



DANIELE FARIAS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR *Scheffersomyces stipitis*  
A PARTIR DE PENTOSES EM PROCESSO EXTRATIVO À VÁCUO**

CAMPINAS

2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DANIELE FARIAS

**Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de  
pentoses em processo extrativo a vácuo**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Co-orientador: Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Daniele Farias e orientada pelo Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

---

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

F225p Farias, Daniele, 1984-  
Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses em processo extrativo à vácuo / Daniele Farias. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Francisco Maugeri Filho.  
Coorientador: Daniel Ibraim Pires Atala.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Etanol. 2. Modelagem matemática. 3. Processo extrativo. 4. Pentoses. I. Maugeri-Filho, Francisco. II. Atala, Daniel Ibraim Pires. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Production of second generation ethanol by *Scheffersomyces stipitis* from pentoses by vacuum extractive process

**Palavras-chave em inglês:**

Ethanol

Mathematical modeling

Extractive process

Pentoses

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Doutora em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Francisco Maugeri Filho [Orientador]

Eloizio Julio Ribeiro

Fatima Aparecida de Almeida Costa

Marcio Antonio Mazutti

Rosana Goldbeck

**Data de defesa:** 07-11-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho – Orientador

---

Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro – Membro Titular

---

Dra. Fátima Aparecida de Almeida Costa – Membro Titular

---

Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti – Membro Titular

---

Dra. Rosana Goldbeck – Membro Titular

---

Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert – Membro Suplente

---

Prof. Dr. Rubens Maciel – Membro Suplente

---

Dr. Silvio Andrietta – Membro Suplente



## RESUMO GERAL

A produção biotecnológica de etanol de segunda geração (2G) mediante o cultivo de *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses de hidrolisados hemicelulósicos de resíduos agroindustriais é de grande interesse econômico. Isso porque esse processo pode agregar valor a estes resíduos, possibilitando substituir os combustíveis fósseis, além de promover um aproveitamento mais completo dos materiais. Somando-se a isso, a utilização de meios fermentativos com alta concentração de substrato é de grande interesse para a indústria, pois diminui de forma significativa o volume das dornas e da vinhaça. As grandes quantidades de etanol no meio consomem menos energia no processo de extração. Porém, esta alta concentração de etanol inibe o processo, surgindo necessidade do mesmo ser retirado do meio enquanto é produzido. A utilização de técnicas de extração melhora o desempenho do processo. O uso do evaporador *flash* possibilita usar altas concentrações de açúcares, o que tem como consequência maior produção de etanol, reduzindo o custo da destilação. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma tecnologia alternativa para transpor os gargalos hoje existentes na produção de etanol 2G a partir de pentoses através de um processo fermentativo com retenção de células, acoplado a um evaporador a vácuo tipo *flash*. O protótipo proposto possibilitou investigar a produção de etanol a partir de xiloses, em processo utilizando alta concentração celular de *S. stipitis*. A razão do emprego desta tecnologia se deve à baixa tolerância do micro-organismo ao etanol e à baixa produtividade. Inicialmente foram realizados estudos visando investigar os efeitos inibitórios da concentração de etanol e de substrato no comportamento cinético da linhagem *S. stipitis*. Para tal, foram realizados experimentos no modo batelada e contínuo, com concentração de substrato variando na faixa de 7,5 a 145 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados comprovaram o forte efeito inibitório sobre a velocidade específica de crescimento celular, de consumo de substrato e de etanol produzido quando administradas elevadas concentrações de substrato, bem como quando acumulados altas concentrações de etanol. Com base nestes dados foi desenvolvido um modelo matemático misto, o qual combina os modelos de Andrews e Levenspiel para descrever os efeitos inibitórios da concentração de substrato e etanol, respectivamente. O modelo cinético foi capaz de descrever satisfatoriamente o perfil cinético dos dados experimentais. Fez-se uma análise de sensibilidade paramétrica através do auxílio de um planejamento Plackett-Burman usando o *software* Statistica, variando os parâmetros cinéticos e avaliando o efeito desta variação nos perfis de concentração celular, substrato e etanol. Os parâmetros identificados como mais relevantes do modelo foram  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $n$  e  $Y_{p/x}$ , os quais foram escolhidos para serem re-estimados sempre que houverem mudanças nas condições operacionais. Com intuito de aprimorar a produção de etanol pela linhagem *S. stipitis*, realizaram-se experimentos no modo batelada alimentada. Esta estratégia é utilizada para evitar a repressão catabólica do micro-organismo, bem como para assegurar uma alimentação ótima de substrato no reator. Operar o sistema com esta estratégia resultou em elevados rendimentos e produtividades para este tipo de processo. A máxima concentração de etanol obtida foi de 46 g.L<sup>-1</sup>, obtidas para concentração de xilose no meio de alimentação de 200 g.L<sup>-1</sup>. O rendimento e a produtividade foram 1.1 e 2.3 vezes superiores do que quando operados experimentos no modo batelada simples. Por fim, para testar a operacionalidade da tecnologia desenvolvida foram realizados experimentos com o intuito de avaliar a eficiência do ‘retentostato extrativo a vácuo’. O efeito tóxico promovido pelo etanol em altas concentrações foi minimizado pela extração intermitente em tanque *flash* operado a vácuo. Esta estratégia permitiu manter uma baixa concentração de etanol no meio fermentativo

(~25-35 g.L<sup>-1</sup>) e uma concentração alcóolica no condensador de 40 °GL. A máxima produtividade em etanol obtida o sistema desenvolvido foi de 1 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, obtido com 100 g.L<sup>-1</sup> de xilose no meio de alimentação, valor este 4.35 vezes maior quando comparado aos cultivos no modo batelada simples. A tecnologia proposta aqui pode contribuir para aprimorar futuras pesquisas na produção de etanol 2G por meio do desenvolvimento de processos de baixo custo em escala industrial.

**Palavras-chave:** etanol 2G, *Scheffersomyces stipitidis*, pentoses, modelagem matemática, processo extrativo, retentostato.

## ABSTRACT

The biotechnological production of second generation ethanol (2G) through the cultivation of *Scheffesomyces stipitis* on pentoses obtained from hemicellulose hydrolyzates of agro-industrial wastes is of great economic interest. This is because, this process can add value to these wastes, replace fossil fuels, and promote a complete recovery of materials. Adding to this, the use of fermentation media with high concentration of substrate is of great interest to industry because it reduces significantly the volume of reactors and vinasse. Large amounts of ethanol in the culture medium consume less energy in the extraction process. However, this high concentration of ethanol inhibits the process, so its removal during fermentation is advisable. The use of extraction techniques improves the performance of the process. The use of *flash* evaporator allows the use of high concentrations sugars, which results in increased production of ethanol, reducing the cost of distillation. Facing this, the objective of this study is to develop an alternative technology to bridge the currently existing bottlenecks in the production of 2G ethanol from pentoses through a fermentation process with cell retention, coupled to a vacuum evaporator type *flash*. With the proposed prototype, ethanol production from xyloses was studied in a process utilizing high cell concentration of *S. stipitis*. The reason for the use of this technology is due to the low tolerance of this strain to ethanol as well as the low productivity. Initial studies were conducted in order to investigate the inhibitory effects of ethanol and substrate concentrations in the kinetic behavior of the strain *S. stipitis*. To promote this, experiments were performed in batch and continuous mode, with substrate concentration ranging from 7.5 to 145 g.L<sup>-1</sup>. The results showed a strong inhibitory effect promoted on the specific growth rate, substrate consumption and ethanol production when high initial substrate concentrations were administered, leading to high concentrations of ethanol. Based on these experimental data, a mixed mathematical model that combines models of Andrews and Levenspiel to describe the inhibitory effect promoted by substrate and ethanol concentrations, respectively, has been proposed. The kinetic model was able to satisfactorily describe the kinetic profile of the experimental data. However, mathematical modeling of kinetic parameters is a difficult task and it consumes a considerable period of time. A parametric sensitivity analysis was performed with the aid of a Plackett-Burman design using the Statistic software. The kinetic parameters were varied and the effect of this variation was evaluated in the cell, substrate and ethanol concentration profiles. The most relevant model parameters were  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_x$ ,  $n$  and  $Y_{p/x}$ , which were chosen to be re-estimated whenever there are changes in the operation conditions. In order to enhance the 2G ethanol production by strain *S. stipitis*, experiments were performed in fed-batch mode. This strategy was used to avoid the catabolic repression of this strain as well as to ensure optimal substrate feeding to the reactor. The operate of the system with this strategy resulted in high concentrations of ethanol with high yields and productivities. The maximum ethanol concentration achieved was 46 g.L<sup>-1</sup> obtained for xylose concentration in the feed medium of 200 g.L<sup>-1</sup>. The yield and productivity were 1.1 and 2.3 times higher than when operated in the batch mode. Finally, experiments were conducted to test the effectiveness of the technology developed in order to evaluate the efficiency of 'extractive retentostat vacuum'. The toxic effect caused by high ethanol concentrations was minimized by intermittent extraction in the *flash* tank operated on vacuum. This strategy allowed maintaining a low concentration of ethanol in the fermentation medium (~25 – 35 g.L<sup>-1</sup>) and an alcohol concentration in the condenser at 40°GL. The maximum ethanol productivity obtained was 1 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, obtained with 100 g.L<sup>-1</sup> of xylose in the feed medium,

and this value was 4.35 times higher compared with experiments performed in batch mode. The technology proposed here may contribute to enhance future research in 2G ethanol production through the development of processes for low cost industrial scale.

**Keywords:** 2G ethanol, *Scheffersomyces stipitidis*, pentoses, mathematical modeling, extractive process, retentostat.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xxvii
CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1. Introdução Geral.....	3
1.2. Objetivos .....	7
1.2.1. Objetivo Geral .....	7
1.2.2. Objetivos Específicos.....	7
Referências Bibliográfica.....	8
CAPÍTULO 2 .....	113
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Produção de Etanol no Brasil .....	13
2.2. Biocombustíveis de Primeira, Segunda e Terceira Geração .....	15
2.2.1. Bioetanol de primeira geração (1G) .....	18
2.2.1. Bioetanol de segunda geração (2G).....	19
2.3. Matéria-prima para produção de etanol.....	21
2.4. Biomassa Lignocelulósica.....	23
2.5. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica .....	27
2.5.1. Pré-tratamento físico .....	29
2.5.2. Pré-tratamento físico-químico .....	30
2.5.3. Pré-tratamento químico .....	32
2.5.4. Pré-tratamento biológico .....	34
2.5. Metabolismo da Xilose.....	35
2.6. Micro-organismos fermentadores de xilose .....	37
2.7. <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	43
2.8. Fatores que influenciam a bioconversão .....	44
2.9. Processos de Produção de Etanol .....	49
2.9.1. Processo Batelada.....	49
2.9.2. Processo Batelada Alimentada .....	51
2.9.3. Processo Batelada Alimentada com Reciclo de Células .....	52

2.9.4. Processos Contínuos.....	54
2.9.5. Processos Extrativos: Extração <i>flash</i> a vácuo .....	55
2.10. Cinética Microbiana .....	57
2.11. Modelagem Matemática.....	60
2.11.1. Modelos Cinéticos.....	60
2.11.2. Cinética de inibição.....	63
Referências Bibliográficas .....	69
CAPÍTULO 3 .....	89
3. Kinetic modeling of ethanol production by <i>Scheffersomyces stipitis</i> from xylose .....	89
ABSTRACT.....	89
3.1. Introduction .....	90
3.2. Materials and Methods .....	91
3.2.1. Microorganism and culture media.....	91
3.2.2. Experiments.....	92
3.2.2.1 Batch Fermentations.....	92
3.2.2.2. Continuous Fermentation .....	92
3.2.3 Analytical Determinations.....	92
3.2.4 Kinetic Parameters .....	93
3.2.5 Mathematical Modeling .....	93
3.2.6 Parameter Estimation .....	95
3.3. Results and Discussion.....	96
3.3.1 Mathematical Modeling .....	100
3.4. Conclusion.....	108
References .....	109
CAPÍTULO 4 .....	113
4. Plackett-burman technique for sensitivity analysis of kinetic parameters for second generation ethanol by <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	113
ABSTRACT.....	89
4.1. Introduction .....	116
4.2. Material and Methods.....	118
4.2.1. Microorganism and Media .....	118
4.2.2. Experimental data.....	119
4.2.3. Mathematical Modeling .....	119

4.2.4. Screening of Significant Parameters .....	120
4.3. Results and Discussion.....	123
4.3.1. Plackett-Burman sensitivity analysis.....	123
4.4. Conclusion.....	129
References .....	129
CAPÍTULO 5 .....	113
5. Kinetic modeling of a fed-batch process to optimize an efficient production of second generation ethanol from xylose by <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	135
ABSTRACT.....	135
5.1. Introduction .....	136
5.2. Material and Methods.....	138
5.2.1. Microorganism and inoculum preparation .....	138
5.2.2. Sterilization .....	139
5.3. Fermentations .....	139
5.3.1. Batch cultures .....	139
5.3.2. Fed-batch cultures .....	140
5.2.4. Analytical methodology .....	140
5.2.5. Fed-batch Mathematical Model.....	141
5.3. Results and Discussion.....	144
5.3.1. Fed-batch Culture .....	144
5.3.2. Development of a kinetic model for xylose fermentation by <i>S. stipitis</i> .....	148
5.3.3 Estimation of kinetic parameters by a Quasi-Newton (QN) algorithm.....	148
5.3.4. Experimental versus predicted culture times courses.....	149
5.4. Conclusions .....	153
References .....	154
CAPÍTULO 6 .....	113
6. Montagem e instrumentação do protótipo experimental C5-REV (Retentostato extrativo a vácuo)157	
RESUMO .....	159
6.1. Introdução .....	160
6.2. Material e Métodos.....	162
6.2.1. Equipamentos .....	162
6.2.1.1. Fermentador .....	162
6.2.1.2. Sistema de filtração .....	162

6.2.1.3. Tanque <i>flash</i> .....	163
6.2.1.4. Bomba peristáltica.....	165
6.2.1.5. Sistema de vácuo.....	166
6.2.1.6. Condensador.....	166
6.2.2. Instrumentação .....	167
6.2.2.1. Instrumentos de Medição e Atuação .....	167
6.2.2.2. Acondicionamento e Conversão de Sinal.....	169
6.3. Testes e validação do sistema.....	170
6.3.1. Protótipo experimental .....	170
6.3.2. Testes etanol-água .....	172
6.4. Conclusão.....	176
Referências.....	177
CAPÍTULO 7 .....	179
7. Elaboração das Rotinas de Comunicação, Monitoramento e Controle do <i>Software</i> supervisório ..	179
RESUMO .....	181
7.1. Introdução .....	181
7.2. Material e Métodos.....	184
7.2.1. Monitoramento e Controle de Processos.....	184
7.2.1.1. Controle de Nível do Fermentador .....	185
7.2.1.2 Controle do Vácuo do Tanque <i>Flash</i> .....	186
7.2.1.3. Controle da Extração no Tanque <i>Flash</i> .....	189
7.2.2. Interfaces Homem-Máquina.....	192
7.2.2.1. Controle Geral .....	192
7.2.2.2. Comportamento.....	194
7.2.2.3. Controle do Nível do Fermentador.....	196
7.2.2.4. Controle de Vácuo e de Extração do Tanque <i>Flash</i> .....	197
7.3. Conclusão.....	198
Referências.....	199
CAPÍTULO 8.....	201
8. Produção de etanol de segunda geração utilizando tecnologia retentostato extrativo a vácuo (C5-REV) por <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	201
RESUMO .....	203
8.1. Introdução .....	205

8.2. Material e Métodos.....	208
8.2.1. Micro-organismo e meio de cultivo .....	208
8.2.2. Esterilização .....	208
8.2.3. Protótipo experimental .....	209
8.2.4. Etapas fermentativas .....	210
8.2.4.1. Cultivos em batelada simples .....	210
8.2.4.2. Cultivos em batelada alimentada.....	211
8.2.4.3. Cultivos em retentostato.....	212
8.2.4.4. Extração a vácuo .....	213
8.2.5. Avaliação do desempenho da etapa fermentativa .....	213
8.3. Resultados .....	214
8.3.1. Implementação de cultivos no modo retentostato extrativo .....	214
8.3.2. Extração a vácuo .....	216
8.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de cultivo .....	217
8.4. Conclusão.....	223
Referências.....	224
CAPÍTULO 9 .....	227
9. Considerações Finais .....	227
9.1. Conclusões Gerais.....	229
9.2. Sugestões para trabalhos futuros .....	232



“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

*(Leonardo da Vinci)*



Dedico este tese em memória dos meus pais  
Ivarna e José, e à minha irmã Tatiana,  
sem vocês eu nada seria.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. Francisco Maugeri Filho, por me aceitar e me orientar em seu grupo de pesquisa, pela confiança e por me transpor seus conhecimentos;

Ao Daniel Atala pelo auxílio e co-orientação, pelos conselhos e pela motivação para sempre seguir em frente;

Aos membros da banca por terem aceitado o convite, bem como agradecer as correções, questionamentos e correções, as quais contribuíram para enriquecer o conteúdo do trabalho;

Aos meus pais, Ivarna e José, por me darem a oportunidade de estar neste mundo, por me passarem valores de vida, por todo amor e dedicação em vida e por estarem sempre me apoiando, mesmo lá de cima;

À minha irmã, Tatiana Farias, por ser fundamental na minha vida e por segurar a onda e me apoiar em todos os obstáculos da vida;

Aos meus colegas do LEB: Cris, Susan, Rosana, Marcus Bruno, Rafael, Gislaine, por tornar todos os momentos que compartilhamos mágicos e inesquecíveis, por todo o companheirismo, risadas e apoio do início ao fim desta etapa de minha vida;

Em especial à Fifa, por todo carinho, conselhos, paciência, sempre disposta a ajudar e por seu jeitinho meigo de sempre nos tranquilizar e confortar nos momentos de desespero, nos dando a garantia de que no fim tudo dá certo.

A todos aqueles de que alguma forma me acompanharam e me apoiaram nesta trajetória, meus sinceros: Muito Obrigada!

E a FAPESP pelo apoio financeiro.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Classificação dos biocombustíveis .....	16
Figura 2.2 Representação esquemática da estrutura lignocelulósica.....	24
Figura 2.3. Reação global do rendimento teórico da conversão de xilose em etanol ( $Y_{p/s}$ ) .....	36
Figura 2.4. Caminho metabólico de D-xilose em leveduras .....	39
Figura 2.5. Microscopia eletrônica de varredura da linhagem <i>S. stipitis</i> NRRL-Y7124, aumentada 5000 vezes (escala de 2 $\mu\text{m}$ ). .....	43
Figura 2.6 $\mu/\mu_{\text{máx}}$ plotado contra $P/P_{\text{máx}}$ em função de $n$ .....	65
Figura 3.1. Data from batch fermentations: (a) Influence of initial xylose concentration ( $S_0$ ) on specific growth rate ( $\mu$ ), and (b) linearization according to Lineweaver-Burk method to obtain $K_S$ and $\mu_{\text{max}}$ parameters. ....	98
Figura 3.2. Data from continuous fermentation for xylose uptake, biomass accumulation and ethanol production for different dilution rates. Symbols: (■) substrate, (●) ethanol and (▲) cells.....	100
Figura 3.3. Calculation of parameter $n$ .....	101
Figura 3.4. Determination of the kinetic parameters $Y_{p/x}$ (a) and $m_x$ and $Y_x$ (b) for batch experiments. Data from fermentation with 50 $\text{g.L}^{-1}$ initial substrate concentration, as an example. ....	102
Figura 3.5. Dependence of parameters $Y_x$ (a) and $Y_{p/x}$ (b) on initial substrate concentration. ..	101
Figura 3.6. Experimental (symbol) and model prediction (lines) data for batch mode fermentation, at different substrate concentrations. Symbols: (■) substrate, (●) ethanol and (▲) cells. ....	106
Figura 3.7. Validation of the model. Experimental (symbols) and model prediction (lines) data for batch mode fermentation performed at 7 $\text{g.L}^{-1}$ (a) and 36.0 $\text{g.L}^{-1}$ (b) of initial xylose concentration. Symbols: (■) substrate, (●) ethanol and (▲) cells. ....	107
Figure 4.1. Main effects of the kinetic parameters on the profile of $dS$ (a), $P$ (b) and $X$ (c) using PBSA design with 95% confidence level. Symbols: ■ ( $P_{\text{max}}$ ), ● ( $K_i$ ), * ( $K_s$ ), ○ ( $m_x$ ), □ ( $n$ ), ◆ ( $\mu_{\text{max}}$ ), ▲ ( $Y_x$ ), × ( $Y_{p/x}$ ).....	127
Figure 5.1. Experimental (symbols) and predicted (solid lines) data (—) at 100 $\text{g.L}^{-1}$ (a), 150 $\text{g.L}^{-1}$ (b) and 200 $\text{g.L}^{-1}$ (c) of xylose concentration in the feed medium. Symbols: concentration of substrate, S (●); cell mass, X (■); and ethanol concentration, P (▲). ....	146

Figure 5.2. Ethanol production by <i>S. stipitis</i> : comparison between batch and fed-batch modes. (a) Cell (black bars) and ethanol (dark grey bars) concentrations and (b) cell yield ( $Y_{xs}$ , black bars), ethanol yield ( $Y_{ps}$ , dark grey bars), and ethanol productivity (light grey bars). .....	147
Figure 5.3. Dependence of both QN fitted $Y_{p/x}$ (■) and $Y_x$ (●) with xylose concentration in the feed medium ( $S_a$ ) in fed-batch cultures. The symbols denote the optimized parameters by QN, and (—) the parameters fitting by polynomial regression. The kinetic behavior is corresponding xylose consumption under fed-batch runs. ....	151
Figura 6.1. Montagem e Instrumentação do tanque <i>flash</i> . ....	165
Figura 6.2. Montagem e instrumentação do sistema de vácuo. ....	166
Figura 6.3. Sistema de condensação <i>trap</i> . ....	167
Figura 6.4. Protótipo experimental do 'retentostato extrativo a vácuo' .....	171
Figura 6.5. Perfil de concentração de etanol no reator em função do tempo de extração e do vácuo utilizado no tanque <i>flash</i> , em ciclos de extração de 30 min cada, para os valores de vácuo de 125 mmHg (●), 150 mmHg (■) e 200 mmHg (▲).....	172
Figura 6.6. Comportamento da taxa de extração de etanol no tanque <i>flash</i> e da vazão de etanol recolhida no condensador com o aumento do vácuo do sistema (125-200 mmHg). Símbolos: Vácuo em mmHg (●), Vazão de etanol condensado em mL/h (■) e Taxa de extração em g/Lh (▲). 175	175
Figura 7.1. Esquema do controle de nível do reator.....	185
Figura 7.2. Fluxograma do controle de nível do reator .....	186
Figura 7.3. Variáveis controladas e manipuladas durante o controle de vácuo do tanque <i>flash</i> ... 187	187
Figura 7.4. Fluxograma de controle, acionamento e desligamento do sistema de vácuo durante etapa de extração. Adaptado de Atala (2006).....	189
Figura 7.5. Fluxograma de controle da etapa de extração a vácuo do etanol acumulado para manter baixas concentrações deste produto no meio fermentativo. ....	191
Figura 7.6. IHM do controle geral do processo.....	193
Figura 7.7. IHM do controle do fermentador .....	194
Figura 7.8. IHM do controle da vazão das bombas peristálticas de alimentação, retirada de permeado e purga do sistema. ....	194
Figura 7.9. IHM de visualização do comportamento das variáveis monitoradas no reator. ....	195
Figura 7.10. IHM de visualização do comportamento das todas variáveis monitoradas no processo fermentativo. ....	195
Figura 7.11. IHM do controle automático do nível do fermentador .....	196

Figura 7.12. IHM do controle automático de extração e vácuo no tanque *flash*.....197

Figura 8.1. Protótipo experimental retentostato extrativo a vácuo com retenção de células. ... 210

Figura 8.2. Perfis de concentrações de célula, substrato e etanol em função do tempo de fermentação durante cultivos com *S. stipitis* operados no modo retentostato extrativo a vácuo, realizados com diferentes concentrações de substrato no meio de alimentação a)  $S_a = 100 \text{ g.L}^{-1}$ ; b)  $S_a = 150 \text{ g.L}^{-1}$ ; c)  $S_a = 200 \text{ g.L}^{-1}$ . Símbolos: X (●); S (■) and P (▲). ..... 218

Figura 8.3. Influência da velocidade específica de crescimento em relação à produtividade em etanol para *S. stipitis* em diferentes concentrações de xilose no meio de alimentação. a)  $S_a = 100 \text{ g.L}^{-1}$ ; b)  $S_a = 150 \text{ g.L}^{-1}$ ; c)  $S_a = 200 \text{ g.L}^{-1}$ . Os experimentos foram realizando utilizando a tecnologia REV .....221



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Métodos de pré-tratamentos aplicados a diferentes matérias-primas lignocelulósicas...	29
Tabela 2.2. Desempenho cinético de micro-organismos fermentadores de xilose.....	42
Tabela 2.3. Equações para simulação e modelagem matemática de processos fermentativo.....	62
Table 3.1. Data for the conversion of xylose into ethanol in batch mode at different initial substrate concentrations by <i>S. stipitis</i> .....	97
Table 3.2. Data for the conversion of xylose into ethanol by <i>S. stipitis</i> in continuous fermentation at different dilution rates.....	100
Table 3.3. Kinetic and conversion parameters before and after fitting procedure for different initial substrate concentrations, for experiments in batch mode (fixed remaining parameters: $\mu_{max}=0.232 \text{ h}^{-1}$ ; $K_S=1.67 \text{ g.L}^{-1}$ ; $K_I=24.4 \text{ g.L}^{-1}$ and $P_{max}=56 \text{ g.L}^{-1}$ ).....	104
Table 3.2. Residual standard deviations (%RSD) for X, S and P, at different initial substrate concentrations.....	105
Table 4.1. Low and high setting parameters used in PBSA.....	122
Table 4.2. Plackett & Burman design with 20 trials - PB20.....	123
Table 4.3. Effect of kinetic parameters on xylose consumption, PB design.....	126
Table 4.4. Effect of kinetic parameters on ethanol concentration, PB design.....	126
Table 4.5. Effect of kinetic parameters on biomass concentration, PB design.....	126
Table 5.1. Comparison of kinetic parameters performance between batch and fed-batch cultures.....	145
Table 5.2. Initial conditions for substrate, biomass, ethanol concentrations and model parameters to be estimated for experiments in fed-batch mode performed at different xylose concentration in the feed medium. The remaining parameters were fixed as follow: $\mu_{max} = 0.232 \text{ h}^{-1}$ ; $K_S = 1.67 \text{ g.L}^{-1}$ , $K_I = 20.0 \text{ g.L}^{-1}$ ; $P_{max} 56.0 \text{ g.L}^{-1}$ and $n = 2.5$ .....	149
Table 5.3. Residual standard deviations (%RSD) for X, S and P at different xylose concentration in the feed medium during fed-batch runs.....	152
Tabela 6.1. Tipo de sinal e quantidade de portas usadas pelos equipamentos e instrumentos de controle utilizados na montagem do protótipo experimental.....	169

Tabela 6.2. Módulos <i>Field Point</i> usados para acondicionamento e comunicação dos sinais dos equipamentos e instrumentos.....	170
Tabela 6.3. Acompanhamento dos parâmetros de extração no tanque <i>flash</i> .....	175
Tabela 7.1. Esquema de acionamento e desligamento do sistema de extração a vácuo.....	188
Tabela 8.1. Comparação dos parâmetros cinéticos para <i>S. stipitis</i> NRRL-Y7124 durante fermentações no modo batelada, batelada alimentada e retentostato extrativo a vácuo.....	219

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	acetic acid concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$K_I$	substrate inhibition coefficient ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$K_S$	substrate saturation parameter ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$m_X$	maintenance coefficient ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
n	parameter describing product inhibition
P	product concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P_f$	final ethanol concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P_{\max}$	maximal product concentration when cell growth ceases ( $\text{g.L}^{-1}$ )
S	substrate concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S_0$	initial substrate concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S_f$	final substrate concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S^*$	substrate concentration at which the measured specific growth rate is maximum ( $\text{g.L}^{-1}$ )
X	biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X_y$	xylitol concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X_{y_f}$	final xylitol concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$t_T$	fermentation total time (h)
$X_0$	initial biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X_f$	final biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
D	dilution rate ( $\text{h}^{-1}$ )
$r_P$	ethanol production rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$r_S$	substrate uptake rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$r_X$	cell growth rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$Y_{P/X}$	cell to product conversion factor ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_X$	limiting cell yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	biomass yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	ethanol yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$\mu_{\max}$	maximum specific growth rate as described by Monod's model ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_{\max}^*$  the maximum specific growth rate related to each initial substrate concentration ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_X$  specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_S$  specific substrate uptake rate ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_P$  specific ethanol production rate ( $\text{h}^{-1}$ )

# **CAPÍTULO 1**

## **1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**



## 1.1. Introdução Geral

A busca por fontes alternativas de energias renováveis, as quais contribuem com menor impacto ambiental e auxiliam na resolução dos problemas gerados pelo desenvolvimento descontrolado das grandes metrópoles, vêm ganhando cada vez mais interesse e destaque entre os grupos de pesquisa que investigam e buscam exaustivamente soluções sustentáveis e ambientalmente amigáveis. Os biocombustíveis como o etanol e o biodiesel, destacam-se como uma alternativa promissora e estudos têm comprovado uma significativa redução na emissão dos gases de efeito estufa (GEE) em decorrência da substituição dos combustíveis fósseis derivados do petróleo por estes combustíveis renováveis.

