fermentação alcoólica de matéria-prima amilácea. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992. 238 p.

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.

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

GOOIJER, C. D., BAKKER, W. A .M. et at. Bioreactors in series: an overview of design procedures and practical applications. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, n. 3, p. 202–219, 1996.

GRUPPEN, H.; HAMER, R. J.; VORAGEN, A.g. J. Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water extractable arabinoxylans. **Journal of Cereal Science**, v. 16, 53–67, 1992.

GUISÁN, J. M. Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375–382, 1988.

HAHN-HÄGERDAL, B.; BERNER,S.; SKOOG, K. Improved ethanol production from xylose with glucose isomerase and *Saccharomyces cerevisiae* using the respiratory inhibitor azide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 4, 287–293, 1986.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937–953, 2007.

HEADY, R. E.; JACAWAY JR., W. A. Method for recovering xylose isomerase, United States Patent 3941655, 1974.

HOFFSTETTER-KUHN, S.; PAULUS, A.; GASSMANN, E. et al. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 15, p. 1541-1547, 1991.

HSIAO, H.; CHIANG, L.; CHEN, L. et al. Effects of borate on isomerization and yeast fermentation of high xylulose solution and acid hydrolysate of hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 25-31, 1982.

HUGHES, S. R.; RICH, J. O.; BISCHOFF, K. M. et al. Automated yeast transformation protocol to engineer *Saccharomyces cerevisiae* strains for cellulosic ethanol production with open reading frames that express proteins binding to xylose isomerase identified using a robotic two-hybrid screen. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 14, n. 4, p. 200-212, 2009.

JACKSON,g.; ROCHA, D. M.; LORENA, E. D. E. DE; et al. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

JANIS, J.; PASANEN, S.; ROUVINEN. J.; et al. Characterization of the pH-dependent dissociation of a multimeric metalloprotein *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase by ESI FT-ICR mass spectrometry, **J. Mass Spectrom.**, v. 43, p. 1376–1380, 2008.

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

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

- KHONGSAY, N.; LAOPAIBOON, L.; LAOPAIBOON, P. Improvement continuous ethanol production from sweet sorghum juice using a multistage bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 558–558, 2010.
- KONG, H.; MOONEY, D. J. Polysaccharide-Based Hydrogels in Tissue Engineering. In: DUMITRIU, Severian. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**. New York: Ed. Marcel Dekker, 2005. p. 817-837.
- KONSTANTINOV, K. Continuous bioprocessing: an interview with Konstantin Konstantinov from Genzyme. Interviewed by Prof. Alois Jungbauer and Dr. Judy Peng. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 12, p. 1431–1433, 2011.
- KORMELINK, F. J. M.; VORAGEN, A.g. Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 688–695, 1993.
- KRISTO, P., SAARELAINEN, R.; FAGERSTRÖM, R. et al. Protein purification, and cloning and characterization of the cDNA and gene for xylose isomerase of barley. **Eur. J. Biochem.** v. 237, p. 240-246, 1996.
- KUMAR, C. A. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.
- KUYPER, M.; HARTOG, M. M. P.; TOIRKENS, M. J. et al. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4-5, p. 399–409, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227, 680 – 685, 1970.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.g. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugarcane bagasse from bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33–44, 2002.
- LASTICK, S. M.; TUCKER, M. Y.; BEYETTE, J. R. et al. Simultaneous fermentation and isomerization of xylose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, 1989.
- LADISCH, M. R.; EMERY, A.; RODWELL, V. W. Economic implications of purification of glucose isomerase prior to immobilization, **Industrial & Engineering Chemistry: Process Design & Development**, v. 16, p. 309-313, 1977.
- LIM, L. H.; SAVILLE, B. A. Thermoinactivation Mechanism of Glucose Isomerase, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115 p. 136–140, 2007.
- LEE, T.; KIM, M., KIM, K. et al. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, p.27-31, 2000.
- LEONARD, R.H.; HAJNY,g. J. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, p. 390–395, 1945.
- LOBO, P. C. JAGUARIBE, E.F.; RODRIGUES, J. et al. Economics of alternative sugar cana milling options. **Applied Thermal Engineering**, v. 27, 8–9, p. 1405–1413, 2007.

LÖNN, A.; TRÄFF-BJERRE, K. L.; OTERO, R. R. C. et al. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated xylA from *Thermus thermophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 567-573, 2003.

LÓPEZ-GALLEGU, F.; MONTES, T.; FUENTES, M. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005.

MAALEJ-ACHOURI, I. GUERFALI, M.; GARGOURI, A. et al. Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 145-152, 2009.

MAJETI, N.V.; KUMAR R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1–27, 2000.

MANRICH, A. GALVÃO, C. M. A.; JESUS, C. D. F. et al. Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 54-61, 2008.

MARAIS, Susann. Enzymatic hydrolysis with commercial enzymes of a xylan extracted from hardwood pulp. Dissertação de Mestrado, University of Pretoria, 2008.

MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJÖDE. A. 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.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W. et al. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 526–536, 2000.

MATEO, C.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M. et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde–dextran, in: J. M. Guisan, **Immobilization of Enzymes and Cells**, Humana Press, New Jersey, 2006, pp. 129-141.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S. et al. Efficient bioethanol production by recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with genome-integrated NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 3818-3822, 2009.

MATSUSHIKA, A.; INOUE H.; KODAKI, T. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 37–53, 2009.

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T., et al. Expression of protein engineered NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase increase ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81 p. 243–255, 2008.

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.

MEINANDER, N. Q.; BOELS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpression of TAL1. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 79–87, 1999.