Em resposta à rápida elevação dos preços do petróleo em meados dos anos 1970, o Brasil lançou uma iniciativa global que visava à diminuição da dependência da energia importada, resultando na “oficialização” do etanol como combustível em veículos leves (Santos *et al.*, 2000; Romero, 2009, Dias *et al.*, 2013). Parte essencial da estratégia brasileira na área é a obtenção de etanol a partir da cana-de-açúcar, o qual é o mais barato do mundo, e, em consequência disso, o país tem quase metade da sua energia proveniente de fontes renováveis. O Brasil produz etanol combustível em escala industrial por mais de 40 anos, através da fermentação da sacarose da cana para produzir então o etanol de primeira geração (1G) (Romero, 2009; Costa *et al.*, 2010; Della-Bianca *et al.*, 2013). Durante a etapa de processamento da cana-de-açúcar, grandes quantidades de material lignocelulósico são geradas, como é o caso do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, os quais são atualmente utilizados como combustíveis em caldeiras para fornecer energia para o processo e/ou vender o excedente de energia gerada para a rede, enquanto que a maior parte da palha é deixada ou queimada no campo (Pippo *et al.*, 2011).

Atualmente, cientistas e empresas estão focando suas pesquisas no desenvolvimento do etanol de segunda geração (2G), produzido a partir da biomassa lignocelulósica contida no bagaço e na palha da cana-de-açúcar (Dias *et al.*, 2012). A produção de etanol 2G envolve quebrar a parede celular da biomassa lignocelulósica, composta de celulose e hemicelulose, e, potencialmente rica em substratos que poderão ser convertidos em etanol. No entanto, o problema é que estes compostos não são prontamente

fermentescíveis, e sua quebra precisa ser feita por meio de enzimas ou solventes, para liberar então as frações de glicose e xilose (Chandel *et al.*, 2011).

A grande disponibilidade de matéria-prima bem como o reduzido preço destes resíduos dão vantagem para o Brasil liderar a produção de etanol 2G, apesar de ainda faltar incentivo à pesquisa e tecnologia. A biomassa lignocelulósica, como o bagaço-de-cana, a palha de trigo, a palha de arroz, a casca de café, entre outros, são muitas vezes acumulados no ambiente, representando a perda de uma matéria-prima valiosa para obtenção de energias renováveis. Sendo assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas objetivando o aproveitamento destes resíduos. No Brasil, o bagaço da cana-de-açúcar se destaca como a fonte de biomassa lignocelulósica mais abundante dentre as atividades agroindustriais, sobressaindo-se na corrida para produção de etanol 2G (Jeffries, 2006; Geraque, 2009, Dias *et al.*, 2012).

Por outro lado, a viabilidade econômica do etanol lignocelulósico está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação, isto é, quantos dos açúcares obtidos a partir da biomassa lignocelulósica serão efetivamente transformados em etanol (Unrean e Nhung, 2013). As tecnologias de fermentação em desenvolvimento têm possibilitado com êxito a fermentação dos açúcares hexoses, que são aqueles provenientes da celulose da biomassa. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada atualmente pelas usinas brasileiras, não é capaz de fermentar a outra fração dos açúcares presentes no bagaço e na palha, que é a fração dos açúcares pentoses, que correspondem a aproximadamente 40% do total do açúcar disponível na biomassa. Por isso, tem-se considerado estratégico para o desenvolvimento do etanol celulósico a fermentação dos açúcares hexoses e pentoses em dornas separadas, utilizando a *S. cerevisiae* para fermentar as hexoses e outra espécie de levedura para fermentar as pentoses (Nakamura *et al.*, 2001; Hamacher *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Slininger *et al.*, 2014).

A levedura *Scheffersomyces stipitis*, micro-organismo empregado para os estudos desenvolvidos nesta tese, é capaz de fermentar a fração de pentoses e apresenta rendimento em etanol mais elevado quando comparada com outras leveduras. Essa linhagem foi aclimatada gradativamente ao licor de pentoses não destoxificado, permitindo a exclusão da

etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, o que reduz significativamente os custos de produção (Kurtzman e Suzuki, 2010).

É importante ressaltar que, normalmente, a fermentação com esta levedura em um sistema convencional apresenta baixo rendimento devido a sua baixa tolerância ao etanol formado. Segundo Luong (1985), o etanol que se acumula no meio fermentativo inibe a atividade metabólica do micro-organismo, reduzindo o rendimento em etanol. Estudos cinéticos que visam investigar o efeito dos processos inibitórios que ocorrem durante o consumo de pentoses e acúmulo de etanol durante a produção de etanol 2G, especialmente que considerem parâmetros de inibição para elevadas concentrações de substrato e etanol no meio, ainda não foram descritos na literatura. Dessa maneira, se torna essencial à realização de estudos cinéticos para possibilitar a obtenção de modelos matemáticos confiáveis e que sejam capazes de descrever o processo fermentativo para obtenção de etanol 2G. A obtenção de modelos matemáticos é de extrema importância quando se deseja alcançar uma eficiente produção de etanol em escala industrial a partir de biomassa lignocelulósica através da otimização, visando obter configurações ótimas e viáveis do processo, bem como o desenvolvimento de estratégias de controle (Morales-Rodrigues *et al.*, 2011, Andrade, 2012). Levando em conta as tendências e os gargalos comentados para o setor de etanol 2G um dos objetivos deste trabalho foi investigar o comportamento cinético da linhagem *S. stipitis* NRRL-7124 em meios fermentativos com elevadas concentrações de açúcar e etanol. Para atingir este objetivo desenvolveu-se um modelo matemático para descrever a cinética de fermentação alcoólica a partir da fração C5 de forma a analisar a influência dos inibidores de processo na cinética de fermentação.

Somando-se a isso, com intuito de resolver problemas inibitórios relacionados ao acúmulo de altas concentrações de etanol no meio, a incorporação do processo fermentativo extrativo a vácuo apresenta-se como uma tecnologia atrativa por permitir a extração do etanol do caldo fermentativo assim que este é produzido, evitando a inibição do micro-organismo pelo produto formado. Isto possibilita uma fermentação com alta concentração celular em mostos concentrados. Assim, a tecnologia proposta nesta tese é capaz de criar as condições necessárias para que a levedura de interesse *S. stipitis* possa atingir altas taxas de conversão da fração de pentoses e um vinho com alta concentração de etanol.

Dentro da realidade brasileira, este sistema fermentativo extrativo apresenta a maior quantidade de aspectos positivos, além disso, a remoção parcial do etanol produzido, mantendo-se níveis de até 30 g/L no meio fermentativo, reduz significativamente o poder inibitório exercido na atividade metabólica do micro-organismo, e, por outro lado, garante a ação anti-séptica do meio. A razão do emprego desta tecnologia se deve à baixa tolerância dos micro-organismos ao etanol acumulado no meio, bem como à baixa produtividade, por crescer muito lentamente. Espera-se com o protótipo proposto suprir estes inconvenientes de processo, pois esta tecnologia possibilita operar o processo com baixa concentração de etanol (devido à extração a vácuo), mesmo trabalhando com mostos muito concentrados, além de possibilitar a obtenção de altas concentrações de micro-organismo (devido ao reciclo de células), o que possibilita maiores taxas de conversão.

O uso do evaporador *flash* possibilita usar altas concentrações de açúcares no meio de alimentação do reator, o que tem como consequência maior produção de etanol, reduzindo o custo da destilação, e gerando menor produção de vinhaça. Embora esta tecnologia tenha sido desenvolvida para etanol 1G, nada impede que ela seja aplicada à produção 2G, mesmo porque com os ganhos energéticos que esse processo possibilita pode viabilizar a produção de etanol a partir de pentoses.

Em resumo, a tecnologia proposta aqui se destaca como um processo de produção com baixos custos (não é necessário etapas de destoxificação do licor de pentoses) e com alta produtividade (a extração do etanol pelo vácuo elimina o efeito inibitório do etanol, permitindo uma fermentação com alta concentração de açúcares). O vinho obtido na fermentação com essa tecnologia tem maior concentração de etanol, reduzindo dessa maneira a quantidade de vinhaça gerada, e conseqüentemente os custos na etapa de destilação.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma tecnologia alternativa, visando a produção e extração de etanol 2G simultaneamente, através de um processo fermentativo extrativo a vácuo, com reciclo total de células, utilizando como fonte de substrato a fração de açúcares pentoses (C5), especialmente xiloses, pela linhagem *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- i) Avaliar e investigar um modelo cinético para descrever o crescimento e produção de etanol por *S. stipitis*, em cultivos em batelada simples e contínuo em meio de cultura definido;
- ii) Realizar estudos da análise de sensibilidade paramétrica para determinação dos parâmetros cinéticos mais relevantes do modelo cinético;
- iii) Avaliar e investigar um modelo cinético para descrever o crescimento e produção de etanol por *S. stipitis*, em cultivos em batelada alimentada, em meio de cultura definido;
- iv) Desenvolver um sistema fermentativo extrativo à vácuo, para eliminar os fatores inibitórios ao crescimento e acúmulo de etanol, objetivando maximizar rendimentos e produtividades do processo.

## Referências Bibliográfica

Andrade, R. R. Modelagem Cinética do Processo de Produção de Etanol a partir de Hidrolisado Enzimático de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

Costa, R.C.; Sodré, J.R. Hydrous ethanol vs. gasoline–ethanol blend: engine performance and emissions, *Fuel*, 2010, 89: 287–293.

Della-Bianca, B. E.; Basso, T. O.; Stambuk, B. U.; Basso, L.C.; Gombert, A.K. What do we know about the yeast stains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013a, 97(3):979-991.

Dias, M.O.S.; Tassia, L.J.; Rossel, C.E.V.; Maciel, R.; Bonomi, A. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. *Fuel Processing Technology*, 2013, 109:84-89.

Dias, M.O.S.; Junqueira, T.L.; Jesus, C.D.F.; Rossel, C.E.V.; Maciel, R.M.; Bonomi, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energy*, 2012, 43:246-252.

Ferreira, A.D.; Mussatto, S.I.; Cadete, R.M.; Rosa, C.A.; Silva, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian Forest. *Yeast*, 2011, 28:547-554.

Geraque, E. Brasil terá centro para álcool celulose. Folha de São Paulo, jun. 2009. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ambiente/ult10007u579838.shtml>. Acesso em julho de 2014.

Jeffries, T.W. Engineering yeast for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17:320-326.

Hamacher, T.; Becker, J.; G rdonyi, M.; Hanhn-H gerdal, B.; Boles, E. Characterization of the xilose-transporting properties of yeast hexosetransporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology*, 2002, 148:2783-2788.

Kumar, M.; Gayen, K. Developments in biobutanol production: new insights. *Applied Energy*, 2011, 88:1999-2012.

Kurtzman CP, and Suzuki M: Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Bajevielli*, *Meyeroozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 2010, (51):2-14.

Luong, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(3): 280-285.

Morales-Rodríguez, R.; Meyer, A. S.; Gernaey, K. V.; Sin, G. R. Dynamic model-based evaluation of process configurations for integrated operation of hydrolysis and co-fermentation for bioethanol production from lignocellulose. *Bioresource Technology*, 2011,

102(2):1174-1184.

Nakamura, Y.; Sawada, T.; Inoue, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. Journal of Chemical Technology And Biotechnology, 2001, 76:586-592.

Pippo, A.W.; Luengo, C.A.; Alonsoamador Morales Alberteris, L.; Garzone, P.; Cornacchia, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: current situation and environmental aspects, Waste and Biomass Valorization, 2011, 2:1–16.

Santos, A.D.S.; Valle, M.L.M.; Giannini, R.G. A experiência brasileira no desenvolvimento de um combustível binário álcool-diesel. Economia e Energia, 2000.

Unrean P, Nguyen NHA: Optimized Fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. Appl Biochem Biotechnol. 2013, (169):1895-1909.

Romero, T. Etanol Global: O Brasil será referência em estudo para o uso mundial do etanol. Inovação Tecnológica. São Paulo, jul. 2009. Disponível em: <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias.php?artigo=etanol-global-brasil-referencia-estudo-uso-mundial-etanol>. Acesso em julho de 2014.

Slininger, P. J.; Dien, B. S.; Lomont, J. M.; Ladisch, M. R.; Okos, M. R. Evaluation of a Kinetic Model for Computer Simulation of Growth and Fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Fed D-xylose, Biotech. and Bioeng., 2014, DOI 10.1002/bit.25215.



## **CAPÍTULO 2**

### **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2.1. Produção de Etanol no Brasil

O bioetanol e o biodiesel são hoje os principais biocombustíveis utilizados em todo o mundo (Della-Bianca, 2013a). O Brasil se destaca como maior exportador e segundo maior produtor, e, juntamente com os Estados Unidos (maior produtor) são responsáveis por 80% da produção mundial de etanol (RFA, 2013). A indústria de açúcar e etanol no Brasil representam 2.3% do PIB, empregando 4.5 milhões de pessoas (entre trabalhos diretos e indiretos). Além disso, o etanol combustível representa quase 50% do volume total de combustível consumido pelos veículos leves e tem um volume de negócios de mais de 80 bilhões de dólares anualmente (Basso, 2011).

Como qualquer nova tecnologia, o etanol precisou de investimentos econômicos e políticos para manter-se viável no mercado nacional e também, para lutar contra seu maior competidor: o petróleo. O Brasil iniciou a produção de etanol combustível em 1927, no entanto devido aos altos custos de produção comparados à produção de combustíveis fósseis derivados do petróleo (como é o caso da gasolina), a produção deste combustível foi mundialmente ignorada até a crise de petróleo na década de 70. A crise do petróleo triplicou os custos das importações deste combustível para o Brasil em 1973, devido ao embargo do petróleo árabe (Goldemberg, 2008; Mussato *et al.*, 2010; Basso, 2011). Somando-se a isso, os preços mundiais do açúcar, que havia aumentando ascendentemente desde meados da década de 60, diminuíram drasticamente em 1974. Essas mudanças drásticas no mercado global de combustíveis encorajou o governo brasileiro a criar o Programa Nacional do Álcool (PróAlcool) em 1975, com o redirecionamento de parte da produção de cana de açúcar para gerar etanol como substituto para a gasolina, reduzindo assim as importações de petróleo, uma vez que nesta época de crise 80% do petróleo utilizado no Brasil era importado (Goldemberg, 2008; Cerqueira-Leite *et al.*, 2009). Inicialmente, a prioridade foi produzir etanol anidro para ser misturado com gasolina, numa proporção de 20% de etanol e 80% de gasolina (Amorim e Leão, 2005; Amorim *et al.*, 2011; Basso, 2011). Depois da crise do petróleo em 1980, o sucesso da produção de bioetanol estimulou a iniciativa de produzir veículos movidos a etanol hidratado. Em 1980, o preço do petróleo decresceu novamente. Em paralelo a um péssimo período econômico para a economia brasileira (ilustrada pela alta inflação) o governo brasileiro forçou-se a

remover alguns subsídios dados às destilarias encorajando várias delas a destinar a cana novamente para produção de açúcar (Basso, 2011; Amorim *et al.*, 2011).

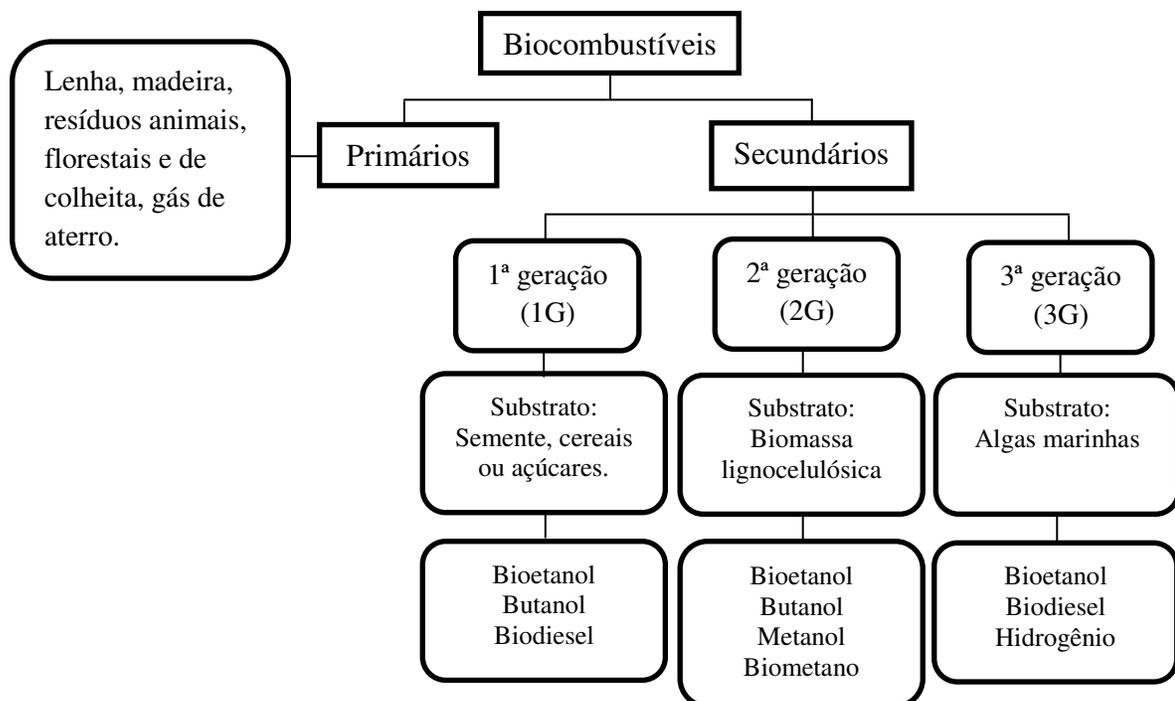
Na década de 1990 a economia do país se estabilizou novamente. Em 2008 o consumo de etanol superou o consumo de gasolina no Brasil (Chaddad, 2010). Isso decorreu em virtude de que na primeira década de 2000, mais de 95% dos carros vendidos no Brasil foram “bi-combustíveis” (carros que podem usar qualquer mistura de álcool e gasolina) (BNDES, CGEE, 2008; Basso, 2001). Hoje em dia a gasolina vendida no Brasil contém 25% de etanol anidro.

Para superar as oscilações no preço do etanol no mercado e reduzir seu custo de produção, o setor industrial precisa estar constantemente aprimorando seus processos fermentativos. Novas tecnologias foram desenvolvidas e transferidas para as destilarias o que possibilitou a sobrevivência deste setor industrial ao longo das diversas crises nos últimos 30 anos, assegurando ao Brasil experiência à frente de outros países na produção de etanol de primeira geração (1G) além de uma posição privilegiada no setor de biocombustíveis (Amorim, 2006; Della-Bianca *et al.*, 2013b). Hoje em dia, o etanol 1G produzido no país a partir da cana substitui em torno de 1% da gasolina usada no mundo, no entanto, o potencial para esta tecnologia ainda está longe de ser exaurido. A incorporação de tecnologias nas destilarias brasileiras que visem suprir os atuais gargalos encontrados para produção de etanol de segunda geração (2G) em escala industrial pode aumentar a substituição da demanda mundial da gasolina, e, além disso, reduzir a emissão dos gases causadores do efeito estufa, aumentar o balanço energético, aumentar o rendimento em etanol por hectare de cana plantada, bem como reduzir o custo de produção pelo aproveitamento de resíduos agrícolas (Della-Bianca *et al.*, 2013a).

## 2.2. Biocombustíveis de Primeira, Segunda e Terceira Geração

O contínuo crescimento da população mundial e o desenvolvimento ascendente de países como a China e Índia gerou conseqüentemente um rápido aumento da demanda global por energia (Harun *et al.*, 2010). Somando-se a isso, o crescente desenvolvimento do setor industrial, bem como o aumento do número de veículos exigiram um aumento da demanda por combustíveis derivados do petróleo, sendo que a demanda por estes combustíveis representam em torno de 80 % da energia consumida mundialmente (Nigam e Singh, 2011). No entanto, esta elevada demanda pelo emprego de combustíveis fósseis acelera o processo de esgotamento das reservas de petróleo, além de promover a oscilação exagerada dos preços dos barris de petróleo, gerando ainda um aumento demasiado na emissão de gases causadores do efeito estufa e conseqüências ambientais gravíssimas como é o caso das mudanças climáticas atribuídas às emissões de dióxido de carbono CO<sub>2</sub> (Mussatto *et al.*, 2010; Doherty *et al.*, 2011; Tsigie *et al.*, 2011). O uso de biocombustíveis renováveis (fonte de energia limpa e sustentável) possibilita reduzir ou até mesmo eliminar as desvantagens geradas pelo uso de combustíveis fósseis, aumentando concomitantemente o investimento de projetos e a renda agrícola de países em desenvolvimento (Hamelinck *et al.*, 2005).

Biocombustíveis podem ser classificados como líquidos ou gasosos os quais são produzidos a partir de biomassa vegetal, como é o caso de combustíveis como o etanol, metanol, biodiesel e metano. A produção destes combustíveis surgiu como uma estratégia sustentável promissora para substituição dos derivados do petróleo. Destacam-se por serem facilmente obtidos a partir de biomassa vegetal encontrada em abundância na natureza, apresentam baixo custo final de produção, além de serem biodegradáveis (Balat e Balat, 2009). A produção de biocombustível pode ser classificada como primária ou secundária de acordo com o fluxograma de Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Classificação dos biocombustíveis  
Adaptado de Nigam e Singh (2011).

Os biocombustíveis primários são usados *in natura*, não necessitando de uma etapa de processamento para preparar a matéria-prima, como é o caso da utilização da lenha para obtenção de energia. Por outro lado, os biocombustíveis secundários necessitam de uma etapa de processamento e/ou pré-tratamento da matéria prima para possibilitar a produção de combustíveis, como por exemplo, o etanol. Podem ainda serem subdivididos em biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração, de acordo com o substrato e processo de produção empregado (Nigam e Singh, 2011).

Na chamada primeira geração (1G) os biocombustíveis são produzidos a partir de substratos provenientes de alimentos e culturas oleaginosas (beterraba, cana-de-açúcar, milho, óleos vegetais e animais) através da aplicação de tecnologias convencionais de produção. A tecnologia de produção 1G já atingiu níveis econômicos de produção viáveis, com produção e comercialização em larga escala, como é o caso do etanol combustível (Brennan e Owende, 2010).

Já a chamada segunda geração (2G) necessita de tecnologia de pré-tratamento para converter a biomassa lignocelulósica em açúcares mais prontamente fermentescíveis

(Timilsina e Shrestha, 2011). O desafio brasileiro é o reaproveitamento do bagaço da cana, obtido após a operação de moagem da cana-de-açúcar, fonte de uma ampla variedade de substratos que podem ser transformados em etanol 2G. Porém, enquanto que as tecnologias para produção de etanol 1G já estão bem difundidas, e o combustível produzido já é comercializado mundialmente, as tecnologias para produção de etanol 2G ainda precisam atingir maturidade industrial para tornar o processo economicamente viável (Ravindranath *et al.* 2011).

Além disso, a tecnologia para produção de biocombustíveis de terceira geração (3G) surgiu em virtude do desenvolvimento de estudos recentes para promover a utilização de micro-organismos, como é o caso das microalgas marinhas, com biomassa para gerar combustíveis (Nigam e Singh, 2011). Xiong *et al.* (2008) investigaram a produção de biodiesel a partir de algumas espécies de microalgas como fonte substrato em virtude da capacidade das mesmas de acumular quantidades consideráveis de ácidos graxos em sua biomassa. No entanto, hoje em dia as tecnologias para produção de biocombustível 3G ainda não são economicamente viáveis em virtude da grande quantidade de energia necessária nos processos de produção comparada à produção de biocombustíveis 1G e 2G (Lam e Lee, 2012).

Atualmente inúmeros estudos vêm sendo extensivamente explorados visando investigar o desenvolvimento de novas tecnologias para promover a produção de biocombustíveis em larga escala de maneira eficiente e economicamente viável (Dias *et al.*, 2012). O etanol 2G, dentre os diversos biocombustíveis mencionados, têm sido foco de estudos de diferentes grupos de pesquisa, recebendo destaque no cenário brasileiro em virtude da grande disponibilidade de matéria prima utilizada para sua produção, bem como pelo histórico de pioneirismo do etanol 1G desde o início do século XX (Guerra e Cortez, 1992). Este cenário nos encorajou a desenvolver um sistema de produção eficiente, focado na produção de etanol 2G, exclusivamente durante o consumo de pentoses, possibilitando suprir os atuais desafios que barram os avanços tecnológicos na produção deste combustível.

### 2.2.1. Bioetanol de primeira geração (1G)

Bioetanol (álcool etílico –  $C_2H_5OH$ ) é uma substância incolor, volátil, facilmente inflamável e totalmente solúvel em água (Silva, 2009). O uso do bioetanol como combustível no panorama mundial está focado na geração de energia, tanto através de sua mistura com a gasolina, etanol anidro, ou simplesmente como etanol hidratado exercendo um papel considerável na matriz energética (Hamelinck *et al.* 2005; Lin e Tanaka, 2006; Cortez, 2010). Somando-se a isso, o etanol apresenta algumas vantagens importantes em relação aos combustíveis convencionais derivados do petróleo. Uma das principais vantagens é seu elevado teor de oxigênio (em torno de 35% em massa do etanol), característica que possibilita uma combustão mais limpa, contribuindo conseqüentemente para a redução das emissões de substâncias poluidoras (Goldemberg *et al.*, 2008). Possui um elevado índice de octano (108), que pode ser utilizado em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto), permitindo limites mais amplos de inflamabilidade, maiores velocidades de chama e maior calor de vaporização, proporcionando teoricamente uma maior taxa de compressão e menor tempo de combustão que a gasolina. Em geral, o bioetanol pode ser aplicado de duas maneiras: i) em mistura com a gasolina, o que é o caso do etanol anidro ou ii) como etanol puro, geralmente hidratado (Goldemberg *et al.*, 2008; Balat e Balta, 2009).

Segundo a legislação brasileira, considerando teores em massa, o etanol anidro deve conter menos de 0,6% de água, enquanto para o etanol hidratado, esse teor deve estar entre 6,2 e 7,4%. O etanol hidratado puro deve ser usado em motores fabricados ou adaptados especificamente para esse fim, em particular com a adoção de taxas de compressão mais elevadas, visando utilizar adequadamente a octanagem mais alta do etanol frente à gasolina e obter ganhos de eficiência em torno de 10%. Após décadas de aperfeiçoamento de motores especialmente fabricados para etanol, a tecnologia automotiva está suficientemente desenvolvida para permitir que veículos que operem com etanol puro hidratado tenham desempenho, dirigibilidade, condições de partida a frio e durabilidade absolutamente similares aos motores a gasolina, especialmente em países com invernos moderados (BNDES, 2008).

A produção de etanol combustível é normalmente realizada em três etapas: obtenção dos açúcares fermentescíveis; fermentação dos açúcares por micro-organismos selecionados e separação e purificação do etanol, promovida através de destilação, retificação e desidratação (Mussato *et al.*, 2010). No Brasil a produção de bioetanol é realizada através da utilização dos açúcares presentes na cana-de-açúcar. Com a crescente produção de etanol 1G no país, a área de cultivo desta cultura deverá ser expandida para atender à crescente demanda nacional e internacional. Entretanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm-se desenvolvido processos biotecnológicos alternativos para produção de etanol 2G que permitam a utilização da biomassa lignocelulósica, abundantemente gerada nos setores agrícolas e florestais. Perspectivas norte-americanas mais otimistas afirmam que em 2022 serão produzidos aproximadamente 60 bilhões de litros de biocombustíveis celulósicos ou etanol 2G (Verenium, 2008). Dessa maneira, a produção de etanol 2G tende a apresentar no futuro maior crescimento quando comparada com o etanol 1G. Frente a isso, o principal foco do estudo apresentado nesta tese foi gerar o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para suprir os inconvenientes e os gargalos ainda existentes na cadeia de produção de etanol 2G.

### **2.2.1. Bioetanol de segunda geração (2G)**

Tanto para a produção de etanol 1G, a partir de cana-de-açúcar, quanto de etanol 2G, a partir de biomassa lignocelulósica, a via fermentativa é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil. Um dos fatores que torna a produção de bioetanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país (Pereira Jr. *et al.*, 2008). A produção de etanol 2G através da utilização da biomassa lignocelulósica permite aumentar a produtividade de etanol por hectare de cana-de-açúcar plantada (Cerqueira Leite *et al.*, 2009), atendendo assim ao grande interesse brasileiro de aumentar a produtividade em etanol sem aumentar a área de cultivo, não competindo com a produção de alimentos pelo uso da terra (Pacheco, 2011; Marques, 2011).

Atualmente, as tecnologias para produção de etanol 2G ainda encontram gargalos importantes que estão em fase de desenvolvimento na busca pela viabilidade e competitividade comercial (Nigam e Singh, 2011). Diversas empresas do setor privado, como a Novozymes, a Oxiteno e a Petrobrás vêm investindo largamente na busca pela produção destes biocombustíveis (Marques, 2011; Sims *et al.*, 2010).

Devido à necessidade de uma etapa para ruptura da estrutura da matriz do material fibroso e liberação dos açúcares fermentescíveis, o processo de obtenção de etanol 2G se dá pela realização de um pré-tratamento para tornar os açúcares da celulose e hemicelulose mais acessíveis, como por exemplo, hidrólise ácida ou enzimática, visando à quebra dos polissacarídeos em açúcares mais simples, a fermentação destes açúcares e por fim a separação e a purificação do etanol produzido (Mussato *et al.*, 2010).

A viabilidade econômica do etanol celulósico está diretamente relacionada com a eficiência da fermentação, isto é, quanto dos açúcares obtidos a partir do bagaço da cana é efetivamente transformado em etanol. As tecnologias de fermentação em desenvolvimento hoje em dia têm possibilitado com êxito a fermentação dos açúcares hexoses, fração C6, que são aqueles provenientes da fração celulósica da biomassa. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada atualmente pelas usinas, não é capaz de fermentar a outra fração dos açúcares presentes no bagaço e na palha, que é a fração dos açúcares pentoses, denominada fração C5, que correspondem à aproximadamente 25%-40% do total do açúcar disponível na biomassa. Por isso, tem-se considerado como melhor estratégia para o desenvolvimento do etanol celulósico a fermentação de ambos os açúcares hexoses e pentoses, porém em dornas separadas, utilizando a *S. cerevisiae* para fermentar a fração C6 e outra espécie de levedura para fermentar a fração C5. A levedura *Scheffersomyces stipitis*, que será empregada neste estudo, é capaz de fermentar a fração C5 e apresenta rendimento em etanol mais elevado quando comparada com outras leveduras.

É importante ressaltar que, normalmente, a fermentação com esta levedura em uma dorna convencional apresenta baixo rendimento devido a sua baixa tolerância ao etanol formado. Para resolver este problema, a incorporação do processo fermentativo extrativo a vácuo apresenta-se como uma tecnologia atrativa por permitir a extração do etanol do caldo

fermentativo assim que este é produzido, evitando assim a inibição do micro-organismo pelo produto formado. Isto possibilita operar uma fermentação com alta concentração celular em mostos concentrados. Assim, a tecnologia de fermentação proposta neste estudo é capaz de criar as condições necessárias para que a linhagem de levedura empregada, no caso *S. stipitis* possa atingir altas taxas de conversão das pentoses e um vinho com alta concentração de etanol.

### **2.3. Matéria-prima para produção de etanol**

Tecnicamente, etanol pode ser produzido a partir de uma ampla variedade de matérias-primas renováveis, as quais são classificadas em três categorias principais: (1) aquelas que contêm quantidades consideráveis de açúcares prontamente fermentescíveis (cana-de-açúcar, beterraba, sorgo doce); (2) matéria-prima amilácea (milho, batata, arroz, trigo, etc) e (3) matéria-prima lignocelulósica (bagaço e palha de cana-de-açúcar, madeira, sabugo de milho, etc). A grande diferença entre estas matérias-primas está na etapa de obtenção dos açúcares fermentescíveis. Cana-de-açúcar, beterraba e sorgo doce oferecem açúcares simples como o caso da sacarose, glicose e frutose, os quais podem ser facilmente fermentados por leveduras (Amorim *et al.*, 2009; John *et al.*, 2011). Enquanto que os processos de produção de etanol provenientes do amido ou de matéria-prima lignocelulósica necessitam de uma etapa prévia de hidrólise dos polissacarídeos, o que leva conseqüentemente ao aumento do custo de produção de etanol (Dien e Bothast, 2009). Enquanto biomassas açucaradas necessitam apenas de uma etapa de moagem para a extração dos açúcares, a produção de etanol a partir de amiláceos necessita de uma etapa de hidrólise das cadeias de carboidratos para obtenção de um xarope de açúcares fermentescíveis (Caradona e Sánchez, 2007; Mussatto *et al.*, 2010). Já a utilização da biomassa lignocelulósica necessita de uma etapa de pré-tratamento para liberar estes açúcares, apresentando ainda muitos gargalos para que sua produção atinja maturidade tecnológica e possível competitividade econômica. Entretanto, apesar dos desafios ainda encontrados, a produção de bioetanol a partir desta matéria prima é uma alternativa sustentável promissora, uma vez que a biomassa lignocelulósica possui grande disponibilidade e baixo custo (Caradona e Sánchez, 2007; Nigam e Singh, 2011).

No Brasil a produção de etanol combustível foi acoplada à indústria de açúcar. A cana-de-açúcar é prensada (algumas plantas usam difusão, outras rolos perfurados), resultando no caldo de cana e em um resíduo sólido fibroso, o bagaço de cana. Depois da clarificação, o caldo de cana é concentrado por evaporação até a cristalização da sacarose. Os cristais de sacarose são então coletados por centrifugação, gerando uma fase viscosa saturada em sacarose, conhecida como melaço de cana (com 40 a 60 % de sacarose e 5 a 20 % de glicose mais frutose). No princípio a produção de etanol combustível surgiu como uma alternativa para processar o melaço de cana resultante da produção de açúcar, mas devido ao aumento da importância do etanol no país na década de 80, muitas usinas se tornaram autônomas para produzir apenas etanol. Atualmente, as usinas brasileiras utilizam uma mistura de caldo e melaço de cana, o que é considerado nutricionalmente mais interessante, uma vez que o caldo de cana apresenta deficiências nutricionais, enquanto que o melaço apresenta compostos inibitórios ao metabolismo celular durante a etapa fermentativa (Basso *et al.*, 2010; Basso e Rosa, 2010).

As tendências atuais sinalizam a substituição de matérias-primas que possuam potencial alimentício, como o milho e a cana-de-açúcar por outras fontes, como por exemplo, os resíduos agrícolas, entre eles o bagaço de cana (Ahmann e Dorgand, 2007; Cortez *et al.*, 2008a). O bagaço apresenta um papel importante no balanço energético do etanol de cana. Esta matéria-prima corresponde de 20 a 30 % da cana-de-açúcar em base úmida, o que mostra o grande potencial de aumento de produção de etanol utilizando este resíduo, sem a necessidade de incrementos na área de plantio (Cortez *et al.*, 2008b; Basso *et al.*, 2010). Atualmente, metade do bagaço produzido é utilizado para geração de vapor para as etapas de moagem, aquecimento e destilação e, mais recentemente, para a co-geração de energia elétrica, fazendo com que a usina de etanol brasileira não seja só auto-suficiente, como também exportadora de energia (Basso *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2012). Apesar de sua grande disponibilidade, a utilização de bagaço para produção de etanol combustível ainda enfrenta barreiras tecnológicas e econômicas que devem ser rompidas para estimular novas pesquisas na área, dentre elas o desenvolvimento de novos processos tanto na área de hidrólise desta matéria-prima como na área de produção do combustível (Braunbeck e Cortez, 2005).

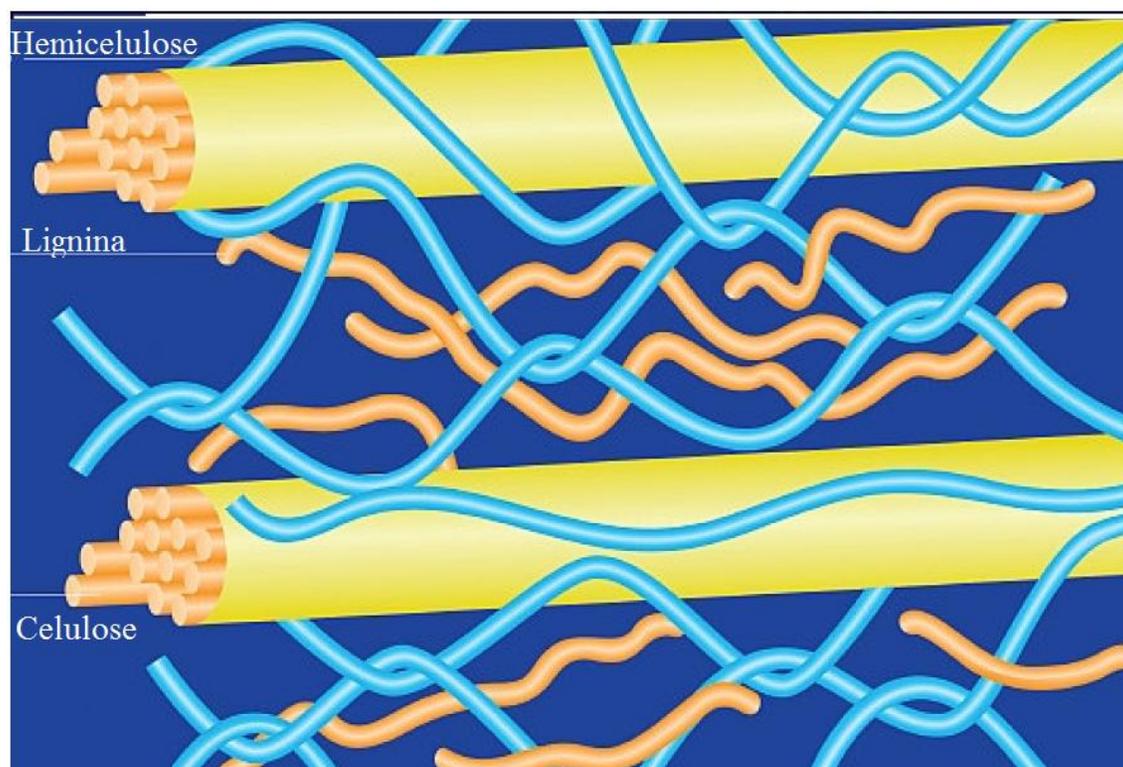
Somando-se a isso, a palha de cana gerada durante a colheita representa 30 % da quantidade de energia contida na cana e, por isso, também pode ser aproveitada para produção de etanol combustível. Atualmente, a palha não é aproveitada para fins industriais ou energéticos, sendo que seu destino é a queima no próprio campo, o que resulta em perdas energéticas no setor, além de causar sérios impactos ambientais (Braunbeck e Cortez, 2005; Novacana, 2013). Dentre os impactos ambientais causados pelas queimadas destacam-se os danos ao solo com aumento do risco de erosão, emissão de gases nocivos aos seres humanos (CO, CH<sub>4</sub>), compostos orgânicos, materiais particulados e aumento da concentração de ozônio na troposfera (Goldemberg *et al.*, 2008). Estudos atuais indicam que 50 % da palha gerada poderá ser retirada do campo, com ganhos para área agrícola e meio ambiente. Utilizando a tecnologia brasileira existente nos principais fornecedores do setor, é possível gerar 76.5 MW de energia com o aproveitamento de 50 % da palha em uma usina de médio porte, moendo 10.000 t.dia<sup>-1</sup> de cana ou 2x10<sup>6</sup> t.safra<sup>-1</sup> (Novacana, 2013). Por fim, a utilização da palha e do bagaço da cana como fonte de energia excedente poderá resultar em ganhos adicionais, tanto para co-geração de energia quanto no aumento do volume de etanol produzido, contribuindo para o desenvolvimento e sustentabilidade deste setor agrícola.

#### **2.4. Biomassa Lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica é a principal fonte de energia renovável disponível hoje em dia no meio ambiente. Esta biomassa é composta por microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Essa matriz é composta por dois tipos de polissacarídeos, chamados hemiceluloses e pectina, e uma pequena quantidade de proteínas estruturais e lignina (Taiz e Zeiger, 2004). As proporções destes compostos variam de acordo com a espécie vegetal, idade, tempo de colheita e outros fatores biológicos como diferenças genéticas dentro da mesma espécie, tecidos especiais e condições de crescimento (Goldstein, 1981; Fengel e Wegener, 1989; Wyman, 1999; Jeffries e Jin, 2000).

Celulose e hemicelulose representam em torno de 70% da constituição da biomassa total e são compostos formados por polímeros de monômeros de açúcares com potencial

fermentescível em processos biotecnológicos (Limayem e Ricke, 2012). Dessa forma, o potencial da biomassa lignocelulósica como matéria prima sustentável está diretamente relacionado com sua constituição, a qual pode ser observada no esquema da Figura 2.2.



**Figura 2.2** Representação esquemática da estrutura lignocelulósica  
Fonte: Chandel *et al.* (2011)

A parte do vegetal que compõe a parede celular é a chamada estrutura lignocelulósica, a qual é constituída por uma estrutura dura e fibrosa composta basicamente por carboidratos (celulose e hemicelulose) os quais estão ligados a uma estrutura contendo substâncias aromáticas, denominadas lignina. A celulose é o composto mais abundante da parede celular dos vegetais (40 a 50% da massa seca total), desempenhando uma função estrutural nas células. Estruturalmente a celulose é um homopolímero linear de alta massa molar e alta cristalinidade, formado exclusivamente por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4) (Goldstein, 1981; Rowell *et al.*, 2005). Estudos de dispersão de luz determinaram o peso molecular da celulose, indicando que a celulose possui um grau de polimerização médio de 9000 – 10000 unidades glicosídicas, podendo em alguns casos

atingir números muito maiores que este. As moléculas de celulose são orientadas ao acaso e têm a tendência de formar ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). As pontes de hidrogênio estabilizam a estrutura da celulose através da união de seus filamentos, formando assim microfibrilas cristalinas (Fengel e Wegener, 1983; Rowell *et al.*, 2005; Arantes e Saddler, 2010).

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez, enquanto que as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, com cadeias de glicose ordenadas paralelamente, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas regiões amorfas. A fração cristalina confere às fibras maior resistência à tração, ao alongamento e a solvatação (capacidade de absorver solvente), enquanto que a região amorfa confere às fibras maior flexibilidade (Vázquez *et al.*, 2007). Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma estrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por ligações amorfas, fator este que dificulta a hidrólise deste biopolímero (Taiz e Zeiger, 2004).

A fração hemicelulósica (15-45% do material lignocelulósico seco) é considerada o segundo biopolímero mais abundante, estando presente em todas as camadas da parede celular dos vegetais, apresentando função de reserva e sustentação (Bisaria e Ghose, 1981; Fengel e Wegener, 1989; Kootstra *et al.*, 2009). A hemicelulose apresenta baixa massa molecular, é bastante hidrofílica e contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, possuindo natureza altamente amorfa (Rowell, 2005). É constituída principalmente por duas pentoses (D-xilose e L-arabinose), por três hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose), além de ácido D-glucurônico e grupos acetilas, provenientes da lignina (Fengel e Wegener, 1989). Na estrutura da hemicelulose podem ser identificados três grupos de polímeros bem definidos: as xilanas, as mananas e as galactanas. As xilanas são compostas por moléculas de D-xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 formando uma fração linear, e, por ramificações de L-arabinose, ácidos glucurônico e arabinoglucurônico (Kuhad e Singa,

1993). A variedade de ligações e de ramificações, bem como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (Kootstra *et al.*, 2009).

As hemiceluloses fazem ligações de hidrogênio com as microfibrilas de celulose envolvendo-as em uma rede. No entanto, diferentemente das celuloses, apresentam baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo então mais suscetível à hidrólise química e enzimática em condições mais brandas. Por outro lado, um grande obstáculo técnico ainda permanece na fermentação dos açúcares de cinco carbonos (C5), uma vez que as tecnologias em estudo hoje em dia para o consumo destas pentoses ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (C6) (Sun e Cheng, 2005; Slininger *et al.*, 2014).

Uma vez que a xilose corresponde ao segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica (em torno de 40% de sua composição) sendo, portanto, um dos principais açúcares obtidos após os processos de hidrólise da porção hemicelulósica (Jeffries *et al.*, 1983; Slininger *et al.*, 2014), o total entendimento destas características é de fundamental importância para a definição de estratégias de aproveitamento destas biomassas como matérias primas, bem como o desenvolvimento de processos fermentativos eficientes para produção de etanol 2G e de outras substâncias químicas.

Já a estrutura bioquímica da lignina (10-30%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida por isso, para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel essencial para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose (Lemos, 2001). É uma macromolécula aromática amorfa tridimensional de estrutura rígida (mais resistente que a celulose) e formada a partir da polimerização radicalar de unidades de fenilpropanóides (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) depositados durante a maturação da parede celular. Estas unidades fazem ligações cruzadas com os polissacarídeos da parede celular auxiliando no seu empacotamento (Fengel e Wegener, 1989; Buchanan *et al.*, 2004). É um material de baixa densidade e abrasividade. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações

covalentes com a hemicelulose, conferindo rigidez e baixa reatividade às fibras vegetais (Goldstein, 1981).

## 2.5. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O reaproveitamento da biomassa lignocelulósica proveniente de resíduos agroindustriais é algo que ganhou grande destaque na produção de biocombustíveis. Porém, os três principais compostos desta matriz (celulose, hemicelulose e lignina) estão dispostos em uma estrutura rígida e cristalina, a qual é composta por uma matriz de redes de ligações cruzadas entre polissacarídeos, proteínas glicosiladas e lignina, dificultando a disponibilidade dos carboidratos para os processos fermentativos (Sun e Cheng, 2002; Zhao *et al.*, 2012). Estas características relacionadas à natureza recalcitrante destes materiais constitui hoje em dia a maior barreira para a viabilização de processos biotecnológicos (Champagne, 2008; Aguiar e Ferraz, 2011).

A conversão da maioria dos açúcares da biomassa lignocelulósica a etanol 2G requer uma etapa de pré-tratamento antes da etapa de hidrólise ser promovida, pois a biomassa existente na natureza é altamente resistente à degradação (Wyman, 1996; Sun e Cheng, 2005). Esta resistência à hidrólise ocorre devido à alta cristalinidade da fração celulósica, bem como pela presença de lignina e hemicelulose na estrutura, as quais são responsáveis pela proteção da celulose, acetilação da hemicelulose e grande área superficial não acessível à hidrólise (Wyman, 1996). Dessa forma, a função do pré-tratamento é romper a estrutura da matéria-prima lignocelulósica de forma a torná-la mais permeável à ação dos agentes de hidrólise. Esta etapa permite então o aumento da porosidade dos materiais através da remoção da hemicelulose e lignina da biomassa e pela redução de cristalinidade da celulose, facilitando assim o processo de hidrólise. Além disso, o pré-tratamento deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de compostos inibitórios ao metabolismo dos micro-organismos, visando sempre à obtenção de altos rendimentos de açúcares que posteriormente serão convertidos em bioprodutos de interesse (Sun e Chang, 2005; Santos *et al.*, 2011).

A escolha do pré-tratamento é uma tarefa bastante complexa e o método empregado irá depender do tipo de material utilizado. Cada método irá resultar em diferentes rendimentos e efeitos distintos nas frações lignocelulósicas, com conseqüente impacto nas frações subsequentes, sendo o objetivo principal minimizar a degradação dos substratos de interesse e maximizar o rendimento em açúcar (Hamelinck *et al.*, 2005; Sun e Chang, 2005; Alvira *et al.*, 2010). A escolha do método de pré-tratamento adequado é de extrema importância uma vez que esta etapa é responsável pelo acréscimo de aproximadamente R\$ 0,30 por galão no preço final do etanol combustível (Mosier *et al.*, 2005). Dessa maneira, a relação custo-benefício desta etapa consiste de uma grande barreira ainda existente para produção de etanol 2G. Somando-se a isso, as condições operacionais otimizadas, bem como o método de pré-tratamento escolhido, são particulares para cada processo de hidrólise, matéria-prima utilizada e processo fermentativo subsequente, não existindo então uma metodologia universal (Alvira *et al.* 2010).

A modificação na estrutura de matérias-primas lignocelulósicas pode ser realizada de forma física, química, físico-química e biológica (Santos *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2012). Os métodos mais aplicados envolvem o emprego de ácidos, vapor, solvente orgânico e agente alcalino (Girio *et al.* 2010). Diferentes métodos de pré-tratamento submetidos a diferentes materiais lignocelulósicos estão listados na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Métodos de pré-tratamentos aplicados a diferentes matérias-primas lignocelulósicas

Método de pré-tratamento	Aplicação
<b>Físicos</b>	
<b>Moagem</b>	Bagago de cana-de-açúcar (Buaban <i>et al.</i> , 2010); Palha de cana-de-açúcar (Silva <i>et al.</i> , 2010)
<b>Pirólise</b>	Casca de pistache (Açikalin <i>et al.</i> , 2012); Madeira (Amutio <i>et al.</i> , 2012); Palha de milho (Capunitan e Capareda, 2012).
<b>Físico-químicos</b>	
<b>Explosão a vapor</b>	Bagago de cana-de-açúcar (Rocha <i>et al.</i> , 2012); Palha de milho (Men <i>et al.</i> , 2012); Talo de girassol (Ruiz <i>et al.</i> , 2008)
<b>Explosão por fibra de amônia (AFEX)</b>	Bagago de cana-de-açúcar (Krishnan <i>et al.</i> , 2010); Palha de cana-de-açúcar (Krishnan <i>et al.</i> , 2010); Palha de milho (Lau e Dale, 2009)
<b>Explosão por CO<sub>2</sub> supercrítico</b>	Bagago de cana-de-açúcar (Zheng <i>et al.</i> , 1998)
<b>Químicos</b>	
<b>Hidrólise ácida</b>	Palha de trigo (Kabel <i>et al.</i> , 2007) Bagago de cana-de-açúcar (Rodrigues <i>et al.</i> , 2010) Palha de arroz (Karimi <i>et al.</i> , 2006)
<b>Hidrólise com ácidos diluídos</b>	Bagago de cana-de-açúcar (Rocha <i>et al.</i> , 2012) Palha de trigo (Saha e Cotta, 2006; Mcinntosh e Vancov, 2011);
<b>Hidrólise alcalina</b>	Palha de arroz (Saha e Cotta, 2006); Palha de milho (Banerjee <i>et al.</i> , 2011); Bagago de cana-de-açúcar (Rabelo, 2011)
<b>Ozonólise</b>	Palha de trigo (García-Cunero <i>et al.</i> , 2009); Palha de centeio (García-Cubero <i>et al.</i> , 2009)
<b>Biológicos</b>	
<b>Enzimático</b>	Bagago de cana-de-açúcar (Martin <i>et al.</i> , 2007) Madeira (Wang <i>et al.</i> , 2012); Palha de milho (Sun <i>et al.</i> , 2011); Palha de arroz (Saritha <i>et al.</i> 2012).

### 2.5.1. Pré-tratamento físico

Dentre os pré-tratamentos físicos destacam-se os processos de moagem e pirólise. Os pré-tratamentos mecânicos, como é o caso da moagem, se caracterizam pela diminuição do tamanho das partículas da matéria-prima por fragmentação ou esfarelamento, para obtenção de maior área superficial disponível para hidrólise. Enquanto que na pirólise, classificada como pré-tratamento térmico, o material é submetido a altas temperaturas, o que pode levar a formação de compostos indesejáveis resultantes da degradação da hemicelulose e lignina (Sun e Cheng, 2002). Somando-se a isso, esses compostos são extremamente desinteressantes para a etapa de fermentação devido à toxicidade que

apresentam ao metabolismo do micro-organismo que irá consumir os açúcares provenientes da degradação destes compostos (Silva *et al.*, 2010). Por outro lado, em geral os pré-tratamentos físicos são métodos simples e de fácil operação, porém a necessidade de aplicação de elevadas temperaturas e o grande consumo de energia durante o processo os torna bastante caros (Harun e Danquah, 2010).

### 2.5.2. Pré-tratamento físico-químico

Os pré-tratamentos físico-químicos são empregados especialmente para tornar a biomassa lignocelulósica mais susceptível ao ataque enzimático. Estes métodos se caracterizam pelo emprego de condições de pressões e temperaturas severas, com posterior despressurização (Mackie *et al.*, 1985; Lavarack *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002). Dentre estas tecnologias destacam-se: explosão a vapor ou auto-hidrólise; explosão de fibra de amônia e explosão por CO<sub>2</sub> super-crítico.

A metodologia de explosão a vapor tem sido bastante divulgada na literatura e já se encontra em desenvolvimento em escala laboratorial e piloto em diversos centros de pesquisa. Esta tecnologia consiste na compressão da biomassa lignocelulósica em temperaturas elevadas (160 – 200 °C), seguida de descompressão abrupta. No entanto, o grande obstáculo deste método ainda se encontra na decomposição de açúcares presentes na matéria-prima devido ao efeito das altas temperaturas empregadas no processo (Tahezadeh e Karimi, 2008). Dessa maneira, o material permanece em contato com o vapor de água saturado, possibilitando a solubilização de alguns monômeros e variados polissacarídeos da fração hemicelulósica, transformação de uma parte da lignina e aumento da susceptibilidade da celulose para etapa de hidrólise. A fração hemicelulósica precisa ainda passar por uma etapa de deslignificação (p.e. por processo alcalino com NaOH) para aumentar a solubilização e remoção da hemicelulose para obtenção dos açúcares provenientes desta fração (Rocha *et al.*, 2012). Uma grande vantagem no tratamento por explosão a vapor é o curto tempo gasto nesta etapa (7 minutos), com posterior 1 h para o processo de deslignificação (Santos *et al.*, 2012).