- MIELLENZ, J. R. Biofuels and Biotechnology. In: MIELLENZ, J. M., RAPLEY, R. **Molecular Biology and Biotechnology**. 5 Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. p. 548-584.
- MOHNEN, D. et al. Cell wall polysaccharide synthesis. In: HIMMEL, Michael E. Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy, Ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom, 2008. p. 94-187.
- MONIRUZZAMAN, M.; OIEN, B. S.; SKORY, C. O. et al. Fermentation of corn fibre sugars by an engineered xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 341–346, 1997.
- MONTES, T.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; FUENTES, M. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports, in: J. M. Guisan, **Immobilization of enzymes and cells**, Humana Press, New Jersey, 2006, pp. 163-173.
- MOON, S. K.; KIM, S. W.; CHOI, g. W. Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 4, p. 584–589, 2012.
- MORAES Guilherme Silveira. Influência da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- NABARLATZ, Debora Alcida. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. Tese (Doutorado) - Universidade Rovira e Virgili, Tarragona, 2006. 248 p.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*, **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17–27, 2001.
- OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LIDÉN, g. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*, **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 112-120, 2008.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, 312–331, 1996.
- PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 4, p. 447-454, 1999.
- PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; MATEO, C. et a. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p.1160-1166. 2007.
- PENG, F.; REN, J.; XU, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6305–6317, 2009.
- PRASAD, B.; MISHRA, I. M. On the kinetics and effectiveness of immobilized whole-cell batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 53, n. 3, p. 269–275, 1995.
- RAKIN, M.; MOJOVIC, L.; NIKOLIC, S. et al. Bioethanol production by immobilized *Sacharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 464-471, 2009.

RANATUNGA, T. D.; JERVIS, J.; HELM, R. F. et al. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 240, 2000.

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

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.

RIZZI, M.; HARWART, K.; BUI-THANH, N.-A.; DELLWEG, H. A kinetic study of the NAD<sup>+</sup>-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n. 1, p. 25–30, 1989.

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

ROSEVEAR, A. Immobilised biocatalysts - A critical review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 127–150, 2008.

ROSSELL, C. E. V. Fermentação do Hidrolisado III. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3., 2006, Universidade Estadual de Campinas, **Palestra...** Campinas. Disponível em: <<http://www.inovacao.rei.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Rossel%20Fermenta%E7%E3o%20do%20Hidrolisado.pdf>>. Acesso em: 15 de julho de 2010.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279–291, 2003.

SAHA, B. C.; JORDAN, D. B. *Encyclopedia of Microbiology*, 2009.

SAKAMOTO, K., KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **Int. J. Food Microbiol.** v. 89, p. 105–124, 2003.

SALGADO, J. M.; RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS, S.; DOMÍNGUEZ, J. M. Coupling two sizes of CSTR-type bioreactors for sequential lactic acid and xylitol production from hemicellulosic hydrolysates of vineshoot trimmings. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 421–427, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247–251, 2001.

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

SIMÕES, E. O.; Rodriguez, N. M.; Morais, S. A. L. et al. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31 n. 5, 2001.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: Fundamentals and applications**. 2 ed. Espoo: Academic Press. 1993. 293 p.

- SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 66-80, 1988.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, 2010.
- STRANDBERG, g. W.; SMILEY, K. L. Free and immobilized glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenes*. **Applied Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 588-93, 1971.
- SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.
- TAHERZADEH, M. J. **Ethanol from lignocellulose: physiological effects of inhibitors and fermentation strategies**. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade de Tecnologia Chalmers, Gotemburgo, 1999.
- TALEBNIA, F.; TAHERZADEH, M. J. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 377-84, 2006.
- TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E. et al. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.
- TORTORA, g. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. São Paulo: Artmed, 2002.
- TROVATI, J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Improving the performance of a continuous process for the production of ethanol from starch. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, n. 1-3, p. 76-90, 2009.
- TROVATI, Joubert. Produção de etanol a partir de amido utilizando levedura e amiloglicosidase coimobilizadas em gel de pectina. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.
- TÜKEL, S. S.; ALAGÖZ, D. Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose, **Food Chemistry**, v. 111, 658-662, 2008.
- UM, B-H; BAE, S-H. Statistical methodology for optimizing the dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 5, p. 1172-1176, 2011.
- UNREAN, P.; SRIENC, F. Continuous production of ethanol from hexoses and pentoses using immobilized mixed cultures of *Escherichia coli* strains. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 215-223, 2010.
- VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E. et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.
- VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; DIJKEN, J P VAN. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of general microbiology**, v. 136, n. 3, p. 405-412, 1990.
- VIEGAS, C. A.; SA-CORREIA, I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 645-651. doi: 10.1099/00221287-137-3-645, 1991.

VILONEN, M. K.; VUOLANTO, A.; JOKELA, J.; A LEISOLA, M. S.; I KRAUSE, A. O. Enhanced glucose to fructose conversion in acetone with xylose isomerase stabilized by crystallization and cross-linking. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, p. 1555–1560, 2004.

VISURI, K.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic production of high fructose corn syrup (HFCS) containing 55% fructose in aqueous ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 7, p. 917–920, 1987.

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

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

WESTMAN, J. O.; TAHERZADEH, M. J.; FRANZÉN, C. J. Proteomic analysis of the increased stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* encapsulated in liquid core alginate-chitosan capsules, v. 7, n. 11, p. 49335. **Public Library of Science**, 2012.

WILSON, J. J.; DESCHATELETS, L.; NISHIKAWA, N. K. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5-6, p. 592-596, 1989.

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

YUAN, D.; RAO, K.; VARANASI, S.; RELUE, P. A viable method and configuration for fermenting biomass sugars to ethanol using native *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour Technol.** v. 117: p. 92-98, 2012.

YUAN, D.; RAO, K.; RELUE, P.; VARANASI, S. Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3246–3253, 2011.

ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 2010.