Apesar deste método não utilizar ácidos, durante este pré-tratamento ocorre formação de ácidos (como é o caso do ácido acético), devido à liberação de grupos funcionais da própria matéria-prima, que associados à umidade e alta temperatura, fazem uma reação de autohidrólise (Andrade, 2012). A formação de compostos tóxicos após tratamento por explosão a vapor, dentre eles ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural inibem o metabolismo do micro-organismo, resultando em baixos rendimentos em etanol, especialmente quando aplicadas linhagens para o consumo de xilose, as quais são menos robustas e menos tolerantes a estes compostos (Tahezadeh e Karimi, 2008).

Na metodologia de tratamento de explosão por amônia, a biomassa é impregnada com uma solução de amônia, devido à alta solubilidade de hemiceluloses em ambientes alcalinos. Por outro lado, a fração da lignina também tem sua solubilidade aumentada em meio básico, o que não é interessante para obtenção de altos rendimentos em açúcar a partir da fração hemicelulósica (Tahezadeh e Karimi, 2008).

O uso de explosão com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica compreende na penetração deste fluido (CO<sub>2</sub>) em condições supercríticas na estrutura do material, com posterior descompressão abrupta do sistema. Este processo promove uma ruptura na estrutura cristalina da celulose e do selo formado pela lignina, gerando uma maior área superficial do substrato para ação enzimática. Além disso, esta tecnologia apresenta como vantagem a possibilidade de se trabalhar em baixas temperaturas, evitando assim a degradação e consequente perda dos substratos de interesse presentes na matéria-prima, com concomitante redução dos custos de operação (Zheng *et al.*, 1998).

Em condições supercríticas (temperatura e pressão superiores a 31 °C e 73 atm, respectivamente) o CO<sub>2</sub> difunde-se facilmente pela biomassa penetrando em regiões mais profundas do que quando aplicado fluidos subcríticos, promovendo então maior rompimento das estruturas. Por outro lado, vale lembrar que o CO<sub>2</sub> quando operado em soluções aquosas forma ácido carbônico. A formação deste ácido associada a elevadas temperaturas promove a decomposição de monossacarídeos, reduzindo o rendimento na obtenção de açúcares fermentescíveis de interesse para a produção de etanol. Porém, a

aplicação de CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta grande interesse industrial devido ao seu baixo custo, não toxicidade, grande disponibilidade no setor sucroalcooleiro e possibilidade de reutilização do CO<sub>2</sub> (Zheng *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2011).

### 2.5.3. Pré-tratamento químico

Já os pré-tratamentos químicos visam solubilizar a hemicelulose e a lignina com o objetivo de expor a celulose à conversão por componentes ácidos ou alcalinos. As características principais de cada processo são variadas e os principais métodos químicos são: hidrólise ácida; hidrólise alcalina; ozonólise; deslignificação oxidativa e processo organosolv (Aguilar *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002).

Durante a hidrólise ácida são utilizados ácidos como catalisadores do rompimento das ligações entre as frações lingocelulósicas e suas próprias ligações internas, em condições que variam desde as mais drásticas (hidrólise celulose) até as mais moderadas (solubilização seletiva da hemicelulose) (Aguilar *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002). No Brasil, os reagentes mais utilizados para hidrólise ácida são os ácidos sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), clorídrico (HCl) e nítrico (diluídos ou concentrados) (Sun e Cheng, 2002).

Ácidos concentrados são tóxicos, perigosos e corrosivos, requerendo reatores resistentes à corrosão. Somando-se a isso, os ácidos concentrados devem ser recuperados após a hidrólise a fim de tornar o processo economicamente viável (Sivers e Zacchi, 1995). A aplicação de hidrólise por ácido diluído é bastante difundida na literatura e é um dos processos mais utilizados para a separação da hemicelulose do material lignocelulósico devido à sua eficiência e baixo custo (Sun e Chend, 2005). Este método emprega condições menos severas, atingindo elevados rendimentos de conversão de xilana (principal composto obtido após a degradação da hemicelulose) à xilose. Existem basicamente dois tipos de pré-tratamento ácido diluído: elevadas temperaturas (superiores a 160 °C), operado em fluxo contínuo para baixa concentração de sólidos (5 – 10% peso substrato/peso de mistura de reação) e baixa temperatura (inferior a 160 °C), operado em batelada e com alto teor de sólidos (10 – 40%) (Sun e Cheng, 2002). A grande vantagem deste método se encontra no

curto tempo de residência (10 minutos), grande fração de hemicelulose removida (90%), e baixa degradação de celulose (Rocha *et al.*, 2012).

A fase líquida obtida através da hidrólise ácida contém os açúcares constituintes da hemicelulose (xilose, arabinose e outros), bem como outros compostos considerados inibidores do processo fermentativo, sendo então tóxicos ao metabolismo dos micro-organismos empregados (Parajó *et al.*, 1998b). Estes compostos são gerados devido à degradação de pentoses e hexoses, como é o caso do furfural e hidroximetilfurfural (HMF), respectivamente; ácido fórmico oriundo da degradação do furfural e HMF; os ácidos acético, vanílico, siríngico, palmítico e compostos fenólicos decorrentes da degradação da lignina (Saha, 2003; Saha e Hayashi, 2004). Frente a isso, a utilização de uma etapa de detoxificação para remoção dos compostos inibidores formados durante o processo é crucial para contornar a produção dos compostos tóxicos durante esta hidrólise. Diversos métodos tem sido empregados para promover a detoxificação do hidrolisado hemicelulósico, entre eles podemos destacar a evaporação (Palmqvist *et al.*, 1996), uso de resina de troca iônica (Lee *et al.*, 1999), extração com solvente (Cruz *et al.*, 1999), neutralização (Buhner e Agblevor, 2004), o uso de membranas (Grzenia *et al.*, 2008), adsorção por carvão ativo (Canilha *et al.*, 2008), e ainda por métodos biológicos (Parawira e Tekere, 2011), cada qual apresentando suas vantagens e desvantagens e sendo aplicados de acordo com a necessidade e custo benefício do processo em estudo.

Já o pré-tratamento por hidrólise alcalina é bastante eficiente e promove a solubilização da lignina, com mínima solubilização de celulose e hemicelulose, quando comparado ao tratamento ácido ou hidrotérmico (Carvalho *et al.*, 2008). Esta etapa é de extrema importância uma vez que a lignina forma ligações altamente resistentes entre a celulose e hemicelulose, gerando uma estrutura rígida e resistente à ação enzimática. Com a lignina solúvel, as frações de celulose e hemicelulose se tornam mais susceptíveis às reações de hidrólise, aumentando concomitantemente o rendimento na conversão de açúcares (Taherzadeh e Karimi, 2008). Dessa maneira, na presença de álcalis ocorre a saponificação de ligações éster, presentes para promover a união entre xilanas e entre a xilana e a lignina, permitindo então a extração de parte destas frações (unidades de xilana),

e ao mesmo tempo com redução da cristalinidade das fibras (Aguilar *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002).

Também existe o pré-tratamento conhecido como *organosolv* que consiste em promover a hidrólise através de uma mistura de ácido e solvente orgânico utilizada para romper as ligações internas da lignina e hemicelulose (Aguilar *et al.*, 2002; Sun e Cheng, 2002; Taherzadeh e Karimi, 2008). Existem diversos solventes disponíveis para esta finalidade, sendo que a escolha do solvente ideal deverá levar em consideração o custo, toxicidade, facilidade de separação e recuperação. Etanol tem sido aplicado como solvente orgânico para promover esta hidrólise devido à sua alta disponibilidade e baixo peso molecular. Somando-se a isso, solventes orgânicos de baixo peso molecular (consequentemente com baixo ponto de ebulição) apresentam a capacidade de operar processos fáceis e economicamente viáveis, pela possibilidade de serem recuperados por métodos simples como evaporação e condensação. Por outro lado, estes solventes exercem elevado poder inibitório devido à formações de vários compostos indesejáveis na etapa de hidrólise, necessitando também de uma etapa de detoxificação para remoção destes do meio (Sun e Cheng, 2002).

As desvantagens associadas ao processo de hidrólise podem ainda ser contornadas a partir da escolha de condições ótimas de hidrólise, possibilitando a obtenção de rendimentos máximos em açúcares e formação mínima de compostos tóxicos, proporcionando assim a redução do custo operacional do processo e garantia de sustentabilidade deste método (Chandel e Singh, 2011).

#### **2.5.4. Pré-tratamento biológico**

Outra alternativa para o pré-tratamento da biomassa é através da aplicação de métodos biológicos, os quais resultam em parcial deslignificação da lignocelulose usando complexo enzimático ou micro-organismos (fungos e bactérias) para degradar a lignina e disponibilizar as frações celulósicas e hemicelulósicas. Durante o processo com micro-organismos, estes secretam enzimas extracelulares, como é o caso das peroxidases e

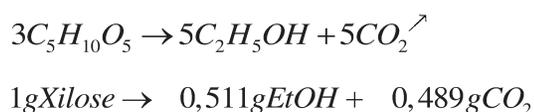
lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa (Hamelinck *et al.*, 2005).

Para promover uma eficiente hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose a açúcares solúveis é necessário promover a ação cooperativa de um complexo enzimático. No caso da celulose, esta hidrólise requer o uso de pelo menos 3 enzimas chaves do processo: endo-glucanases, celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidases, denominadas celulases (Zhang *et al.*, 2012). Enquanto que para efetuar a hidrólise da fração hemicelulósica, principalmente da xilana (principal componente estrutural) à xilose, um sistema enzimático complexo deve ser aplicado ( $\beta$ -1,4 endoxilanases;  $\beta$ -D-xilosidades; acetil xilana esterases; arabinanases;  $\alpha$ -glucuronidases; ácido ferúlico esterases) (Biely, 1993; Li *et al.*, 2000; Tenkanen e Siika-Aho, 2000; Caufrier *et al.*, 2003; Crepin *et al.*, 2004; Squina *et al.* 2010).

Nos últimos anos, a aplicação biotecnológica de xilanas e xilanases tem aumentado consideravelmente (Subramaniyan e Prema, 2002). Produtos da hidrólise da xilana, como é o caso da xilose, podem ser então convertidos em solventes, adoçantes artificiais de baixa caloria (xilitol) e combustíveis líquidos (Polizeli *et al.*, 2005) como é o caso da produção do etanol 2G, foco deste estudo.

## 2.5. Metabolismo da Xilose

O rendimento estequiométrico da conversão de xilose em etanol ( $Y_{p/s}$ ) baseia-se na produção máxima teórica de 5 moles de etanol a partir de 3 moles de xilose, acompanhado da liberação do mesmo número de moles de  $\text{CO}_2$ , conforme esquema apresentado na Figura 2.3. Dessa maneira, por outras palavras, é possível gerar um rendimento máximo teórico de  $0.511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{xilose}}$ . No entanto, na prática este rendimento teórico pode não ser atingido em virtude de que uma fração do substrato é desviada para prover o crescimento da biomassa e a manutenção celular bem como, para a formação de outros subprodutos (xilitol, glicerol, ácido acético, etc) intrínsecos ao metabolismo de consumo de xilose (Slininger *et al.*, 1990; Oliveira, 2010; Milessi, 2012).



**Figura 2.3.** Reação global do rendimento teórico da conversão de xilose em etanol ( $Y_{p/s}$ )

Xilose pode ser utilizada como substrato por uma série de micro-organismos tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Na maioria das bactérias, a metabolização de D-xilose ocorre através da isomerização para D-xilulose, catalisada via xilose isomerase, e, posteriormente fosforilada pela ação da enzima xiluloquinase em xilulose-5-fosfato, intermediário comum no metabolismo de células eucarióticas e procarióticas (Verduyn *et al.*, 1985; Oliveira, 2010). A Figura 2.4 apresenta a rota metabólica durante a assimilação de D-xilose por leveduras. Na maioria dos fungos e leveduras fermentadoras de xilose, a conversão inicial D-xilose em D-xilulose-5-fosfato procede através de uma série de etapas de redução e oxidação envolvendo os co-fatores  $NAD(P)^+/NAD(P)H$  (Hahn-Hagerdal, *et al.*, 2007). D-xilose é convertida em D-xilulose através da ação de duas enzimas oxidoreduases,  $NAD(P)H$  e  $NAD(P)^+$  dependentes, conforme caminho metabólico esquematizado na Figura 2.4. Assim, a xilose é inicialmente reduzida para xilitol pela enzima xilose redutase (XR),  $NAD(P)H$  dependente (Bruinenberg *et al.*, 1984; Verduyn *et al.*, 1985; Slininger *et al.*, 1990a). Xilitol é então oxidado para D-xilulose pela enzima xilitol dehidroxeganse (XDH) (Bolen *et al.*, 1986; Rizzi *et al.*, 1989; Yang e Jeffries, 1990). Por fim, a enzima xiluloquinase (XK) catalisa a fosforilação de D-xilose em D-xilulose-5-fosfato (Lee *et al.*; 1968), conectando o metabolismo inicial da pentose ao metabolismo central através do caminho pentose fosfato (PPP). Como esta reação consome adenosina trifosfato (ATP), a taxa de reação é dependente da demanda de energia e potencial de fosforilação da célula (Matsushika *et al.*, 2009). Através da via Embdem-Meyerhof-Parnas, gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato são convertidos em piruvato, com geração de NADPH necessário em outras etapas metabólicas. Em condições de anaerobiose, ou de baixa oxigenação, o piruvato é convertido em etanol através da catálise com duas enzimas (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase) com a reoxidação de NADH. Em condições aeróbicas o piruvato é oxidado através do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Krebs) na cadeia respiratória de transporte de elétrons (fosforilação oxidativa), promovendo a

regeneração de  $\text{NAD(P)}^+$  e ATP (Bruinenberg *et al.*, 1984; Brito *et al.*, 2000; Jeffries, 2009).

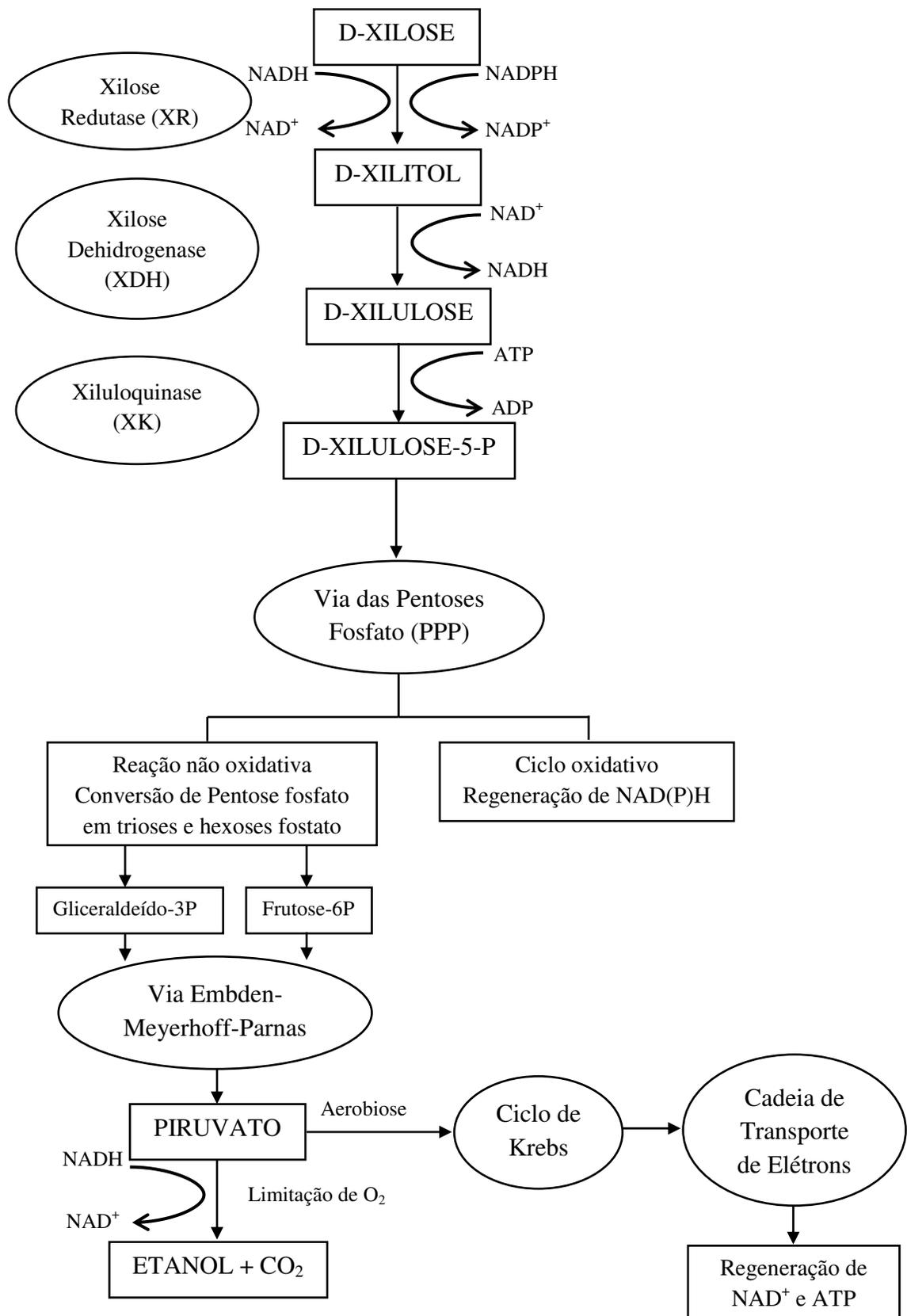
*S. stipitis* apresenta maior produção de etanol, com acúmulo de xilitol desprezível, em condições de anaerobiose estrita ou de limitação em oxigênio (Mussato e Roberto, 2002). Nessas condições, algumas leveduras degradadoras de D-xilose, com XR, tanto NADH como NADPH dependentes, podem regenerar o  $\text{NAD}^+$  consumido na segunda reação do metabolismo. Esta dupla especificidade permite balancear o potencial redox  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  da XDH alterado pelo bloqueio da cadeia respiratória devido à ausência do oxigênio. Dessa maneira, as enzimas XR e XDH destacam-se como catalisadores chave no metabolismo de xilose, sendo altamente dependentes das co-enzimas (NAD(P)H), cujo processo de regeneração está ligado ao processo respiratório celular. Frente ao exposto, é extremamente crucial determinar um nível de oxigenação do meio de cultivo de maneira adequada, visando proporcionar elevadas taxas de produção de etanol, concomitantemente, com baixo crescimento celular, sem prejuízo da viabilidade e capacidade produtora da célula (Oliveira, 2010).

## 2.6. Micro-organismos fermentadores de xilose

A levedura *Sacharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais frequentemente utilizado na produção industrial de etanol combustível 1G devido à sua capacidade de crescer e produzir etanol em meios com altas concentrações de açúcar, apresentando elevados rendimentos e produtividades em etanol (Millati *et al.*, 2004). Porém, como a produção de etanol 2G se baseia na utilização de materiais lignocelulósicos, esta levedura apresenta uma menor versatilidade uma vez que sua forma selvagem é capaz de fermentar apenas hexoses, não apresentando o sistema enzimático necessário para o metabolismo de pentoses, como é o caso da xilose, que é um dos principais constituintes da fração hemicelulósica, limitando sua aplicação na produção de etanol 2G (Krishnan *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001; Hamacher *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 2009). Com isso, um grande obstáculo técnico para as indústrias ainda permanece na fermentação da xilose, uma vez

que a proporção deste açúcar na biomassa lignocelulósica é da ordem de 40 % (Slininger *et al.*, 2014).

O aumento do interesse pela utilização de biomassa lignocelulósica como fonte de substrato para produção de etanol combustível tem atraído a atenção de diversos pesquisadores, principalmente devido à necessidade de investigar quais micro-organismos são capazes de converter os açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico com altos rendimentos e produtividades (Jeffries *et al.*, 1983). No entanto, o conhecimento sobre espécies que fermentam pentoses ainda é limitado (Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994) de forma que a busca de novos micro-organismos fermentadores de pentoses a etanol ainda é um desafio para a viabilização eficiente da produção de etanol 2G.



**Figura 2.4.** Caminho metabólico de D-xilose em leveduras  
Adaptado de Paraió *et al.* (1998a) e Matsushika *et al.* (2009).

D-xilose pode ser metabolizada por diferentes tipos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (naturalmente ocorrentes e/ou recombinantes). A Tabela 2.2 apresenta o desempenho de diferentes espécies de micro-organismos fermentadores de xilose. Dentre as bactérias naturalmente ocorrentes, *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E apresenta um bom rendimento em etanol. Por outro lado, geralmente as bactérias apresentam baixa tolerância ao etanol, bem como a outros sub-produtos do metabolismo acumulados no meio durante o consumo desta pentose (Rosemberg *et al.*, 1980).

Têm sido reportado que os fungos filamentosos apresentam altos rendimentos durante o consumo de pentoses, porém com baixas produtividades, o que, do ponto de vista industrial, torna estes micro-organismos pouco atraentes para produção de etanol 2G (Oliveira, 2010).

As leveduras são consideradas seguras, sendo apenas poucas espécies patogênicas oportunistas. Somando-se a isso, o interesse pela utilização de leveduras é impulsionado pelo conhecimento das características metabólicas e operacionais de uma ampla variedade de linhagens, bem como pela facilidade de manuseio e de obtenção de altas concentrações celulares através do consumo de uma ampla variedade de substratos (Rosa e Peter, 2006). Dentre as leveduras produtoras de etanol 2G, destacam-se as linhagens dos gêneros *Candida shehatae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pachysolen tannophilus* e *Spathaspora passalidarum* (Barnet *et al.*, 1983; Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994; Millati *et al.*, 2004).

Uma alternativa viável para produção de etanol 2G é o emprego de micro-organismos recombinantes (Eliasson *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2005). Hoje em dia existem duas principais linhas de pesquisa de micro-organismo recombinantes. Uma dessas linhas de pesquisa explora a modificação genética do metabolismo dos tradicionais micro-organismos produtores de etanol 1G (como é o caso da linhagem *Saccharomyces cerevisiae*) para permitir que estes fermentem pentoses. Ainda outra linha de pesquisa visa introduzir genes para produção de etanol 2G em micro-organismo que apresentam capacidade nativa de metabolizar pentoses, como é o caso da *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Erwinia* (Dumsday *et al.*, 1997; Saha, 2003). Por outro lado, apesar de

apresentarem eficiência fermentativa notável, do ponto de vista industrial o uso de micro-organismos recombinantes ainda não é viável, uma vez que não são suficientemente estáveis e em muitos casos dependem de meios de cultivo bastante complexos e não otimizados, o que pode encarecer e inviabilizar o processo (Dumsday *et al.*, 1997).

Desta maioria, a linhagem *S. stipitis* têm se apresentado como um micro-organismo promissor para aplicação industrial devido à sua capacidade de fermentar tanto pentoses (xilose e arabinose) como hexoses (glicose, celobiose, galactose e manose) presentes na biomassa lignocelulósica, com rendimentos e produtividades relativamente elevados, porém apresenta baixa tolerância ao etanol acumulado (Laplace *et al.*, 2001; Rouhollah *et al.*, 2007; Jeffries *et al.*, 2009; Silva, 2012; Farias *et al.*, 2014).

**Tabela 2.2.** Desempenho cinético de micro-organismos fermentadores de xilose

<b>Espécie</b>	<b>Xilose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Etanol (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>ps</sub> (g.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Q<sub>p</sub> (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>
<b>Bactérias naturalmente ocorrente</b>				
<i>Bacillus marcerans</i> DMS 1574	20	3,3	0,16	0,03
<i>Bacteroides polypragmatus</i> NRCC 2288	44	6,5	0,15	0,09
<i>Clostridium saccharolyticum</i> ATCC 35040	25	5,2	0,21	0,05
<i>C. thermohydrosulfuricum</i> 39E	5	2,0	0,39	---
<b>Bactérias recombinantes<sup>a</sup></b>				
<i>Escherichia coli</i> B, pLOI297 (pdc, adhB)	80	39,2	0,49	0,70
<i>E. coli</i> B KO11 (pdc, adhB, frd)	80	41,6	0,52	0,87
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1 (pdc, pfl)	100	46,0	0,46	0,96
<i>K. planticola</i> SDF20 (pdc, pfl)	17	7,7	0,44	0,18
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4 (Pzb5)	25	11	0,44	0,57
<b>Leveduras naturalmente ocorrentes</b>				
<i>Candida shehatae</i> CBS 4705	50	24,0	0,48	0,19
<i>C. shehatae</i> CSIR-Y492	90	26,2	0,29	0,66
<i>C. sp.</i> CSIR-62 A/2	50	20,1	0,40	0,42
<i>C. tenuis</i> CBS 4435 (11) <sup>b</sup>	20	6,4	0,32	0,03
<i>Clavispora sp.</i> UWO(OS) 83-877-1 (11) <sup>b</sup>	20	5,9	0,30	0,11
<i>Pachysolen tannophilus</i> RL 171	50	13,8	0,28	0,28
<i>Scheffersomyces stipitis</i> CBS 5773 <sup>c</sup>	100	46,0	0,38	0,46
<i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL-Y7124 <sup>d</sup>	120	54,9	0,46	0,25
<b>Leveduras recombinantes</b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (XYL 1, XYL, 2)	21,7	1,6	0,07	0,07
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (XYL A)	50	21,0	0,42	0,19
<b>Fungos filamentosos</b>				
<i>Fusarium avenaceum</i> VTT-D-80146 (5) <sup>b</sup>	50	12,0	0,24	0,07
<i>F. clamydosporum</i> VTT-D-77055	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. culmorum</i> VTT-D-80148 (3) <sup>b</sup>	50	12,0	0,24	0,07
<i>F. graminearum</i> VTT-D-	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. lycopersici</i> ATCC 16417	50	16,0	0,32	0,17
<i>F. oxysporum</i> VTT-D-80134 (3) <sup>b</sup>	50	25,0	0,50	0,17
<i>F. sambucium</i> VTT-D-77056	50	13,0	0,26	0,08
<i>Monila sp.</i>	50	12,6	0,25	0,08
<i>Paecilomyces sp.</i> NFI ATCC 20766	100	39,8	0,40	0,24

<sup>a</sup> Os genótipos relevantes estão dentro dos parênteses sendo: pdc, piruvato descarboxilase; pfl, piruvato formatolisase; adhB, álcool desidrogenase II; frd, fumarato redutase; pZB5 carrega os genes de xilose isomerase, xiluloquinase, transcetolase e transaldolase; XYL 1, xilose redutase; XYL 2, xilitol desidrogenase; XYL A, xilose isomerase

<sup>b</sup> Os parênteses denotam o número de linhagens investigadas

<sup>c</sup> Betancur (2005)

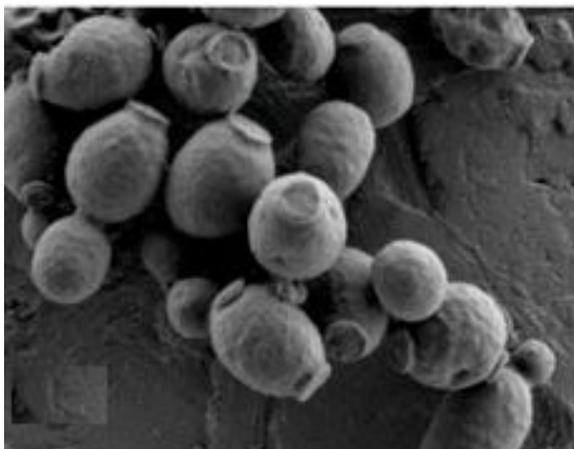
<sup>d</sup> Farias *et al.* (2014)

Fonte: Olsson & Hahn-Hagerdal (1996); Betancur (2005); Farias *et al.* (2014).

## 2.7. *Scheffersomyces stipitis*

*Scheffersomyces stipitis* tem sido descrita na literatura como forte candidata para os processos de bioconversão de pentoses em etanol (Nigam, 2001; Abgogo e Coward-Kelly, 2006; Unrean e Nyugen, 2013; Farias *et al.*, 2014). Este micro-organismo dispõe de caminhos genéticos e metabólicos bem estabelecidos (Jeffries *et al.*, 2007; Balagurunathan *et al.*, 2012; Unrean e Nyugen, 2012a), sendo capaz de metabolizar uma ampla faixa de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, dentre eles xilose, glicose, manose e galactose (Cho *et al.*, 2010; Unrean e Nguyen, 2012b). *S. stipitis* é uma levedura naturalmente ocorrente e que vem apresentando resultados promissores para rendimento em etanol a partir de xilose (Agbogbo e Coward-Kelly, 2006). Somando-se a isso, esta linhagem é capaz de fermentar xilose em etanol mais eficientemente do que qualquer outra linhagem naturalmente ocorrente reportada pela literatura (Unrean e Nyugen, 2013).

Morfologicamente, *S. stipitis* é uma linhagem ascomiceto que possui células esféricas, elípticas ou ainda alongadas, com tamanho em torno 2,2 a 6  $\mu\text{m}$  e possui reprodução assexuada, normalmente por gemulação lateral (Jeffries, 2006; Correia, 2008; Agbogbo e Coward-Kelly, 2008; Unrean e Nguyen, 2012a). A Figura 2.5 apresenta uma microfotografia da linhagem de levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 obtida através de microscopia eletrônica de varredura, para melhor visualização da geometria das células.



**Figura 2.5.** Microscopia eletrônica de varredura da linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124, aumentada 5000 vezes (escala de 2  $\mu\text{m}$ ).

Fonte: Hughes *et al.* (2012).

Inicialmente foi classificada como *Pichia stipitis* em 1967. Estudos recentes reclassificaram seu gênero para *Scheffersomyces* após análise filogenética desenvolvida pelos pesquisadores Kurtzman e Suzuki (2010). Os autores investigaram as sequências de rRNA D1/D2 LSU (“*large subunit*”) e SSU (“*small subunit*”) para determinar a colocação filogenética de diferentes espécies de *Pichia* e estabeleceram o novo gênero em homenagem ao Prof. W. Alexandre Scheffers, pesquisador da *Delft University of Technology*, Holanda, em virtude das imensas contribuições nas áreas de fisiologia microbiana e biotecnologia, particularmente em relação à fermentação de D-xilose.

No entanto, a obtenção de elevados rendimentos em etanol por *S. stipitis* ainda permanece como um substancial gargalo para futuros progressos e estudos devido ao fato das pobres condições de cultivo hoje em dia exploradas na literatura, bem como pela falta de desenvolvimento de novos processos que produzam etanol 2G de maneira eficiente e economicamente viável.

## 2.8. Fatores que influenciam a bioconversão

A bioconversão de pentoses em etanol é um processo complexo fortemente influenciado por uma série de fatores como condições de cultivo, tipo de meio de fermentação, tipo de processo empregado, entre outros. Durante o processo fermentativo visando à produção de etanol as leveduras encontram várias condições de estresse ao seu metabolismo, simultâneas ou sequenciais, impostas pelo processo, como altas concentrações de etanol no meio, alta pressão osmótica (quando submetidas a altas concentração de açúcar), formação de co-produtos indesejáveis ao metabolismo, pH, temperatura, entre outros (Basso *et al.*, 2011).

O metabolismo fermentativo de *S. stipitis* (micro-organismo investigado neste estudo) é induzido pela resposta à limitação em oxigênio, sendo assim uma espécie anaeróbia facultativa (Correia, 2008). O processo de produção de etanol por *S. stipitis* é fortemente influenciado pelos níveis de oxigênio na cultura, uma vez que o excesso de oxigênio desvia o metabolismo do micro-organismo para promover acúmulo de biomassa

(Sunitha *et al.*, 1999). Dessa maneira, a aeração é um fator crucial na fermentação de xilose, visto que a disponibilidade de oxigênio determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre crescimento e formação de produto, sendo, portanto, capaz de afetar drasticamente os parâmetros fermentativos (du-Preez, 1994). Antunes (1997) comprovou isto mostrando que o aumento da aeração promove o crescimento celular em detrimento da produção de etanol, e, por outro lado, uma redução na aeração favorece a produção em etanol, porém, com baixa produtividade. Silva (2001) mostrou que a produtividade em etanol por *S. stipitis* é favorecida por condições intermediárias de aeração (agitação = 200 rpm e razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}} = 2,5$ ), onde foi alcançada produtividade em etanol ( $Q_p$ ) e o rendimento em produto ( $Y_{p/s}$ ) de 0,39 g/L.h e 0,36 g/g, respectivamente.

Sabe-se também que nos processos de bioconversão o pH é um importante fator, sendo capaz de exercer grande influência no acúmulo de etanol. du-Preez (1994) reportou que o rendimento em etanol pela levedura *P. stipitis* CBS 7126 foi fortemente afetado por variações de pH entre 2,5 e 6,5, sendo que o pH ótimo se situa entre 4,0 e 5,5. Slininger *et al.* (1990b) relataram que para fermentação de xilose por *S. stipitis* NRRL Y-7124 a faixa de pH encontra-se na faixa entre 4 e 7, não sendo, nesta faixa, observada grande influência da variação do pH sobre os parâmetros fermentativos, e sendo o pH 4,5 o mais recomendável, por minimizar a possibilidade de contaminação por bactérias (menos resistentes a este pH). Por outro lado, por este valor estar próximo do limite inferior da faixa ótima de fermentação, seria desejável o uso de um controle autotático de pH, para evitar que os valores de pH no meio caíam abaixo deste nível e se torne tóxico ao metabolismo da levedura. É importante ressaltar que pH ótimo para o crescimento e/ou produção de etanol é função direta do micro-organismo estudado. Porém, as discrepâncias no comportamento de *S. stipitis* em função do pH e os valores ótimos, reportados na literatura, podem estar atribuídos a outras condições de processo, ao tipo de controle de pH e/ou a metodologia empregada para o cálculo dos parâmetros comparativos (du Preez *et al.*, 1994; Kastner *et al.*, 1996).

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes ao metabolismo do micro-organismo, pois a temperatura de cultivo pode interferir na atividade metabólica das

linhagens. Em geral, a temperatura ótima de produção de etanol para espécies de levedura capazes de utilizar pentoses, como *Scheffersomyces* e *Candida*, encontra-se na região de 30 a 32 °C, embora esta faixa de temperatura ótima de processo possa variar dependendo da cepa, do tipo de substrato e ainda da concentração de açúcar (Slininger *et al.*, 1990; du-Preez, 1994). Uma avaliação da faixa de temperatura capaz de favorecer o processo de bioprodução de etanol a partir de xilose foi descrito por Slininger *et al.* (1990), que em seus estudos observaram que a máxima produtividade e concentração de etanol obtidas pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, a partir de 40 g/L de xilose, ocorreu na faixa de temperatura entre 23 e 30 °C, variando pouco nesta região, e quando a concentração inicial de xilose foi elevada para 150 g/L, esta faixa foi deslocada para temperaturas entre 27 e 33 °C. du-Preez *et al.* (1986) relataram que para leveduras como *Scheffersomyces stipitis* CBS 7126 e *Candida shehatae* CBS 2779 a máxima velocidade específica de crescimento, produtividade específica e produtividade volumétrica em etanol ocorrem em torno de 30 °C, sendo observado nesta temperatura um curto tempo de fermentação, e que para *S. stipitis*, o rendimento em etanol permanece constante, com um valor de 0,42 g/g, até 33 °C, havendo um decréscimo para 0,29 g/g quando a temperatura foi elevada para 36 °C. A formação de xilitol, sub-produto do metabolismo durante a conversão de xilose em etanol, é mais sensível aos aumentos de temperatura, sendo que temperaturas inferiores geram maiores desvios para produção de xilitol (Barbosa *et al.*, 1990). Cabe ainda ressaltar que a temperatura ótima do processo não só depende da linhagem, como também do substrato utilizado, sua concentração e presença de outros compostos.

Outro importante aspecto a ser considerado no processo de produção de etanol a partir de xilose é o efeito da concentração inicial de substrato sobre o rendimento do produto. Segundo Roberto *et al.* (1991) que estudou a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *S. stipitis* CBS 5773, o rendimento em etanol não foi afetado em uma faixa de concentração inicial de xilose entre 20 e 99 g/L, permanecendo praticamente constante e próximo de  $Y_{P/S} = 0,38$  g/g, entretanto, para concentrações iniciais de xilose próximas a 145 g/L foi observada uma redução na conversão em etanol para cerca de  $Y_{P/S} = 0,27$  g/g. Os autores observaram

também que a produtividade volumétrica de etanol foi favorecida pelo aumento da concentração inicial de xilose até 76 g/L, sendo que a partir desta concentração, a produtividade foi inibida. Resultados semelhantes foram encontrados por Antunes (1997), que observou que a concentração inicial ótima de substrato se concentra na faixa de 80 a 100 g/L, fornecendo um fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) em torno de 0,48 g/g, havendo quedas superiores a 50% na produtividade em etanol quando se utilizam concentrações superiores a 100 g/L. Recentemente, resultados similares foram encontrados por nosso grupo de pesquisa (Farias *et al.*, 2014) que avaliou o comportamento cinético da linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124 em diferentes concentrações de xilose na faixa de 7 a 145 g.L<sup>-1</sup>, mostrando também que o rendimento em etanol é dependente da concentração de xilose, variando de 0,50 para 7 g.L<sup>-1</sup> a 0,36 para 145 g.L<sup>-1</sup>. De acordo com Hinman *et al.* (1989) a concentração de substrato apresenta um grande impacto no rendimento de etanol a partir de xilose. Experimentos reportados na literatura realizados em baixa concentração de xilose resultaram em altos rendimentos em etanol (em torno de 97 % do rendimento teórico), e este resultado é de vital importância para processos fermentativos com *S. stipitis*, devendo estar linkados então com a aplicação de processos fermentativos que visem suprir esta necessidade, ou seja, manutenção de baixas concentrações de açúcar no meio, como é o caso do modo de operação contínuo ou batelada alimentada.

Em vista das altas concentrações de etanol obtidas no final de cada ciclo fermentativo (8 – 12 % v/v), o etanol é um dos maiores obstáculos de estresse que atacam o metabolismo da levedura (Basso *et al.*, 2010). A cepa *S. stipitis* apresenta baixa tolerância ao etanol formado e aos ácidos alifáticos (derivados da hidrólise do bagaço), mas por outro lado apresenta alto rendimento em etanol a partir de pentoses, o que justifica o seu uso (Rossel, 2006). Essa tolerância difere para cada linhagem de levedura, sendo um parâmetro afetado pelas condições de cultivo, especialmente pela temperatura (du Preez *et al.*, 1986). Hahn-Hagerdal *et al.* (1994) observaram que quando a xilose foi assimilada a 30 °C, o crescimento de *S. stipitis* CBS 7126 foi inibido por concentrações de etanol entre 32 e 34 g/L, e com a redução da temperatura, houve o aumento da tolerância ao etanol, sendo a concentração máxima precedente a total inibição do crescimento, 65 g/L a 25 °C. Segundo du-Preez *et al.* (1987), para a levedura *S. stipitis* CBS 7126, a máxima tolerância a etanol

ocorreu na faixa de temperatura entre 16 e 22 °C, sendo observado crescimento celular até uma concentração aproximada de 60 g/L de etanol, decrescendo esta tolerância a 32 °C para 27,5 g/L e a 10 °C para 47,5 g/L de etanol. Farias *et al.* (2014) avaliou a conversão de xilose em etanol pela linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124 a 28 °C, atingindo concentração máxima de etanol de 55 g.L<sup>-1</sup>, sendo que acima desta concentração o crescimento foi inibido.

Outro ponto relevante é que investigações realizadas com a linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124 encontrou-se uma tolerância ao etanol dependente da fonte de carbono (glicose ou xilose). Esta relação entre a tolerância e a fonte de carbono foi avaliada a partir do crescimento e a atividade da ATPase presente na membrana plasmática para cultivos com glicose ou xilose, sendo as melhores atividades observadas nos cultivos com a hexose (Meyrial *et al.*, 1995). Somando-se a isso, para esta mesma linhagem, durante estudos realizados para avaliar o efeito inibitório do etanol foi observado que, a medida em que aumenta a concentração de produto acumulado no meio, o rendimento em xilitol, subproduto consequente ao efeito inibidor, aumenta linearmente e, conseqüentemente, apresenta uma diminuição proporcional no rendimento em etanol (Delgenes *et al.*, 1988, Jeffries *et al.*, 2006).

Frente a isso, a tolerância das leveduras ao etanol é de vital importância para atingir altos níveis de produção e viabilizar a etapa de destilação do meio fermentado (du Preez *et al.* 1986). No entanto, o papel inibitório do etanol sobre o metabolismo de *S. stipitis* ainda não é completamente entendido. O efeito inibidor do etanol tem sido atribuído a fatores como o acúmulo de acetaldeído e acetato no interior das células, promovendo alterações nas membranas celulares, e ainda em alguns casos, efeitos sobre a osmose celular (Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994). Dessa maneira, o principal efeito inibitório do etanol é devido ao ataque na membrana citoplasmática das células de levedura (Thomas *et al.*, 1978; Alezandre *et al.* 2001). Na presença de etanol, a fluidez da membrana, a qual está relacionada à sua composição lípica, é profundamente alterada, e, como resposta, a permeabilidade de membrana a alguns íons (especialmente H<sup>+</sup>) é significativamente afetada. Com os íons dentro das células, existe uma dissipação do gradiente eletroquímico através

da membrana, que por sua vez afeta a formação e manutenção da força próton motriz com consequente diminuição do pH intracelular, sendo então as alterações na estruturas da membrana celular e nos mecanismos de transporte considerados os principais efeitos inibitórios do etanol ao metabolismo celular (du-Preez *et al.*, 1986; Basso *et al.*, 2010).

Apesar destes problemas, processos fermentativos que atinjam altas concentrações de etanol são desejáveis a fim de reduzir o consumo de água e os custos de energia durante a etapa de destilação. Para contornar parte do problema, o desenvolvimento do processo fermentativo a vácuo proposto neste estudo apresenta-se como uma tecnologia atrativa por permitir a extração do etanol do meio fermentativo assim que ele é produzido, evitando então a inibição do micro-organismo ao produto formado e melhorando também dessa forma o desempenho do processo com aumento de rendimentos e produtividades. Espera-se também que esta condição, além de eliminar os efeitos inibitórios ao metabolismo celular, favoreça o balanço energético do etanol produzido com objetivo de melhorar a sustentabilidade do processo industrial.

## **2.9. Processos de Produção de Etanol**

A produção de etanol por via fermentativa é o processo mais utilizado e aplicado pelas indústrias produtoras desta matéria-prima. No Brasil, a cana de açúcar se destaca, pela sua disponibilidade e custo, como principal meio utilizado na fermentação, pois se trata de uma fonte rica em carbono com elevada concentração de açúcares de sacarose, seguido pela glicose e frutose. Os processos fermentativos para produção de etanol podem ser conduzidos de dois modos distintos: por processos descontínuos ou em batelada e por processos contínuos.

### **2.9.1. Processo Batelada**

Nos cultivos operados no modo batelada simples, no instante inicial, uma solução de nutriente previamente esterelizada no fermentador é inoculada com os micro-organismos de

interesse e incubada de maneira a permitir que a fermentação transcorra sob condições ótimas. No decorrer do processo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos (geralmente na forma de ar ou oxigênio puro), antiespumante, e ácido ou base para controle do pH. No fim do processo, o reator é descarregado e o meio fermentado segue para os tratamentos finais, conhecido como processos de *downstream*. O reator é então lavado, esterelizado e recarregado com novo mosto e inóculo. Dessa maneira, conclui-se que se não houver adição de soluções para controle de processo, nem perda de líquido por evaporação, o volume no decorrer da fermentação permanece constante (Carvalho e Sato, 2001).

Estudos realizados em laboratórios são geralmente operados no modo batelada simples. Durante a fase inicial do cultivo, geralmente todos os nutrientes estão presentes em excesso. Como consequência, a velocidade específica de crescimento do micro-organismo ( $\mu$ ) equivale à máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ). No entanto, nos ambientes naturais, geralmente dos quais os micro-organismos são isolados, a velocidade específica de crescimento do micro-organismo é definida pela avaliabilidade de um ou mais nutrientes limitantes do crescimento, resultando assim em velocidades específicas de crescimento menores do que  $\mu_{max}$  (Brock, 1971; Koch, 1997). Somando-se a isso, operar sistemas em batelada, no qual a velocidade específica de crescimento é igual a  $\mu_{max}$  não necessariamente corresponde a obtenção de máximos rendimentos e produtividades. Os cultivos em batelada apresentam uma série de limitações dificultando seu uso para a obtenção de alta eficiência na produção de etanol. Além disso, culturas em batelada geralmente apresentam efeitos inibitórios promovidos pelas elevadas concentrações iniciais de substrato bem como pelo acúmulo de co-produtos indesejáveis, os quais levam à redução no rendimento em etanol e na produtividade (Riesenber, 1991; Anderson *et al.* 1994; Cho *et al.*, 2010). Este modo de operação apresenta também elevados tempos mortos, ou seja, tempos em que o fermentador não está sendo usado para o processo fermentativo propriamente dito, tais como carga e descarga da dorna e tempo gasto para lavagem e esterilização do sistema. Por outro lado, apresenta baixo risco de contaminação (quando comparados aos processos contínuos de fermentação), grande flexibilidade de operação,

possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, assim como controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo (Carvalho e Sato, 2001).

A grande maioria dos estudos reportados na literatura visando o consumo de xiloses para produção de etanol 2G opera em batelada simples (Slininger *et al.*, 1990; Taniguchi *et al.*, 1997; Unrean *et al.*, 2012b). No entanto, como em geral o grande intuito de um processo fermentativo é prover a obtenção de altos rendimentos e a produvidades, diversas estratégias de cultivo vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos objetivando adequar os processos às características fisiológicas dos micro-organismos, levando sempre em consideração a eficiência de formação dos produtos de interesse.

### **2.9.2. Processo Batelada Alimentada**

Basicamente, o processo batelada alimentada é definido como uma técnica de processos microbianos, na qual um ou mais nutrientes são adicionados no fermentador durante o cultivo, na velocidade na qual o processo ocorre (Bailey e Oliis, 1986; Carvalho e Sato, 2001). Carvalho (1996) explica que o processo baseia-se na alimentação contínua e crescente de substrato ao fermentador (sem purga e até que se atinja o volume máximo), seguindo a taxa de crescimento de massa celular e conseqüentemente taxa de consumo de substrato, de maneira que a concentração de açúcares totais no meio permaneça constante. Após o volume máximo do reator ser atingido, deixa-se a fermentação transcórrer até o esgotamento do açúcar, o que caracteriza o final do processo fermentativo. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ocorrer de forma contínua ou intermitente (Keller e Dunn, 1978). É importante salientar que após a fase de enchimento do reator, o processo passa a ter características de processo descontínuo clássico (sem entrada ou saída de fluido do reator) e a fermentação termina no instante a partir do qual a concentração de produto dentro do reator permanecer constante (Carvalho e Sato, 2001).

Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de alimentação de meio nutriente ao reator, é possível controlar a concentração de substrato no sistema, de modo

que o metabolismo microbiano seja deslocado para a rota metabólica de interesse, levando ao acúmulo do produto desejado (Carvalho e Sato, 2001). Dessa maneira, a adição controlada dos precursores do produto de interesse induzem a um ponto desejado do processo fermentativo, no qual são mantidos baixos níveis de nutriente no meio, o que irá consequentemente minimizar a repressão catabólica (Bailey e Ollis, 1986). A estratégia de cultivo de batelada alimentada com velocidade específica de crescimento controlada pela vazão de alimentação de substrato pode ser aplicada para evitar a inibição promovida pelas altas concentrações de substrato e acúmulo de co-produtos indesejáveis (que ocorrem durante o modo de operação em batelada simples, por exemplo), o que é amplamente requerido para obtenção de altos rendimentos e produtividades do produto desejado (Hong, 1986; Nor *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2004). Para realização de um cultivo em batelada alimentada eficiente, a composição do meio de alimentação necessário para providenciar a adição balanceada de nutrientes é crucial para prevenir o acúmulo de qualquer sub-produto indesejável, bem como para formação efetiva do produto desejado (Pacheco *et al.*, 2004). Recentemente, Unrean e Nhung (2013) avaliaram a estratégia de fermentação no modo batelada alimentada a partir de uma mistura de xilose-glicose (200 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 67 g.L<sup>-1</sup> de xilose) pela linhagem *S. stipitis*, visando aumentar a concentração de etanol no meio, bem como o rendimento e a produtividade do processo em comparação ao processo tradicional realizado no modo batelada simples. Através da estratégia de fermentação no modo batelada alimentada, os autores atingiram aumento no rendimento e produtividade de 1,3 e 2 vezes, os quais apresentaram valores de 0,40 g.g<sup>-1</sup> e 0,42 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> respectivamente, em comparação ao processo tradicional no modo batelada simples. Estudos mais aprofundados com a aplicação desta estratégia podem contribuir para melhorias na fermentação de etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica por *S. stipitis* em escala industrial.

### 2.9.3. Processo Batelada Alimentada com Reciclo de Células

Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle-Boinot, conhecida como batelada alimentada

com reciclo de células.

O processo operado no modo batelada alimentada com reciclo de células é empregado em grande parte das destilarias brasileiras para produção de etanol 1G (em torno de 85 %) (Basso *et al.*, 2010; Brethauer e Wyman, 2010). Neste processo, no fim da fermentação, as células de levedura são centrifugadas e re-utilizadas na próxima etapa fermentativa. Em torno de 90-95 % das células são recicladas, resultando conseqüentemente em alta densidade celular dentro do fermentador (10 a 14 % em base úmida/volume) (Basso *et al.*, 2010). Dentre as vantagens do reciclo de células estão a redução do tempo requerido para as etapas de limpeza, esterilização e propagação de um novo inóculo, redução dos custos relacionados aos nutrientes empregados no preparo de um novo inóculo, bem como menor quantidade de açúcar desviado para acúmulo de biomassa, promovendo conseqüentemente aumento da produtividade em etanol (Basso *et al.*, 2010; Brethauer e Wyman; Sanda *et al.*, 2011). Somando-se a isso, a alta densidade de células dentro do fermentador é responsável por um curto tempo de fermentação, na ordem de 6 a 10 horas. Além disso, altas densidades celulares levam à redução do crescimento microbiano, desviando o carbono para o acúmulo de maiores concentrações de etanol e concomitantemente gerando o aumento do rendimento do processo para níveis de 90 a 92 % do valor teórico (Basso *et al.*, 2008).

Geralmente, quando o processo fermentativo acaba, as células de leveduras são separadas por centrifugação, resultando em uma suspensão celular concentrada, denominada “creme de levedura” com 60 a 70 % (base úmida/volume) de células. Este creme é então diluído em água (1:1), e tratado com ácido sulfúrico (pH 1,8-2,5) por 2 horas, com intuito de reduzir a contaminação bacteriana e reutilizar este creme como cultura *starter* do próximo cultivo. Dessa maneira, é importante ressaltar que a prática do reciclo de células leva a uma seleção de leveduras selvagens capazes de dominar e resistir às condições estressantes do processo industrial, tais como altas concentrações de etanol, altas temperaturas, estresse osmótico devido à presença de sais e açúcares, contaminações microbianas, bem como os baixos valores de pH empregados na etapa de reciclo (Miranda Junior *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2010). Por fim, hoje em dia o reciclo de células é o

processo mais amplamente aplicado por ser uma estratégia viável para a produção industrial de etanol 1G possibilitando a obtenção de altos rendimentos e produtividades. No entanto, esta tecnologia ainda não foi aplicada à produção de etanol 2G em escala industrial. Frente ao exposto, esta tese objetivou investigar a influência do reciclo de células na produção de etanol 2G pela linhagem *S. spitis* NRRL-Y7124 durante o consumo de pentoses. Para isso, o sistema proposto foi acoplado com um sistema de filtração externo com o intuito de reter as células no sistema e maximizar consequentemente o acúmulo de etanol.

#### 2.9.4. Processos Contínuos

Segundo Carvalho (1996) com o esgotamento tecnológico do processo batelada alimentada, Melle-Boinot, a fermentação alcoólica contínua se firmou como uma alternativa industrial viável. Siqueira (1997) explica que os sistemas contínuos são caracterizados por possuir uma linha de retirada do álcool e outra de alimentação do substrato no tanque de fermentação. A fermentação contínua pode ainda ser concebida com ou sem recirculação de células. A separação de biomassa no mosto pode ser realizada por vários métodos, como por exemplo, a centrifugação, a filtração, a separação por membranas, etc.

Andrietta (1994) cita como vantagens do processo fermentativo contínuo, como sendo: maior produtividade; maior uniformidade do produto e maior adaptabilidade ao controle automático. Siqueira (1997) cita alguns pontos negativos da fermentação contínua, como dificuldade de manutenção do meio estéril por muito tempo e ocorrência de mutantes não interessantes ao processo, especialmente quando estes são conduzidos por longos períodos de tempo. Alves (1996) afirma que o processo contínuo possui maior produtividade que o processo descontínuo, devido à ausência de paradas para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação e também pelas células estarem mais adaptadas ao meio.

De acordo com Godoy *et al.* (2008), os processos contínuos apresentam baixo custo de instalação, o qual se deve à redução nas dimensões dos fermentadores e menor

necessidade de trocadores de calor se comparados aos processos operados no modo batelada. Brethauer e Wyman (2010) destacam que os processos contínuos desenvolvidos na década de 70 para produção de etanol 1G enfrentaram diversos problemas, dentre eles baixa produtividade e rendimentos, o que inviabilizou sua transferência para operação em larga escala. Atualmente, com o conhecimento e domínio de modelos cinéticos e aplicação de ferramentas de otimização, pode-se obter processos mais estáveis, flexíveis, com elevados rendimentos e produtividades. Comparando-se o processo contínuo, ao processo clássico de produção de Melle-Boinot é possível aumentar em 1,5% a eficiência de fermentação, com consequente redução dos custos operacionais (Zanin *et al.*, 2000).

#### **2.9.5. Processos Extrativos: Extração *flash* a vácuo**

Segundo Luong (1985), o etanol que se acumula no meio fermentativo inibe a atividade metabólica do micro-organismo. Algumas melhorias têm sido propostas ultimamente visando aumentar a produtividade de processos fermentativos. A utilização de um sistema contínuo com remoção do etanol acumulado no meio fermentativo através de técnicas de extração reduz problemas de inibição pelo produto resultando em melhor desempenho do processo, e, além disso, gera um aumento de produtividade quando comparado com processos industriais convencionais (Atala, 2006; Mariano *et al.*, 2010). Nos últimos anos, vários esquemas combinando fermentação com sistema de separação foram propostos: Ramalingham & Finn (1977) e Cysewski & Wilke (1978) utilizaram fermentação sob vácuo, Christen *et al.* (1990) estudaram o método de pervaporação, Daugulis *et al.* (1994) acoplaram um sistema de extração líquido – líquido ao fermentador, Ishida e Shimizu (1996) usaram um sistema de destilação *flash* a pressão atmosférica ao processo fermentativo, Maiorella *et al.* (1984) e Atala (2006) acoplaram à fermentação um sistema de destilação *flash* a vácuo.

O processo extrativo tem despertado bastante interesse industrial em virtude da redução de custos fixos e de manutenção relacionados ao fato da não necessidade de trocadores de calor no processo com a instalação do tanque *flash*. Além disso, o *flash* possibilita a alimentação de elevadas concentrações de açúcares, gerando assim maior

produtividade em etanol e menor geração de vinhaça. Atala (2006) investigou a produção de etanol 1G por *S. cerevisiae* através de um processo contínuo extrativo, acoplado a um tanque *flash*. Através do sistema proposto, Atala (2006) atingiu uma produtividade em etanol de  $10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  atingida para concentração de substrato de  $230 \text{ g.L}^{-1}$ , produtividade esta superior à produtividade atingida nos processos tradicionais de produção de etanol 1G ( $7,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). O Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) têm focado seus estudos na possibilidade de integração do processo de produção de etanol 2G com a tecnologia 1G consolidada atualmente nas usinas sucroalcooleiras. Para tal, os pesquisadores do CTC desenvolveram um projeto no qual o caldo de cana hidrolisado será misturado na etapa de fermentação ao caldo de cana. O intuito é acoplar a planta de hidrólise ao processo de produção 1G, aproveitando assim a estrutura já instalada no Brasil, o que provavelmente facilitará a transferência de tecnologia (Ciência, 2011).

O sistema fermentativo extrativo que foi desenvolvido nesta tese para realização dos ensaios foi adaptado de um protótipo inicialmente projetado por Atala (2006), visando investigar a possibilidade de transferência da tecnologia consolidada para produção 1G para o cenário 2G. No entanto, para possibilitar a transferência de tecnologia foi necessário realizar uma série de adaptações para suprir os inconvenientes tecnológicos e metabólicos apresentados pela linhagem adotada *S. stipitis* visando a produção de etanol 2G. O protótipo desenvolvido consiste dos seguintes equipamentos: i) fermentador; ii) sistema de filtração; iii) tanque *flash*; iv) bombas peristálticas; v) sistema de vácuo; vi) sistema de condensação. No processo de operação deste sistema, o fermentador é alimentado continuamente por um meio concentrado com o substrato de interesse, o produto é formado pela linhagem empregada e excretado no meio e o líquido fermentado, concentrado em etanol é enviado ao tanque *flash*, onde ocorre então a extração do mesmo do caldo fermentativo. A extração é promovida através da diferença de pressão entre a alimentação e o volume do tanque, na temperatura do processo fermentativo. O vapor rico em etanol é enviado ao condensador e a fase pobre em etanol é reciclada ao fermentador, mantendo dessa forma uma concentração baixa de etanol no meio, evitando consequentemente a inibição do metabolismo do micro-organismo por este produto. As células são mantidas no sistema por microfiltração tangencial. A vazão de alimentação deve ser igual à soma das

vazões do permeado, condensado e evaporado, de forma a manter o volume líquido do sistema constante, o qual é obtido através de um sistema de boia controlada por um sistema supervisorio via computador. Dessa maneira, o sistema é capaz de operar com baixas concentrações de etanol (devido à estratégia de extração), com baixas concentrações de açúcar (devido à estratégia de alimentação baseada na velocidade de consumo de substrato do micro-organismo), bem como altas concentrações celulares (devido à estratégia de reciclo de células). Por fim, através da redução de algumas condições inibitórias ao metabolismo celular (substrato e etanol), o sistema visa aumentar os rendimentos e produtividades através da aplicação de uma estratégia tecnológica economicamente viável que contribua para quebrar as barreiras que ainda impedem que a produção de etanol 2G atinja maturidade industrial.

## **2.10. Cinética Microbiana**

No estudo da cinética da fermentação alcoólica, considera-se que quando uma pequena quantidade de células viáveis é adicionada ao meio líquido, com os nutrientes essenciais necessários, em temperatura e pH adequados, o crescimento celular irá ocorrer. Associados com o crescimento celular estão dois outros processos: consumo de algum substrato presente no meio pelas células e a liberação de produtos metabólicos finais (Bailley e Ollis, 1986).

Muitos processos bioquímicos envolvem o crescimento celular no modo batelada, após a alimentação de um meio líquido com um inóculo de células viáveis no reator, sendo que a partir do momento da inoculação, nada mais é adicionado ou removido ao processo, de maneira que o crescimento celular ocorra. Para a determinação da cinética de um processo fermentativo em batelada é importante analisar o comportamento dos componentes de interesse em relação ao tempo. Estes componentes podem ser consumo de substrato, crescimento celular e produtos do metabolismo, sendo que o cálculo destas taxas de consumo configuram o objetivo principal da cinética microbiana, levando-se sempre em consideração a influência de outros fatores como pH, temperatura e demais inibidores presentes no meio sobre estas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são

essenciais para o projeto adequado de uma unidade industrial de produção de etanol e para melhor entender seu processo (Carvalho, 1996; Hiss, 2001).

Com base em dados experimentais de concentrações de interesse e do balanço de massa das mesmas em função do tempo, podem-se ajustar curvas a partir das quais são obtidos os parâmetros de transformação. Estes parâmetros por sua vez podem ser divididos em velocidades instantâneas de transformação ( $r_X$ ,  $r_S$  e  $r_P$ ), velocidades específicas de transformação ( $\mu_X$ ,  $\mu_S$  e  $\mu_P$ ) e fatores de conversão ( $Y_{X/S}$ ,  $Y_{X/P}$  e  $Y_{P/S}$ ) (Hiss, 2001). As velocidades instantâneas de transformação são dadas pelas Equações (2.1) a (2.3), para cada valor de tempo t:

$$r_X = \frac{dX}{dt} \text{ (velocidade instantânea de crescimento microbiano)} \quad (2.1)$$

$$r_S = -\frac{dS}{dt} \text{ (velocidade instantânea de consumo de substrato)} \quad (2.2)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \text{ (velocidade instantânea de formação de produto)} \quad (2.3)$$

Estas velocidades são calculadas a partir da inclinação (cálculo da tangente) das curvas de X, S e P em função do tempo no qual o processo fermentativo transcorre.

No entanto, como citado anteriormente, em processos fermentativos em batelada, a concentração de micro-organismos aumenta com o tempo de cultivo, levando conseqüentemente a um incremento na quantidade de enzimas utilizadas na transformação de substrato em produto. Por este motivo, é lógica a representação destas velocidades instantâneas de transformação na forma específica, com relação à concentração microbiana existente no tempo t. Assim surgem as novas definições para as velocidades específicas:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \left( \frac{dX}{dt} \right) \quad (2.4)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (2.5)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \left( \frac{dP}{dt} \right) \quad (2.6)$$

As concentrações de X, S e P podem ainda ser correlacionadas através de fatores de conversão, considerando-se um determinado tempo t de fermentação:

$$Y_{X/S} = \frac{X-X_0}{S_0-S} \quad (2.7)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad (2.8)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X-X_0}{P-P_0} \quad (2.9)$$

No entanto, geralmente estes valores não são constantes com o tempo, pois nem sempre o substrato se esgota completamente quando a concentração celular atinge seu nível máximo, podendo ainda existir uma concentração de substrato residual no meio, ao término do processo. Isso ocorre porque à medida que o micro-organismo se reproduz, são formados produtos do metabolismo que inibem o crescimento celular, sem mencionar o próprio substrato, que pode dificultar ou até mesmo inibir a atividade microbiana dentro de determinadas concentrações. Quando isso acontece, devem-se calcular seus valores instantâneos, substituindo as Equações (2.7) à (2.9) por (2.10) a (2.12):

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad (2.10)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\mu_P}{\mu_S} \quad (2.11)$$

$$Y_{X/P} = \frac{r_X}{r_P} = \frac{\mu_X}{\mu_P} \quad (2.12)$$

Esses parâmetros de conversão geralmente não são constantes para um mesmo micro-organismo, já que o crescimento microbiano em relação a um substrato depende também de outros componentes presentes no meio de cultivo, da transferência de oxigênio no meio, presença de inibidores, pH, temperatura, dentre outros.

## 2.11. Modelagem Matemática

O uso de modelos matemáticos possibilita prover a sumarização de propriedades fisiológicas básicas das linhagens em estudo atuando como uma importante ferramenta para simular e otimizar várias condições de cultivo, bem como avaliar várias configurações de biorreatores para formação do produto de interesse (Slininger *et al.*, 2014).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente no reator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações ocorrem. Dessa forma, o objetivo da modelagem matemática e simulação de processo, como ferramenta do desenvolvimento tecnológico de processos fermentativos, é prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, inclusive em condições não testadas empiricamente, possibilitando a determinação das condições operacionais de controle, no qual o modelo matemático passa a ser parte integrante do mesmo (Schmidell, 2001).

De acordo com os principais fenômenos que interferem no processo produtivo, tais como limitação e inibição por substrato, principalmente no que se refere à existência e ao número de substrato limitante e inibidores, tipo de produto gerado, existência ou não de associação com crescimento, entre outros, podemos simular o processo fermentativo. A partir dos gráficos cinéticos, podemos analisar o comportamento das velocidades específicas de crescimento, geração de produtos metabólicos e de consumo de substratos, e, assim é possível identificar os principais fenômenos a serem incluídos na construção de um modelo matemático de processos fermentativos.

### 2.11.1. Modelos Cinéticos

Segundo Dutta (2008) o entendimento da cinética de crescimento microbiano, bem como os fatores físicos e químicos que influenciam é de extrema importância para o projeto e operação adequada de sistemas fermentativos. No desenvolvimento de modelos, várias abordagens podem ser dadas com relação à população microbiana e composição celular.

Segundo Bailey e Ollis (1986), os modelos cinéticos usados em fermentação podem ser divididos em: i) não estruturados e não segregados: a população celular é considerada como soluto monocomponente; ii) estruturados e não segregado: as células são consideradas multicomponentes com composição média semelhante; iii) não estruturados e segregados: as células são consideradas como indivíduos heterogêneos, porém descritos por um único componente; e iv) estruturados e segregados: as células são elementos distintos e descritas por multicomponentes.

Segundo Andrietta (1994), o tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é o não estruturado e não segregado, o qual é baseado nas seguintes simplificações (Bailey e Ollis, 1986; Dutta, 2008): i) as células são consideradas como componentes únicos, podendo ser representadas por uma única célula viável, como número de células, massa celular, concentração proteica e outros (característica não segregada); e ii) a massa celular é igualmente distribuída ao longo da cultura, sendo que a natureza heterogênea da cultura pode ser desconsiderada (característica não segregada). Nesta tese, os modelos apresentados possuem abordagem não segregada e não estruturada.

Vários fatores afetam o crescimento microbiano, entre eles o pH do meio, temperatura, entre outros. Apesar de importantes, esses fatores podem ser facilmente controlados nos fermentadores. Geralmente os meios de cultivos são preparados de forma que um único componente é o limitante da taxa de reação, de forma que os demais estejam em excesso. Assim, o componente limitante passa a influenciar de forma bastante significativa na taxa de crescimento celular e é importante que o mesmo seja incluído em modelos (Dutta, 2008). Embora o mecanismo de crescimento de micro-organismo seja um conjunto de reações complexas, é possível representar este crescimento por modelos relativamente simples. A equação mais simples é a equação proposta por Monod (Tabela 2.3).

A equação de Monod demonstra que a velocidade específica de crescimento  $\mu$  é uma função da concentração de substrato limitante e é válida somente para sistemas que não possuam efeitos inibitórios significativos, ou seja, para baixas concentrações de etanol e de biomassa no meio fermentativo. No entanto, vale a pena mencionar que o modelo de

Monod não leva em conta o efeito da inibição do crescimento por substrato, mas apenas o mesmo como limitante. Outros modelos que levam em conta a inibição do crescimento microbiano em função do substrato estão apresentados na Tabela 2.3.

A Tabela 2.3 apresenta alguns modelos cinéticos mais empregados na literatura para representar dos fenômenos comumente identificados em processos fermentativos.

**Tabela 2.3.** Equações para simulação e modelagem matemática de processos fermentativo

Crescimento num único substrato limitante	(Monod, 1950)	$\mu_x = \mu_{máx} \frac{S}{K_S + S}$
Morte celular	(Sinclair; Kristiansen, 1987)	$\mu_d = -K_d$
Crescimento num único substrato limitante e inibidor	(Andrews, 1968)	$\mu_x = \frac{\mu_a S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$
Crescimento com múltiplo substrato limitante	(Dunn <i>et al.</i> , 1992)	$\mu_x = \frac{\mu_{m1} S_1}{K_{S1} + S_1} + \frac{\mu_{m2} S_2}{K_{S2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}}$
Produção de produtos metabolitos associados e não associados ao crescimento	(Luedeking; Piret, 1959)	$\mu_p = \alpha \mu_x + \frac{\beta_m S}{K_{\beta S} + S}$
Produção de produtos metabolitos inibidores	(Aiba; Shoda, 1969)	$\mu_x = \frac{\mu_m S}{K_S + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + P}$

Onde:

$\mu_x$  é a velocidade específica de crescimento.

$\mu_d$  é a velocidade específica de morte celular.

$\mu_p$  é a velocidade específica de produção celular.

$\mu_s$  é a velocidade específica de consumo de substrato.

S, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub> são a concentrações de substrato limitantes

X é a concentração celular.

P é a concentração do produto.

$Y_{x/s}$  o fator de conversão de substrato em células.

$\mu_m, \mu_{m1}, \mu_{m2}, \mu_a, \mu_0, \mu_1, \mu_2, \beta, \alpha, K_S, K_P, K_d$  são parâmetros cinéticos.

### 2.11.2. Cinética de inibição

Na cinética de inibição pelo produto acumulado, o produto leva à inibição do crescimento microbiano devido a vários mecanismos, o que acaba reduzindo a taxa de formação dos próprios produtos. Dentre os principais inibidores não competitivos estão os álcoois (etanol, butanol, propanol e isopropanol) que atuam na região hidrofóbica da membrana plasmática das células, reduzindo o potencial da membrana, bem como promovendo a saída de prótons, o que diminui o potencial de prótons no interior da célula. Além disso, a inibição pode ocorrer sobre as enzimas presentes nas células, reduzindo então o metabolismo microbiano, o transporte de açúcares e aminoácidos (Blank e Clark, 1997). Luong (1985) afirma que durante o processo de fermentação alcoólica o etanol acumula no meio até que a atividade metabólica do micro-organismo cesse, pois a presença de etanol diminui o valor da velocidade específica de crescimento. A equação de Monod pode ser então representada da seguinte forma:

$$\mu_x = \mu_l \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (2.13)$$

onde  $\mu_l$  é um fator de correção que leva em consideração a interferência da concentração de etanol sobre a velocidade específica máxima de crescimento.

Vários modelos cinéticos foram propostos para verificar a correlação entre  $\mu_l/\mu_{m\acute{a}x}$  e a concentração de etanol durante o processo fermentativo. Quatro tipos de correlações foram apresentados por Luong (1985), que mostram a dependência de  $\mu_l$  com a concentração de etanol, sendo elas:

**- Relação linear:**

$$\mu_l = \mu_{m\acute{a}x} - K_1 \cdot P = \mu_{m\acute{a}x} \left( 1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right) \quad (2.14)$$

Onde  $K_1$  é uma constante empírica e  $P_{m\acute{a}x}$  ( $=\mu_{m\acute{a}x}/K_1$ ) é a concentração de etanol na qual as células não apresentam crescimento.

**- Relação exponencial:**

$$\mu_l = \mu_{m\acute{a}x} \exp(-K_2.P) \quad (2.15)$$

Onde  $K_2$  é uma constante empírica dependente do método de cultivo, batelada ou contínuo.

**- Relação hiperbólica:**

$$\mu_l = \mu_{m\acute{a}x} \left( \frac{1}{1 + P/K_3} \right) \quad (2.16)$$

Onde  $K_3$  é uma constante empírica

**- Relação parabólica:**

$$\mu_l = \mu_{m\acute{a}x} \left( 1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)^{0.5} \quad (2.17)$$

As equações (2.14) e (2.17) não ajustam satisfatoriamente bem aos dados experimentais. As equações (2.15) e (2.16) assumem que o crescimento ocorre e que as células são capazes de produzir etanol indefinidamente. Neste caso  $\mu_l$  se aproxima de zero quando a concentração de produto  $P$  se aproxima de infinito. Na realidade, existe um limite de concentração de etanol na qual cessa o crescimento celular e a formação de produto.

**-Relação não-linear generalizada:**

Levenspiel (1980) propôs a seguinte relação não linear generalizada:

$$\mu_l = \mu_{m\acute{a}x} \left( 1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}} \right)^n \quad (2.18)$$

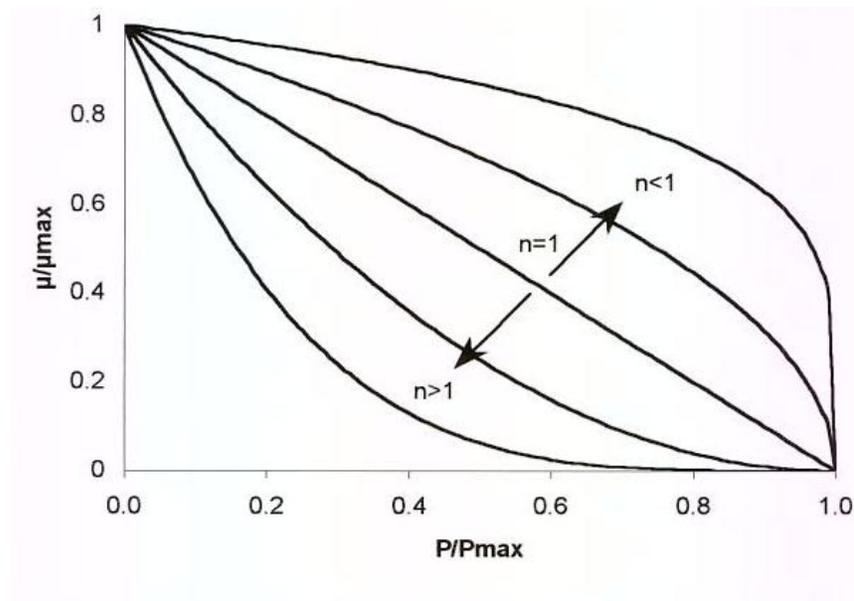
A equação (2.18) vem sendo amplamente utilizada nos últimos anos, pois pode se aproximar das equações (2.14) a (2.17) de várias maneiras. Quando a constante empírica  $n$  for igual a 1, a equação torna-se idêntica à equação (2.14), quando  $n > 1$ , a equação (2.18)

fica semelhante as equações (2.15) e (2.16) e quando  $n < 1$ , se aproxima da equação proposta por Bazua e Wilke (1977), dada pela equação (2.19):

$$\mu_I = \mu_{m\acute{a}x} \left( \frac{a.P}{b-P} \right) \quad (2.19)$$

Onde  $a$  e  $b$  são constantes empíricas.

A Figura 2.6 apresenta um gráfico de  $\mu_I/\mu_{m\acute{a}x}$  plotado contra  $P/P_{m\acute{a}x}$  em função de  $n$ . Pode-se observar que  $\mu_I$  aproxima-se de  $\mu_{m\acute{a}x}$  quando a concentração de etanol se aproxima de zero, ou seja, não existe efeito inibitório no metabolismo celular pronunciado pelo etanol e a equação (2.18) torna-se idêntica a equação proposta por Monod. O crescimento é completamente inibido quando a concentração de etanol se aproxima de  $P_{m\acute{a}x}$ , máxima concentração de etanol em que é observada atividade metabólica celular.



**Figura 2.6**  $\mu_I/\mu_{m\acute{a}x}$  plotado contra  $P/P_{m\acute{a}x}$  em função de  $n$

Luong (1985) propôs uma relação semelhante à não linear generalizada de Levenspiel (1980) para descrever a dependência de  $\mu_l$  com a concentração de produto.

$$\mu_l = \mu_{máx} \left[ 1 - \left( \frac{P}{P_{máx}} \right)^n \right] \quad (2.20)$$

Substituindo a equação (2.18) na equação (2.13), obtém-se a seguinte relação:

$$\mu_l = \mu_{máx} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \left( 1 - \frac{P}{P_{máx}} \right)^n \quad (2.21)$$

A inibição não linear generalizada por produto descrita na Equação (2.21) já foi amplamente utilizada por diversos grupos de pesquisa para avaliar a cinética da fermentação alcóolica durante a produção de etanol 1G (Andrietta, 1994; Alves, 1996; Carvalho, 1996; Atala *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2007). No entanto, o micro-organismo adotado nesta tese como precursor para os experimentos apresenta duplo efeito inibitório, tanto pela concentração inicial de substrato bem como pelo etanol acumulado no meio.

Dessa forma, o modelo proposto para avaliar o efeito inibitório promovido durante o consumo de pentoses por *S. sitipitis*, bem como avaliar a cinética da fermentação alcóolica durante a produção de etanol 2G por esta linhagem, foi o modelo misto de Andrews-Levenspiel, descrito na Equação (2.22). Este modelo considera a concentração de substrato como inibidor exponencial, e uma inibição hiperbólica por produto.

$$\mu_X = \mu_{máx} \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_I}} \left( 1 - \frac{P}{P_{máx}} \right)^n \quad (2.22)$$

O modelo matemático exposto na Equação 2.22 foi avaliado recentemente por Guidine *et al.* (2014) para investigar os efeitos inibitórios da concentração de sacarose e etanol acumulado durante a cinética de produção de etanol 1G no modo batelada alimentada por uma linhagem de *S. cerevisiae* C2/00, com características floculentas, sendo

que o modelo foi capaz de descrever satisfatoriamente as características cinéticas do micro-organismo, apresentando uma boa correlação entre os resultados experimentais e as predições do modelo. Tosetto e Andrieta (2002) também investigaram a aplicação do modelo apresentado na Equação (2.22) para avaliar a cinética de produção de glicerol, obtendo também um bom ajuste do modelo, comprovando assim a aplicabilidade e confiabilidade do modelo proposto.

Slininger *et al.* (1991) aplicaram o modelo descrito na Equação (2.22) para avaliar a dependência da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) em relação às concentrações de xilose e etanol presentes no meio de cultivo realizados com *S. stipitis* NRRL-Y7124. Os autores também investigaram parâmetros cinéticos para avaliar o crescimento e a morte celular, bem como o consumo de oxigênio em cultivos no modo batelada e contínuo, alimentados com um meio sintético rico em xilose. De acordo com os autores, a morte celular é praticamente negligenciável, mesmo em elevadas concentrações de xilose e etanol. Por outro lado, a velocidade específica de crescimento foi inibida tanto pelo substrato quanto pelo etanol. O modelo proposto na Equação (2.22) foi capaz de descrever satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos pelos pesquisadores.

Recentemente Slininger *et al.* (2014), desenvolveu um modelo cinético não estruturado baseado em um sistema linear de equação diferenciais formuladas para descrever o crescimento e produção de etanol como função do etanol, oxigênio e concentração de xilose para ambos estágios de crescimento e fermentação. O modelo foi validado para diversas condições operacionais incluindo batelada, batelada alimentada, reciclo de células e batelada com extração simultânea, sendo que o modelo proposto foi capaz de apresentar boa concordância entre os dados experimentais e os dados simulados pelo modelo independentemente das condições testadas. No entanto, o modelo foi validado apenas para meio sintético, não levando em conta os efeitos inibitórios que podem ocorrer quando se utilizam meios de cultivos com hidrolisados hemicelulósicos.

Como regra geral a aplicação de modelos matemáticos em sistemas que usam meios diferentes daqueles usados em sua formulação requerem a realização de testes experimentais, bem como ajuste de parâmetros do modelo caso ocorra necessidade. É válido mencionar que os parâmetros cinéticos são específicos para cada meio de cultivo aplicado, processo fermentativo, bem como pela linhagem de micro-organismo empregada. Para a obtenção de um modelo confiável e que descreva precisamente o comportamento cinético do processo é necessário realizar a re-estimação destes parâmetros de processo toda vez em que forem alterados as condições de processo (pH, temperatura, agitação e aeração), as linhagens de micro-organismos, ou quando, por exemplo, o meio de cultivo é substituído por substratos alternativos e mais baratos, como é o caso do reaproveitamento de resíduos agrícolas da cultura canavieira (caldo de cana, melaço, bagaço e palha).

Além disso, devido à vantagem potencial do uso de sistemas com retenção de células, como é o caso da tecnologia proposta (retentostato extrativo), uma investigação mais detalhada sobre o impacto da retenção total de células nos parâmetros cinético do processo deve ser avaliada. A investigação das características fisiológicas do micro-organismo em sistemas operados no modo retentostato possibilitará entender o tempo de vida útil de uma grande população de células no sistema. Neste trabalho, os parâmetros cinéticos foram determinados durante o consumo de xilose pelo micro-organismo *S. stipitis* NRRL-Y7124 visando avaliar a cinética da fermentação alcoólica durante a produção de etanol em diferentes configurações operacionais, bem como composição de meio, com intuito de desenvolver um modelo cinético que possa ser aplicado em processos de simulação e otimização focados no atual cenário de produção de etanol 2G no Brasil.

**Referências Bibliográficas**

Aiba, S.; Shoda, M. Reassessment of product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferment. Technol*, 1969, 47:790-794.

Açikalin, K.; Karaca, F.; Bolat, E. Pyrolysis of pistachio shell: Effects of pyrolysis conditions and analysis of products. *Fuel*, 2012, 95:169-177.

Ahmann, D.; Dorgan, J. R. Bioengineering for Pollution Prevention through Development of Biobased Energy and Materials State of the Science Report. National Center for Environmental Research. Whashington, DC, 2007, p.196.

Agbogbo, F. K., & Coward-Kelly, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 2008, 30:1515–1524.

Agbogbo, F.K.; Kelly-Coward, G.; Torry-Smith, M. Wenger, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry*, 2009, 41:2333-2336.

Aguiar, A.; Ferraz, A. Mecanismos envolvidos na Biodegradação de Materiais Lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlativas. *Quimica Nova*, 2011, 34(10): 1729-1738.

Aguilar, R.; Ramírez, J. A.; Garrote, G.; Várquez, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *J. of Food Eng.*, 2002, 55:309-318.

Alexandre, H.; Ansanay-Galeote, V.; Dequin, S.; Blondin, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 2001, 498(1):98-103. [www.intechopen](http://www.intechopen).

Alves, J. G. L. F. Estudo de influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1996. 69p.

Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M.J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 2010, 101:4851-4861.

Amorim, H.V.; Basso, L. C.; Lopes, M. L. Evolution of ethanol production in Brazil in Distilled Spirits – Tradition and Inovation, ed. Bryce, J. H. e Sttewart, G. G. Nottingham Univ. Press (UK), 2004, v.1, 1:143-148.

Amorim, H.V.; Leão, R. M. Fermentação Alcoólica – ciência e tecnologia. Fermentec, Piracicaba, 2005, 448p, ISBN 8599011-0104.

Amorim, H.V. Ethanol production in Brazil: a successful history. *Proceedings of the Sugar Processing Research Conference*, 2006, 1:44–47.

Amorim, H. V.; Lopes, M. L.; Oliveira, J. V. C.; Buckeridge, M. S.; Goldman, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 91:1267-1275.

Amutio, M.; Lopex, G.; Aguado, R.; Artetxe, M.; Bilbao, J.; Olazar, M. Kinetic study of lignocellulosic biomass oxidative pyrolysis. *Fuel*, 2012, 5:305-311.

Andersson, L., Stranberg, L., Haggstrom, L., & Enfors, S. O. Modeling of high cell density fed-batch cultivation. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 14:39-44.

Andrade, R. R. Modelagem Cinética do Processo de Produção de Etanol a partir de Hidrolisado Enzimático de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2012.

Andrews, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 1968, 10:707-723.

Andrietta, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica em escala industrial. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 178 p, 1994.

Antunes, J. G. Bioconversão de D-xilose a etanol por células de *Pichia stipidis*. Dissertação (Mestre em Ciências) – Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, 1997.

Atala, D. I. P. Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo Fermentativo Extrativo de Produção de Etanol. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 172p, 2006.

Arantes, V.; Saddler, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(4).

Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition ed. New York: Mc Graw-Hill, 1986.

Balagurunathan B, Jonnalagadda S, Tan L, Srinivasan R. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*. *Microb Cell Fact.* 2012, 23:11-27.

Balat, M.; Balat, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 2009, 86:2273-2282.

Banerjee, G.; Car, S.; Scott-Craig, J. S.; Hodge, D. B.; Walton, J. D. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover effects of biomass, peroxide and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4:16.

Barbosa, M.F.S.; Medeiros, M.B.; de Mancilha, Y.M.; Schneider, H.; Lee, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal Industry Microbiology*, 1988, 3:241–251.

Barnet, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, O. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press, 433p, 1983.

Basso, L. C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: Bernardes MAS (ed) *Biofuel production-recent developments and prospects*. Intech, Rijeka. 2011, pp 85-100.

Basso, L. C.; Rosa, C.A. Sugar cane for potable and fuel ethanol. In: *Worldwide Distilled Spirits Conference - New Horizons: energy, environment and enlightenment*. Walker GM and Hughes PS (eds). Nottingham: Nottingham University Press, 2010, p.1-7.

Basso, L. C.; Oliveira, A. J.; Orelli, V. F. D. M.; Campos, A. A.; Gallo, C. R.; Amorim, H.V. Dominância de leveduras contaminantes sobre linhagens industriais avaliada pela técnica de carotipagem. *Congresso Nacional de STAB*, 5, Águas de São Pedro, 1993. *Anais*, vol. 1, p.246-250.

Bazua, C.D.; Wilke, C.R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1977, 7:105-118.

Betancur, G.J.V. Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Picchia stipitis*. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, 123p. 2005.

Biely, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Coughlan MP, Hazlewood GP. *Hemicelluloses and hemicellulases*. London, Portland Press, 29-52, 1993.

Bisaria, V. S.; Ghose, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microb. Tech.*, 1981, 3:90-103.

Blanch, H.W.; Clark, D.S. *Biochemical Engineering*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

BNDES, CGEE. *Cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. BNDES, Rio de Janeiro, 2008, p 316.

Bolen, P.L.; Roth, K.A.; Freer, S.N. Affinity purifications of aldose reductase and xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 52(4):660-664.

Braunbeck, O. A.; Cortez, L. A. B. O cultivo da cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: F. Rossillo-Calle, S. V. Bajay, *et al.* *Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira* Campinas-SP, 2005, v., p. 215-246.

Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14:557-577.

Brethauer, S.; Wyman, C.E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13):4862-4874.

Brito, F. Bioprodução de etanol de hidrolisado de bagaço de cana utilizando diferentes formas de operação do bioprocesso. Rio de Janeiro-RJ, 2000. Dissertação (Mestre em Ciências), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Buhner, J.; Agblevor, F. A. Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. *Appl. Bioch. and Biotech.*, 2004, 119:13-30.

Bruinenberg, P.M.; Bot, P.H.M.; Johannes, P.D.; Scheffers, A. The Role of Redox Balances in the Anaerobic Fermentation of Xylsoe by Yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1983, 18:287-292.

Bruinenberg, P.M.; Peter, H.M., van-Dijken, J.P.; Scheffers, W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic fermentation of xylose by yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1984, 19:256-260.

Buaban, B.; Inoue, H.; Tanapongpipat, S.; Ruanglek, V.; Champreda, V.; Pichyangkura, R.; Rengipipat, S.; Eurwilaichitr, L. Bioethanol production from ball-milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *J. of Biosc. and Bioeng.*, 2010, 110(1), 18-25.

Buchanan, B.B.; Grissem, W.; Jones, R.L. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, 2004, 1387p.

Canilha, L; Carvalho, W.; Felipe, M. G. A.; Silva, J. B. A. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: Hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, 39:333-336.

Capunitan, J. A.; Capareda, S. C. Assessing the potential for biofuel production of corn stover pyrolysis using a pressurized batch reactor. *Fuel*, 2012, 95:563-572.

Cardona, C.A.; Sánchez, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 2007, 98:2415-2457.

Carvalho, F.; Duarte, L. C.; Gírio, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J. Sci. Ind. Res*, 2008, 67:849–864.

Carvalho, B. S. Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 83p, 1996.

Caufrier, F.; Mertinou, A.; Dupont, C.; Bouriotis, V. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr Res*, 2003, 338(7): 687-692.

Cerqueira-Leite, R. C.; Leal, M. R. L. V.; Cortez, L. A. B.; Griffin, W. M.; Scandiffio, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy*, 2009, 34:655-661.

Chaddad, F. R. UNICA: challenges to deliver sustainability in the Brazilian sugarcane industry. *International Food and Agribusiness Management Review*, 2010, 13:173-192.

Champagne, P. Bioethanol from agricultural waste residues. *Environmental Progress*, 2008, 27:51-57, 2008.

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

Cho, Y. H., Song, J. Y., Kim, K. M., Kim, M. K., Lee, I. Y., Kim, S. B., Kim, H. S., Han, N. S., Lee, B. H., & Kim, B. S. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *New Biotechnology*, 2010, 27:341-346.

Chriten, P.; Miner, M.; Renon, H. Ethanol extraction by supported liquid membrane during fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 36:116-123.

Ciência, J.D. CTC busca elevar escala de etanol celulósico. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=78253>>. Acesso em: 20 de setembro. 2014.

Correia, M.F. Produção de bioetanol a partir de licor de cozimento ao sulfito ácido. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 98p., 2008.

Cortez, L. A. B.; Lora, E. E. S.; Ayarza, J. A. C. Biomassa no Brasil e no mundo. In: L. A. B. Cortez, E. E. S. Lora, *et al.* Biomassa para energia Campinas-SP, 2008a v., 15-29.

Cortez, L. A. B.; Lora, E. E. S.; Gómez, E. O. Caracterização da biomassa. In: L. A. B. Cortez, E. E. S. Lora, *et al.* Biomassa para energia Campinas-SP, 2008b, v., 31-59.

Cortez, D.V. Permeabilização de Células de *Candida guilliermondii* empregando processos químicos e físicos e seu potencial uso como biocatalisadores na síntese de xilitol. 125p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2010.

Crepin, V.F.; Faulds, C.B.; Connerton, I.F. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63(6): 647-652.

Cruz, J. M.; Dominguez, J. M.; Dominguez, H.; Parajo, J. C. Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 1999, 67:147-153.

Cysewski, G.R.; Wilke, C.R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 1978, 20(9):1424-1444.

Daugulis, A.J.; Axford, D.B.; Ciszek, B.; Malinowski, J.J. Continuous fermentation of high-strength glucose feeds of ethanol. *Biotechnology Letters*, 1994, 16(6):637-42.

Davis, L.; Jeon, Y. J.; Svenson, C.; Rogers, P.; Pearce, J.; Peiris, P. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, 2005, 29:49-59.

Della-Bianca, B. E.; Basso, T. O.; Stambuk, B. U.; Basso, L.C.; Gombert, A.K. What do we know about the yeast stains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013a, 97(3):979-991.

Dias, M.O.S.; Junqueira, T.L.; Jesus, C.D.F.; Rossel, C.E.V.; Maciel, R.M.; Bonomi, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energy*, 2012, 43:246-252.

Dien, B. S.; Bothast, R. J. A primer for lignocellulose biochemical conversion to fuel ethanol. *In: The Alcohol Text Book* (5th edition), Ingledew, WM, Kelsall, DR, Austin, GD and Kluhspsies, C (ed.), Nottingham University Press, Nottingham, 2009.

Doherty, W.O.S.; Mousavioun, P.; Fellows, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*, 2011, 33:259-276.

du Preez, J.C., Bosch, M., Prioir, B.A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1986, 23:228–233.

du Preez, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbiology Technology*, 1994, 16:944-952.

Dumsday, G.J.; Jones, K.; Stanley, G.A.; Pamment, N.B. Recombinant organisms for ethanol production from hemicellulosic hydrolyzates – A Review of Recent Progress. *Australasian Biotechnology*, 1997, 7(4):285-295.

Dunn, I.J.; Heinzle, E.; Nigham, J.; Prenosil, J.E. *Biological Reaction Engineering*, VCH, 1992.

Dutta, R. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. New Delhi, India: Ane Books India, 2008.

Eliasson, A.; Christensson, C.; Wahlbom, F.; Hahn-Hägerdal, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XYS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(8):3381-3386.

Farias, D.; de Andrade, R.R.; Maugeri, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 172(1):361-79.

Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

Fu, N.; Peiris, P.; Markahm, J.; Bavor, J. A novel co-culture process with *Zymomonasmobilis* and *Pichiastipitis* for efficient ethanol production in glucose/xylose mixtures. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2009, 45:210–217.

García-Cubero, M. T.; González-Benito, G.; Indacochea, I.; Coca, M.; Bolado, B. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*, 2009, 100:1608-1613.

Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresouce Technology*, 2010, 101:4775-4800.

Godoy, A.; Amorim, H.V.; Lopes, M.L.; Oliveira, A.J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*, 2008, 110(1311):175-182.

Goldemberg, J. *The Brazilian Biofuel Industry*. *Bicotechnology for Biofues*. 2008, 1:6.

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

Grzenia, D. L.; Schell, D. J.; Wickramasinghe, S. R. Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. *Journal of Membrane Science*, 2008, 322:189-195.

Guerra, S.M.G.; Cortez, L.A.B.; *Biomass & energy: a historical trend in Brazil*, Proceedings of the World Renewable Energy Congress. Reading, UK, 13-18, September, 1992.

Guidini, C. Z.; Marquez, L. D. S.; Silva; H. A.; Resende, M. M.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E; J. Alcoholic fermentation with flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch process. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172:1623-1638.

Hahn-Hagerdal, B.; Jeppsson, H.; Skoog, K.; Prior, B. A. *Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts*. *Enzyme Microbiology and Technology*, 1994, 16:933-942.

Hamelinck, C. N.; Hooijdonk, G. V.; Faaij, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 2005, 28:384-410.

Hamacher, T.; Becker, J.; Gárdoyi, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Boles, E. Characterization of the xilose-transporting properties of yeast hexosetransporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology*, 2002, 148:2783-2788.

Harun, R.; Danquah, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry*, 2010, 46:304-309.

Hinman, N.D., Wright, J.D., Hoagland, W., Wyman, C.E. Xylose Fermentation: An Economic Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1989, 20/21:391-401.

Hiss, H. Cinética de processos fermentativos. In: W. Schmidell, U. A. Lima, *et al.* *Biotecnologia Industrial* São Paulo, 2001, v. 2, p. 93-122.

Hong, J. Optimal substrate feeding policy for a fed batch fermentation with substrate and product inhibition kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28:1421–1431.

Huang, H., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. *Bioproc Biosyst Eng*, 2004, 27:63–69.

Hughes, S.R.; Gibbons, W.R.; Bang, S.S.; Pinkelman, R.; Bischoff, K.M.; Slininger, P.J.; Qureshi, N.; Kurtzman, C.P.; Liu, S.; Saha, B.C.; Jackson, J.S.; Cotta, M.A.; Rich, J.O.; Javers, J.E. Pandom UV-C mutagenesis of *Scheffersomyces* (formerly *Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 to improve anaerobic growth on lignocellulosic sugars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2012, 39:163-173.

Ihida, K.; Shimizu, K. Novel Repeated Batch Operation for *Flash* Fermentation System: Experimental Data and Mathematical Modelling. *J. Chem. Tech. Biotechomol.*, 1996, 66:340-46.

Jeffries, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1983, 27:1–32.

Jeffries, T.W. Engineering yeast for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, London, 2006, 17:320-326.

Jeffries, T.W.; Grigoriev, I.V.; Grimwood, J.; Laplaza, J.M.; Aerts, A.; Salamov, A.; Schmutz, J.; Lindquist, E.; Dehal, P.; Shapiro, H.; Jin, Y.; Passoth, V.; Richardson, P.M. Genome sequence of lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(3):319-326.

Jeffries, T.W.; Van Vleet, J. R. H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.*, 2009, 9:793-807.

Jin, Y.S.; Laplaza, J.M.; Jeffries, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70:6816-6825.

John, R.P.; Anisha, G.S.; Nampoothiri, K.M.; Pandey, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 2011, 102:186-193.

Kabel, M. A.; Bos, G.; Zeevalking, J.; Voragen, A. G. J.; Schols, H. A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*, 2007, 98(10):2034-2042.

Karimi, K.; Kheradmandinia, S.; Taherzadeh, M.J. Conversion of rice straw to sugars by dilute acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 2006, 30:247-253.

Kastner, J.R.; Ahmad, M.; Jojnes, W.J.; Roberts, R.S. Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 45:224-228.

Kootstra, A. M. J.; Beeftink, H. H.; Scott, E. L.; Sanders, J. P. M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2:31.

Krishnan, M.S.; Blanco, M.; Shattuck, C.K.; Nghiem, N.P.; Davison, B.H. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonasmobilis*CP4(pZB5). *Appl.Biochem.Biotechnol.*, 2000, 86:525–541.

Krishnan, C.; Sousa, L.C.; Jin, M.; Chang, L.; Dale, B.E.; Balan, V. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107:441-450.

Kuhad, R.C.; Sing, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1993, 13(2):151-172.

Kurtzman CP, and Suzuki M: Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Bajejiella*, *Meyeroozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 2010, (51):2-14.

Laplace, J.M.; Delgenes, J.P.; Moletta, R.; Navarro, J.M. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* – oxygen requirement as key factor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 36(2):158-162.

Lau, M. W.; Dale, B. E. Cellulosic Ethanol Production from AFEX-treated Corn Stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(5):1368- 1373.

Lavarack, B. P.; Griffin, G.J.; Rodman, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xilose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, 2002, 23:367-380.

Lee, N.; Patrick, J.W.; Masson, M. Crystalline L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1968, 243(18):4700-4705.

Lee, W. G.; Lee, J. S.; Shin, C. S.; Park, S. C.; Chang, H. N.; Chang, Y. K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 77(79):547-559.

Lemos, J. L. S. Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

Levenspiel, O. The Monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnology and Bioengineering*, 1980, 22:1671-1687.

Li, K.; Azadi, P.; Collins, R.; Tolan, J.; Kim, J.S.; Eriksson, K.L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enz Microb Technol*, 2000, 27: 89-94.

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

Lin, Y.; Tanaka, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006, 69:627-642.

Luedeking, R.; Piret, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation : batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, 1959, 1:393-412.

Luong, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 27(3): 280-285.

Mariano, A. P.; Costa, C.B.B.; De Angelis, D.D.F.; Maugeri Filho, F.; Atala, D.I.P.; Wolf Maciel, M.R.; Maciel Filho, R. Optimisation of a continuous flash fermentation for butanol production using the response surface methodology. *Chemical Engineering Research and Design*, 2010, 88(5-6):562-571.

Marioella, B.L.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 1984, 26(9):1003-1025.

Marques, F. Bagasse is the Target. *Pesquisa FAPESP, Special Issue*, 2011, 32-36.

Martin, C.; Marcet, M.; Almazán, O.; Jönsson, L. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, 2007, 98(9):1767-1773.

Matsushika, A.; Inoue, H.; Kodaki, T.; Sawayama, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 84:37-53.

Mcintosh, S.; Vancov, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35:3094-3103

Men, X.; Yang, X.; Tian, S. Ethanol production from non-detoxified steam-exploded corn stover subsequent enzymatic hydrolysis by two toxin-tolerant yeast strains. *Advanced Materials Research*, 2012, 365:145-149.

Milessi, T.S.S. Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta. Lorena-SP. 148p. Dissertação (Mestre em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

Millati, R.; Edebo, L.; Taherzadeh, M.J. Performance of *Rhizomucor*, *Mucor* in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 3(4):1020-1029.

Miranda Júnior, M.; Batistote, M.; Cilli, E.M.; Ernandes, J.R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. *J. Inst. Brew*, 2009, 115(3):191-197.

Monod, J. *Recherches sur La Croissance des Cultures Bacteriennes*. Hermann & Cie., Paris, 1942.

Mosier, N.; Hendrickson, R.; Ho, N.; Sedlak, M.; Ladisch, M. R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18):1986-1993.

Mussato, I.S.; Roberto, I.C. Produção Biotecnológica de Xilitol a partir de palha de arroz. *Biociência & Desenvolvimento*. 2002, 28:24-39.

Mussato, S. I.; Dragone, G.; Guimarães, P. M. R.; Silva, J. P. A.; Cameiro, L. M.; Roberto, I. C.; Vicente, A.; Domingues, L.; Teixeira, J. A. Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 2010, v.28, p.817-830.

Nakamura, Y.; Sawada, T.; Inoue, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001, 76:586-592.

Nigam, N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. of Biotech.*, 2001, 87:17-27.

Nigam, P.S.; Singh, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2011, 37:52-68.

Nor, Z. M., Tamer, M. I., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Jervis, E. J. Automated fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis* based on a novel method for on-line estimation of cell specific growth rate. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 9:221-231.

Oliveira, F.P. Avaliação da Aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares. Rio de Janeiro-RJ, 2010. 141p, Dissertação (Mestre em Ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Olsson, L; Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. *Enzyme Microbial Technology*, 1996, 18:312-331.

Pacheco Chavez, R. A., Tavares, L. C., Teixeira, A., Carvalho, J., Converti, A., & Sato, S. Influence of the nitrogen source on the productions of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase by a new *Trichoderma sp.* from soluble starch. *Chem Biochem Eng*, 2004, 18:403-407.

Pacheco, T.F. Produção de etanol: Primeira ou Segunda Geração? Embrapa Agroenergia, 2011, ISSN 2177-4420.

Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Zacchi, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19:470-476.

Parajó, J.C.; Dominguez, H.; Domingues, J.M. Biotechnological Production of xilitol. Part I: Interest of xilitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*. 1998a, 65(3):191-201.

Parajó, J. C.; Dominguez, H.; Dominguez, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates. *Bioresource Technology*, Essex, 1998b, 66:25-40.

Parawira, W.; Tekere, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31:20-31.

Pereira Jr., N. Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D. Thesis, Department of Chemistry, The University of Manchester, U.K., 1991.

Polizeli, M.L.T.M.; Rizzatti, A.C.S.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67: 577-591.

Rabelo, S. C.; Amezquita Fonseca, N. A.; Andrade, R. R.; Maciel Filho, R.; Costa, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(7):2600-2607.

RFA (2013) Renewable Fuels Association. *In: Statistics*. Acessado em 28/02/2014. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>.

Ramalingham, A.; Fin, R.K. The vacuform process: A new approach to fermentation alcohol. *Biotechnology and Bioengineering*, 1977, 19:583-589.

Ravindranath, N.H.; Lakshmi, C.S.; Manuviel, R.; Balachandra, P. Biofuel production and implications for a land use, food production and environment in India. *Energy Policy*, 2011, 39:5737-5745.

Riesenberger, D. High-cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1991, 2:380-384.

Roberto, I. C.; Lacerda, L. S.; Barbosa, M. F. S.; Mancilha, I.M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production of Ethanol. *Process Biochemistry*, 1991, 26:15-21.

Rocha, G. J. M.; Gonçalves, A. R.; Oliveira, B. R.; Olivares, E. G.; Rossel, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 35, n. 1, p. 274-279, 2012.

Rodrigues, R. C. L. B.; Rocha, G. J. M.; Rodrigues Jr. D.; Filho, H. J. I., Felipe, M. G. A.; Pessoa Jr., A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). *Bioresource Technology*, 2010, 101:1247-1253.

Rosa, C.A.; Peter, G. In the *Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 2006.

Rosemberg, S.L. Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enzyme Microbial Technology*, 1980, 2:1985-1993.

Rossel, C.E.V. Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol. *Industrial Perspectives for Bioethanol*. Ed. Telma Franco. Cap. 8, p.123-142, 2006.

Rouhollah, H.; Iraj, N.; Giti, E.; Sora, A. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae* and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their co-cultures. *African J. Biotechnol.*, 2007, 6:1110–1114.

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

Rizzi, M.; Harwart, K.; Erlemann, P.; Bui-Thahn, N-A.; Dellweg, H. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup> xyliol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* 1989, 67:20-24.

Rubin, E.A. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 2008, 454:841-845.

Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42:160-166.

Saha, B. C. Hemicellulose bioconversion. *J. of Ind. Microb. and Biotech.*, Amsterdam, 2003, 30:279-291.

Saha, B. C.; Hayashi, K. *Lignocellulose biodegradation*. New Orleans: American Chemical Society, 2004, 315p.

Saha, B.; Cotta, M.A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology progress*, 2006, 22:449-453.

Sanda, T.; Hasunuma, T.; Matsuda, F.; Kondo, A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17):7917-7924.

Santos, A. L. F.; Kawase, K. T. Y. F.; Coelho, G. L. V. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011, 56(3):277-282.

Santos, J. R. A.; Lucena, M. S.; Gusmão, N. B.; Gouveia, E. R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 2012, 36(1):584-588.

Saritha, M.; Arora, A.; Nain, L. Pretreatment of paddy straw with *Trametes hirsute* for improved enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 2012, 104:459-465.

Sarkar, N.; Ghosh, S.K.; Bannerjee, S.; Aikat, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, 2012, 37:19-27.

Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. Blucher, São Paulo, 2001.

Silva, J.P.A. Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 146p., 2001.

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

Silva, A. S.; Inoue, H.; Endo, T.; Yano, S.; Bom, E. P. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 2010, 101:7402-7409.

Silva, J.P.A.; Mussatto, S.L.; Roberto, I.C.; Teixeira, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, v.37 p.259-265, 2012.

Sims, R.E.H.; Mabee, W.; Saddler, J.N.; Taylor, M. An overview of second generation biofuel technology. *Bioresource Technology*, 2010, 101:1570-1580.

Sinclair, C.G.; Kristiansen, B. *Fermentation Kinetics and Modeling*. Open University Press, Grã-Bretanha, 1987.

Siquiera, E.P.F. Efeito da temperatura na cinética da fermentação alcoólica com alta densidade celular. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 87p., 1997.

Siquiera, E. P. F. Efeito da temperatura na cinética da fermentação alcoólica com alta densidade celular. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 87p., 1997.

Sivers, M. V.; Zacchi, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*, Essex, 1995, 51:43-52.

Slininger, P.J.; Bothast, R.J.; Ladisch, M.R.; Okos, M.R. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35:727-731.

Slininger, P. J.; Branstrator, L. E.; Lomont, J. M.; Dien, B. S.; Okos, M. R.; Ladisch, M.R.; Bothast, R.J. Stoichiometry and Kinetics of Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. 1990, 589:25-40.

Slininger, P. J.; Dien, B. S.; Lomont, J. M.; Ladisch, M. R.; Okos, M. R. Evaluation of a Kinetic Model for Computer Simulation of Growth and Fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Fed D-xylose, *Biotech. and Bioeng.*, 2014, DOI 10.1002/bit.25215.

Squina, F.M.; Prade, R.A.; Wang, H.; Murakami, M.T. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of an endo-1,5-alpha-L-arabinanase from hyperthermophilic *Thermotoga petrophila*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2010, 65:902-905.

Subramanian, S.; Prema, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol*, 2002, 22(1): 33-64.

Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolyses of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 2002, 83:1-11.

Sun, Y.; Cheng, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 2005, 96:1599-1606.

Sun, F. H.; Li, J.; Yuan, Y. X.; Yan, Z. Y.; Liu, X. F. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsute* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2011, 65:931-938.

Sunitha, K.; Lee, J. K.; Oh, T. K. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, 1999, 21:477-481.

Taherzadeh, M.; Karimi, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(9):1621-1651.

Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3a ed. Editora Atmed, Porto Alegre, 2004, 722 p.

Taniguchi, M.; Tohma, T.; Itaya, T.; Fujii, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, 83(4):364-370.

Tenkanen M, Siika-Aho M. An alpha-glucuronidase of *Schizophyllum commune* acting on polymeric xylan. *J Biotechnol*, 2000, 78(2): 149–161.

Thomas, D.S.; Hossack, J.A.; Rose, A.H. Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 1978, 117(3):239-245.

Timilsina, G.R.; Shrestha, A. How much hope should we have for biofuels? *Energy*, 2011, 36:2055-2069.

Tosseto, G.M.; Andrietta, S.R. Influência da matéria prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Apresentado no VII Seminar on Enzymatic Hidrolusis Biomass – SHEB, Maringá.

Tsigie, Y.A.; Wang, C.Y.; Truong, C.T.; Ju, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Polg grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, 2011, 102:9216-9222.

Unrean, P.; Nyugen, N.H. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces stipitis*: Effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2012a, 94:1387–1398.

Unrean, P., & Nguyen, N. H. Rational optimization of culture conditions for the most efficient ethanol production in *Scheffersomyces stipitis* using design of experiments. *Biotech Prog.* 2012b, 28:1119–1125.

Unrean P, Nguyen NHA: Optimized Fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013, (169):1895-1909.

Vásquez, M. P.; da Silva, J. N. C.; da Souza Jr., M. B.; Pereira Jr., N. (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Appl. Biochem. and Biotech.*, 2007, 12:137-140.

Verinium – The nature of energy. (2008). Energy independence and security act of 2007 (EISA).

Verduyn, C.; Van Kleef, R.; Frank, J.; Schreuder, h.; van Dijken, J.P.; Scheffers, W.A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.* 1985, 226:669-677.

Xiong, W.; Li, X.; Xiang, J.; Wu, O. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. *Applied Microboly and Biotechnology*, 2008, 78:29-36.

Zanin. G.M.; Santana, C.C.; Bon, E.P.S., Giordano, R.C.L. de Moraes, F.F.; Andrietta, S.R.; Neto, C.C.D.; Macedo, I;C;; Fo, D.L., Ramos, L.P. Brazilian bioethanol program. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, 84-86.

Zhang, S.; Xu, Y.; Hanna, M. Pretreatment of Corn Stover with Twin-Screw Extrusion Followed by Enzymatic Saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(2):458-469.

Zheng, Y.; Lin, H. M.; Tsao, G. T. Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(6):890-896.

Zhao, X.; Zhang, L.; Liu, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery*, 2012, 6:465-482.

Yang, V. W.; Jeffries, T. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting *Candida shehatae*. *Appl. Biochem. Biotech.* 1990, 26:197-206.

Wang, W.; Yuan, T.; Wang, K.; Cui, B.; Dai, Y. Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*. *Bioresource Technology*, 2012, 107:282-286.

Wyman, C.E. Biomass Ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*, 1999, 24:189-226.

Wyman, C. E. Ethanol production from lignocellulosic biomass: Overview. In: C. E. Wyman. *Handbook on bioethanol: Production and Utilization*. Washington, D. C, 1996. v., p. 1-18



## CAPÍTULO 3

### **3. Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose**

Este capítulo está apresentado na forma de artigo científico ('Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose') o qual foi publicado na revista "*Applied Biochemistry and Biotechnology*", 2014, 172(1):361-79. O artigo apresenta o desenvolvimento de um modelo matemático, considerando os efeitos inibitórios da concentração inicial de substrato e etanol acumulado no meio, para a determinação dos parâmetros cinéticos de cultivo da linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124 visando produção de etanol 2G.



### 3. Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose

Daniele Farias<sup>1\*</sup>, Rafael R. de Andrade<sup>2</sup>, Francisco Maugeri-Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Food Engineering, University of Campinas, CEP: 13083-862, Campinas-SP, Brazil

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, University of Campinas, CEP: 13083-852, Campinas-SP, Brazil

#### ABSTRACT

This work focuses the kinetics of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* on xylose with the development of a mathematical model considering the effect of substrate and product concentrations on growth rate. Experiments were carried out in batch and continuous modes, with substrate concentration varying from 7.2 to 145 g.L<sup>-1</sup>. Inhibitory effects on cell growth, substrate uptake and ethanol production rates were found to be considerable. Kinetic parameters were obtained through linear and non-linear regression methods. Experiments in continuous mode were performed at different dilution rates to evaluate the inhibitory effect of ethanol. A mixed mathematical model which combined Andrews and Levenspiel's models, combining substrate and product inhibition was used. A Quasi-Newton (QN) routine was applied to obtain a more accurate fitting of kinetic parameters. The parameters such as cell to product factor ( $Y_{P/X}$ ) and limiting cell yield ( $Y_X$ ) showed to be dependent on substrate concentration. The kinetic model fitted satisfactorily the experimental data.

**Keywords:** ethanol fermentation, *Scheffersomyces stipitis*, kinetic parameters estimation, mathematical modeling.

#### List of symbols

AA	acetic acid concentration (g.L <sup>-1</sup> )
$K_i$	substrate inhibition coefficient (g.L <sup>-1</sup> )
$K_S$	substrate saturation parameter (g.L <sup>-1</sup> )
$m_X$	maintenance coefficient (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
n	parameter describing product inhibition
P	product concentration (g.L <sup>-1</sup> )
$P_f$	final ethanol concentration (g.L <sup>-1</sup> )
$P_{max}$	maximal product concentration when cell growth ceases (g.L <sup>-1</sup> )
S	substrate concentration (g.L <sup>-1</sup> )
$S_0$	initial substrate concentration (g.L <sup>-1</sup> )
$S_f$	final substrate concentration (g.L <sup>-1</sup> )
$S^*$	substrate concentration at which the measured specific growth rate is maximum (g.L <sup>-1</sup> )
X	biomass concentration (g.L <sup>-1</sup> )
Xy	xylytol concentration (g.L <sup>-1</sup> )

$X_{Yf}$	final xylitol concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$t_T$	fermentation total time (h)
$X_0$	initial biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X_f$	final biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$D$	dilution rate ( $\text{h}^{-1}$ )
$r_P$	ethanol production rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$r_S$	substrate uptake rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$r_X$	cell growth rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$Y_{P/X}$	cell to product conversion factor ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_X$	limiting cell yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	biomass yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	ethanol yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$\mu_{\max}$	maximum specific growth rate as described by Monod's model ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\max}^*$	the maximum specific growth rate related to each initial substrate concentration ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_X$	specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_S$	specific substrate uptake rate ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_P$	specific ethanol production rate ( $\text{h}^{-1}$ )

### 3.1. Introduction

Ethanol can be produced from different substrates containing fermentable sugars, such as agricultural products and food-processing wastes. However, the cost of substrates must be low to increase the economic viability of the process in large scale (1). Lignocellulosic biomass represents an abundant renewable energy source, besides it does not compete with food supply, being considered an ideal substrate for bioethanol production (2, 3, 4). However, while technologies for first generation ethanol (from sugarcane juice, molasses, or starch) are well established, the ones for second generation ethanol are still under development around the world (5, 6).

Lignocellulosic raw material is composed by cellulose, hemicellulose and lignin. Xylose is the main sugar obtained from the hydrolysis of hemicellulosic portion, and the efficient conversion of this component is one of the major issues in the use of lignocellulosic raw material for second generation ethanol production, leading to an estimated increasing of 25% in ethanol production (5, 7). Thus, appropriated microorganism cultivation for each type of sugar must be considered, taking into account that the *Saccharomyces cerevisiae*, the most commonly yeast applied in ethanol production, is unable to ferment xylose, which limits its use for biofuels production from lignocellulosic material (3, 4).

*Scheffersomyces stipitis* (former *Pichia stipitis*) is considered a promising microorganism for industrial applications due to its capability to ferment xylose and other important hexoses (glucose, mannose, galactose and cellobiose) found in lignocellulosic material (5, 8), with relatively high yield. The main drawback is its low ethanol tolerance (9, 10). It is well known that the efficiency of fermentative processes is affected by culture media and operational conditions and that different strains require specific nutrient sources to efficiently convert sugar into target products. Nutrients such as nitrogen, trace elements or vitamins can be required to achieve a rapid fermentation and high levels of ethanol,

which are desired to reduce capital costs and energy requirement in the distillation step (11). For *S. stipitis*, oxygen availability is considered the major factor that affects the efficiency of xylose conversion into ethanol. The ability of *S. stipitis* to metabolize xylose is strongly related to oxygen concentration in the medium, which must be controlled at microaerophilic conditions to avoid the deviation of the carbon flux to cellular growth (in detriment of ethanol formation), which becomes the process unfeasible (12, 13, 14).

There is an intensified interest in the study of all the steps involved in ethanol production to obtain cost reductions, and the kinetic modeling of the process helps the understanding of the process as well as its optimization (15). Besides, modeling may reduce the process costs of alcoholic fermentation development, eliminating unnecessary experimental work because it allows the study of operational conditions and related conversion and kinetic parameters through simulations. It may help also the understanding of the whole process, which is useful to define operational conditions. Four main factors affect the fermentative process of ethanol production: substrate limitation and inhibition, ethanol inhibition and cellular death. However, nowadays no proposed model in the literature takes into account all these factors simultaneously, but only each factor separately (1). Due to this, the main goal of this work was to develop a mixed mathematical model capable of describing cell, substrate and ethanol concentrations during microaerophilic fermentation conditions in a fermentative process for ethanol production from xylose by *S. stipitis* NRRL-Y7124.

## 3.2. Materials and Methods

### 3.2.1. Microorganism and culture media

The microorganism used was *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124, stored for long periods in glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$  (16). The strain maintenance for short periods was performed through propagation in slants, composed by GYMP media:  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar nutrient (NA),  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  glucose,  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  yeast extract,  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  malt extract and  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  monobasic sodium phosphate. The slants were stored in refrigerator. The culture media for microorganism activation consists of two steps:

- Medium I: GYMP, during 24 hours for reactivation of microorganism maintained in slants;

- Medium II: medium composed by xylose,  $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; yeast extract,  $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; malt extract,  $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and trace elements,  $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH 4.5. The solution of trace elements is composed by ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{B}_3$ , 0.05;  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.25;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3;  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.19;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.025;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.025;  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.035;  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.9.

The media were sterilized in an autoclave for 15 min at  $121^{\circ}\text{C}$ . The solutions of xylose,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  were sterilized separately and aseptically added to the system, according to each defined concentration. *S. stipitis* was incubated in shaken flasks, at 150 rpm for 24 hours, at  $28^{\circ}\text{C}$  in GYMP medium (medium I) and during 24 hours at  $28^{\circ}\text{C}$  in mineral medium (medium II). The assays were performed using a defined medium

containing pure xylose in order to study the fermentation performance and to perform the kinetic modeling.

### 3.2.2. Experiments

#### 3.2.2.1 Batch Fermentations

The study about the effect of substrate concentration on the kinetic parameters ( $\mu_{max}$ ,  $K_S$  and  $K_I$ ) was carried out in batch mode. The xylose concentration ranged from 7.2 to 145 g.L<sup>-1</sup>. Mini-bioreactors of 1 L, with 800 mL working volume, at 28°C, 150 rpm and microaerated at 0.05 vvm were used. The media pH was adjusted to 4.5 using previously sterilized solutions of NaOH 2N and HCl 2N. Samples were taken periodically for analytical determinations. The mini-fermentors were autoclaved for 15 minutes at 121°C.

#### 3.2.2.2. Continuous Fermentation

The continuous fermentation were carried out in a Bioflo III System bioreactor (New Brunswick Co.), with 3 L total volume, and 2.5 L working volume, at 28 °C, pH 4.5, 150 rpm and 0.05 vvm, with dilution rates varying from 0.008 h<sup>-1</sup> to 0.150 h<sup>-1</sup>.

Xylose concentration in the bioreactor feed stream was 95 g.L<sup>-1</sup>. Samples were taken routinely to check the steady-state. The fermentation was considered in steady-state condition when the cell concentration reached a permanent value. Besides, a turbidimeter coupled to the fermentation vessel was also an important source of information for this purpose. After steady-state had been reached, samples were taken periodically. Cell viability, measured by methylene blue staining technique (17) was higher than 90% for all experiments.

### 3.2.3 Analytical Determinations

The measurement of cell growth was performed by: (a) optical density measurement (OD) at 600 nm and (b) gravimetric determination of biomass concentration (dry weight), after centrifuging the cells at 10.000 rpm for 10 min in Eppendorfs tubes, washing and drying the precipitate at 70 °C to obtain constant weight. The biomass concentration was calculated by the weight difference divided by the sample volume.

Concentrations of xylose, xylitol, acetic acid, glycerol and ethanol were measured by an ultra high performance liquid chromatograph (UPLC), model Accela, ThermoScientific. The column was a HyperREX XP model, maintained at 30°C. The eluent was a solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 2.6, 1.0 mL.min<sup>-1</sup>. Sugars and alcohols were detected by refractive index (RI), and acetic acid by UV at wavelength 205 nm. For standards, a mixed solution of the components for concentrations ranging from 0.01 to 4 % was used. The software Chromoquest was used to integrate and quantify the results.

### 3.2.4 Kinetic Parameters

In fermentation processes, the determination of specific rates of growth ( $\mu_x$ ), production ( $\mu_p$ ) and consumption ( $\mu_s$ ) were taken into consideration and calculated according to equations 1 to 3.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \left( \frac{dX}{dt} \right) \quad (1)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (2)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \left( \frac{dP}{dt} \right) \quad (3)$$

To evaluate the influence of substrate in microorganism growth, the values of  $K_s$  and  $\mu_{max}$  were calculated according to Monod equation, applying the linearization method of Lineweaver-Burk (Eq.4).

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (4)$$

To evaluate the kinetics of substrate inhibition, given by  $K_I$  parameter, equation 5 (Andrews' model) and equation 6 were applied.

$$\mu_{max} = \frac{S}{K_s + S + (S^2/K_I)} \quad (5)$$

$$S^* = \sqrt{K_s K_I} \quad (6)$$

The biomass yield based on substrate ( $Y_{X/S}$ ), and ethanol yield based on substrate ( $Y_{P/S}$ ) were defined by equations 7 and 8.

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (7)$$

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (8)$$

### 3.2.5 Mathematical Modeling

In this work, a deterministic approach was considered on the base of unstructured models such as the Levenspiel and Andrews's ones. Such approach is very convenient for

process control and scale-up, because it is simple, it doesn't demand intensive computing work and useful for a variety of processes, mainly for bioethanol production.

More recently, other approaches have been proposed for ethanol production modeling by *Scheffersomyces stipitis*, such as the genome scale metabolic models (GEMs), which represents the link between the genotype and phenotype of the microorganism, based on the genome sequence annotation and relevant biochemical and physiological information. These models have the ability to provide a holistic view of the metabolism of a microorganism. Once experimentally validate, these models can be used to characterize the metabolic resource allocation, generate experimentally testable predictions of cellular phenotypes, elucidate metabolic network evolution scenarios, design experiments that most effectively reveal the genotype-phenotype relationships, and design microorganism with desired properties like overproduction of ethanol (18).

Moreover, the use of dynamic flux balance models which is a technique based on the metabolic fluxes of the cells and uses linear programming subjected to constraints to find an optimal condition through an objective function (19). This technique enables, through computer simulation, the evaluation of the impact of several strategies to increase ethanol production, such as genetic modification, metabolic engineering, co-culture of strains, different substrate composition and others. Dynamic flux balance models could also help, together kinetic models and GEMs, describing *S. sipitis* metabolism assisting in the estimation of substrate uptake kinetic parameters by estimating of the best microaerobic growth conditions and can reveal the key metabolic details of how different oxygen supplies caused metabolism shift, providing efficient utilization of xylose and high ethanol yields (20).

Although dynamic flux balance models have been considered a powerful technique, it can require deep knowledge about the metabolic pathways (if a genome scale modeling is used) and models which can be sufficient complex depending on the biological systems and number of reactions defined by the model (21). Also, it is well-known that complexes models can lead to great computation efforts for simulation. In additions, simpler approaches in kinetic models can lead to valuable results and aid in decision making in industrial plants.

On the other hand, the dynamic description of ethanol fermentation using unstructured models can be carried out basically with 3 differential equations for microorganism growth, substrate uptake and ethanol formation, (Eqs. 9-11), which can be obtained from the mass balance in the reactor.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (9)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (10)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (11)$$

where  $X$ ,  $S$  and  $P$  are the concentration of cells, substrate and ethanol, respectively.

The rates of cell growth,  $r_x$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), substrate uptake,  $r_s$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) and product formation,  $r_p$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), can be expressed by a non-structured model for the process in batch mode, as it was performed in this work. The dead cells were not taken into account due to the high viability of cells in the experiments. Experimental data have shown that in fermentations with *S. stipitis* the cell growth is affected by the initial substrate concentration as well as the produced ethanol. In this study, the proposed model, composed by Andrews and Levenspiel equations, expresses the cellular growth rate,  $r_x$ , as a function of cell, substrate and product (ethanol) concentrations, as shown in equation 12.

$$r_x = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S + (S^2 / K_I)} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \quad (12)$$

where  $\mu$  is the specific cellular growth rate;  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate;  $X$  is the cell concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $S$  is the substrate concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $K_S$  is the substrate saturation constant ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $K_I$  is the substrate inhibition constant ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P$  is the product concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ );  $P_{\max}$  is the product concentration at which cell growth ceases ( $\text{g.L}^{-1}$ ) and  $n$  a parameter related to product inhibition.

The rate of substrate uptake is described by equation 13:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_X} + m_X X \quad (13)$$

where  $Y_X$  and  $m_X$  represents the limit cellular yield and the maintenance coefficient, respectively.

The Luedking-Piret expression was applied to represent the ethanol formation rate,  $r_p$ , which is proportional to the cell concentration ( $X$ ), and to the cellular growth rate, as defined by equation 14, where  $\alpha$  and  $\beta$  are constants:

$$r_p = \alpha r_x + \beta X \quad (14)$$

### 3.2.6 Parameter Estimation

According to equations 9 to 14, the parameters to be estimated using Quasi-Newton algorithm were:  $m_x$ ,  $Y_{P/X}$ ,  $Y_X$  and  $n$ , while the others ( $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $K_I$  and  $P_{\max}$ ), were obtained from experimental data, from batch and continuous fermentations as previously described, and were kept fixed.

The parameter estimation procedure consisted in finding values which minimizes an objective function, formed by experimental data and results generated by the model

simulation. The relevant kinetic parameters were adjusted according to experimental results for substrate consumption and ethanol production.

Considering that  $\theta$  specify a vector, which contains all the parameters to be estimated, the objective of mathematical estimation is to find  $\theta$  by the minimization of objective function  $E(\theta)$ , defined by equations 15 and 16:

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[ \frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{max}^2} \right] \quad (15)$$

$$= \sum_{n=1}^{np} \varepsilon_n^2(\theta) \quad (16)$$

where  $Xe_n$ ,  $Se_n$  and  $Pe_n$  are the experimental values of cells, substrate and ethanol concentrations, respectively, for each sampling time,  $n$ .  $X_n$ ,  $S_n$  and  $P_n$  are the concentrations computed by the model at each time,  $n$ .  $Xe_{max}$ ,  $Se_{max}$  and  $Pe_{max}$  are the maximum measured concentrations, and the term  $np$  are the number of sampling points.  $\varepsilon_n(\theta)$  is the error due to the  $th$  sampling.

The determination of a feasible region of the search space in multiparameter estimation of deterministic models is a complex task. Thus, for the solution of equations 9 to 14, a FORTRAN routine with integration based on 4<sup>th</sup> order Runge-Kutta method was used. For fitting the proposed model to the experimental data, the parameters  $m_x$ ,  $Y_{PX}$ ,  $Y_X$  and  $n$  were estimated through the minimization of equation 16, using a Quasi-Newton (QN) algorithm.

### 3.3. Results and Discussion

The results from batch runs are presented in Table 3.1, which are initial substrate concentration ( $S_0$ ), final ethanol ( $P_f$ ), xylitol ( $X_{yf}$ ) and biomass ( $X_f$ ) concentrations, fermentation time ( $t_T$ ) and calculated values of ethanol yield ( $Y_{PS}$ ), biomass yield ( $Y_{XS}$ ) and maximum specific growth rate related to each initial substrate concentration ( $\mu_{max}^*$ ).

According to Table 3.1, *S. stipitis* practically consumed all the xylose in all assays, except when the initial substrate concentration were 125.2 g.L<sup>-1</sup> and 145.6 g.L<sup>-1</sup>, where incomplete consumptions of xylose were observed. Roberto et al. (22) also reported incomplete xylose utilization when 99 or 145 g.L<sup>-1</sup> initial xylose were employed, even after 100 hours of fermentation, using the same strain of *S. stipitis*. Moreover, the xylose consumption rate was lower in assays with high substrate concentrations, which can be verified by the low specific growth rate. Consequently, for higher substrate concentrations, extra fermentation time was required to achieve total or quasi-total sugar consumption, due to both substrate and product inhibition.

Glycerol and acetic acid production were not detected at the investigated conditions. For the assay performed with initial substrate concentration of 9.2 g.L<sup>-1</sup>, the final xylitol concentration was lower than 0.05 g.L<sup>-1</sup>. For experiments at higher initial substrate concentration, the xylitol production increased, which can be associated with a decrease in ethanol yield ( $Y_{PS}$ ). This occurs because xylitol is an intermediate product in metabolism of

xylose to ethanol, and also it can be present at different concentrations, depending on the aerobiosis conditions, and can be converted into ethanol afterward. Roberto et al. (22), Barbosa et al. (23), Amaral Collaço et al. (24), and Parajó et al. (25) studied the bioconversion of xylose into xylitol by several yeasts, and founded out that when carbon source limitation occurs, the xylitol produced is consumed. Thus, the presence of xylitol in the fermentation does not reduce the ethanol conversion in an expressive way since it can be partially or completely converted into ethanol. However, the culture conditions can be optimized to maximize the xylose conversion into ethanol to achieve higher yields and productivities.

**Table 3.1.** Data for the conversion of xylose into ethanol in batch mode at different initial substrate concentrations by *S. stipitis*

$S_0$ (g.L <sup>-1</sup> )	$t_T$ (h)	$X_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	$P_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Xy_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$\mu^*_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
7.2 <sup>a</sup>	20.2	1.1	2.5	< 0.050	0.501	0.215	0.189
9.2	20.0	1.3	4.3	< 0.050	0.476	0.133	0.203
22.9	73.1	1.9	10.2	0.195	0.477	0.058	0.215
36.0 <sup>a</sup>	72.3	1.6	16.9	0.585	0.470	0.040	0.203
49.6	98.2	3.8	19.3	0.467	0.504	0.080	0.190
71.4	175.6	4.8	34.4	5.571	0.449	0.054	0.181
82.1	239.7	5.8	38.1	2.448	0.461	0.080	0.171
120.0	237.6	5.7	54.9	4.091	0.461	0.085	0.138
125.2 <sup>b</sup>	195.0	6.4	50.7	5.603	0.437	0.052	0.065
145.6 <sup>c</sup>	237.6	5.8	45.8	1.475	0.366	0.047	0.074

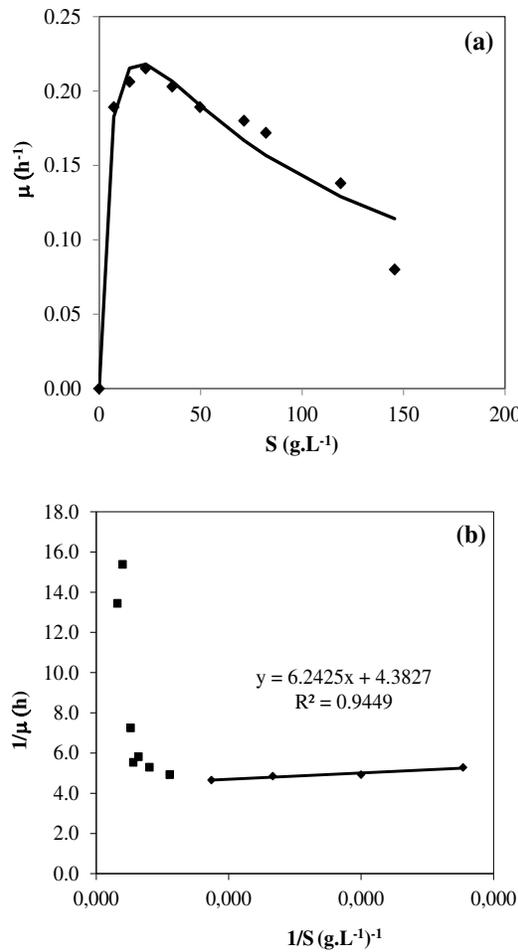
<sup>a</sup>Validation tests

<sup>b,c</sup>Residual substrate concentrations were 4.4 and 26.1 g.L<sup>-1</sup>, respectively.

It was also observed that the assays performed at the highest xylose concentrations (nominal value of 120 g.L<sup>-1</sup>) led to the highest ethanol concentration at the end of fermentation (54.9 g.L<sup>-1</sup>), which is predictable. Nevertheless, this result suggests that, although a low maximum specific growth rate was observed (Table 3.1), the strain showed good ethanol tolerance ( $P_f$  of 54.9 g.L<sup>-1</sup>). Slininger et al. (25) and Linko et al. (26) also reported higher ethanol concentration in media containing 100 or 150 g.L<sup>-1</sup> of initial xylose concentration using *S. stipitis* NRRL-Y7124. They also reported for the whole range of initial xylose concentration (7 to 150 g.L<sup>-1</sup>) high yields of ethanol from xylose ( $Y_{P/S} = 0.39$  to 0.42). Therefore, this microorganism under microaerophilic conditions can produce high ethanol yields.

The ethanol yield coefficient was shown to be dependent on xylose concentration, as can be seen in Table 3.1, where  $Y_{P/S}$  varied from 0.36 up to yields as high as 0.504 g.g<sup>-1</sup>, which is practically 100% of the theoretical value for ethanol production from sugars by *S. stipitis*. However, these high yields were obtained at low initial substrate concentration, and

in such situation the alcohol concentration is quite low at the end of the fermentation, so that other sugar sources in the medium, like the yeast extract, may contribute significantly with the final amount of ethanol and consequently increasing the yield coefficient. Others workers also reported high yields with *S. stipitis* for lower substrate concentration, as Calleja et al. (28) and Dellweg et al. (29), who reported yields as high as 97% and 96%, respectively. The authors reported that the ethanol yield coefficient ( $Y_{P/S}$ ) is inversely proportional to the initial xylose concentration and reaches nearly the theoretical value of 0.51 when substrate concentration is very low. Also, according to Hinman et al. (30), the substrate concentration presents a great impact on xylose-to-ethanol yield. In this present work, lower substrate concentrations resulted also in higher xylose conversion into ethanol, and this result is of a vital importance for the fermentative process with *S. stipitis*, indicating that low substrate concentrations may be the most suitable fermentation procedure, as it may be the case, for example, of the continuous operation mode or fedbatch fermentation. It is also of practical interest to determine the extent to which the inhibition occurs and what causes it. Substrate influence over the microorganism growth was studied, as shown in Figure 3.1.



**Figure 3.1.** Data from batch fermentations: (a) Influence of initial xylose concentration ( $S_0$ ) on specific growth rate ( $\mu$ ), and (b) linearization according to Lineweaver-Burk method to obtain  $K_S$  and  $\mu_{max}$  parameters.

It can be seen that there is a strong inhibition effect of the substrate over the specific growth rate (Figure 3.1a), which decreases from xylose concentration higher than around 30 g.L<sup>-1</sup>. The double inverse procedure (1/ $\mu$  as function of 1/S<sub>0</sub>), as depicted by Figure 3.1b, and according to Lineweaver-Burk's equation (Eq. 4), shows that only the first four data are aligned, which corresponds to the lower substrate concentrations. In this range, the microorganism follows Monod kinetics. Therefore, from this part of the curve the constants of Monod equation could be determined, being  $K_S = 1.67$  g.L<sup>-1</sup> and  $\mu_{max} = 0.232$  h<sup>-1</sup>. In addition, in order to obtain the substrate inhibition constant ( $K_I$ ) equations 5 and 6 were applied. The inhibition constant was found as  $K_I = 24.4$  g.L<sup>-1</sup>. These parameters were calculated using the experimental data obtained in batch mode and will be used as initial estimate to obtain the final values by Quasi-Newton method.

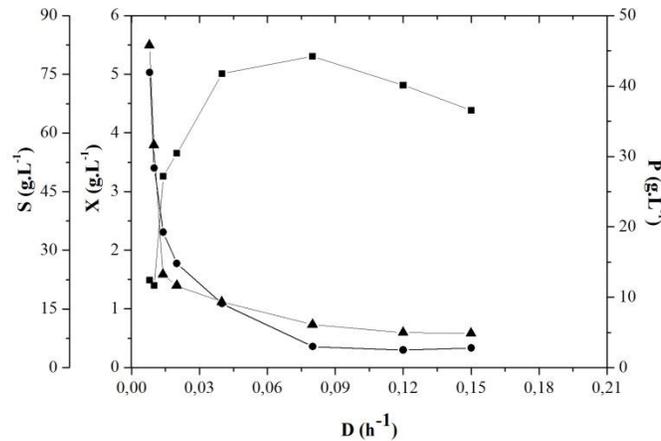
Du Preez et al. (13) and Slininger et al. (25) suggested that the fermentative process of xylose consumption by *S. stipitis* is totally inhibited at ethanol concentrations from 42 to 45 g.L<sup>-1</sup>. However, in this work, this strain reached higher ethanol concentration than those reported, which correspond to about 55 g.L<sup>-1</sup> for initial xylose concentration of 120 g.L<sup>-1</sup>. However, the fermentation time was quite long, about 240 hours, which hampered productivity. The ethanol concentrations at the end of fermentations were satisfactory and above the values found in literature. This limiting ethanol tolerance is mainly related to a specific strain, mode of operation of fermenters and cultivation conditions, which may explain these differences found in the literature.

To determine the effects of ethanol inhibition and the ethanol limiting concentration, (parameter  $P_{max}$ ), 8 runs in continuous fermentation, at different dilution rates were performed. The results are shown in Table 3.2 and Figure 3.2. The dilution rate ( $D$ ) varied from 0.008 h<sup>-1</sup> to 0.150 h<sup>-1</sup>. The xylose concentration in feed stream was fixed at 95 g.L<sup>-1</sup>. Analysis of biomass, substrate and ethanol concentrations in the reactor were performed after the steady-state has been reached. It can be seen from Figure 3.2 that the ethanol and cellular concentrations rapidly decreased and xylose concentration increased when the dilution rate increased. The ethanol and biomass concentrations tend to stabilize at lower values for higher dilution rates, whereas for xylose a small decrease in its concentration in the same operating conditions is observed. The maximum ethanol concentration was 41.9 g.L<sup>-1</sup> for dilution rate of 0.008 h<sup>-1</sup>. Operation at low dilution rates are thus shown to be necessary to minimize inhibitory effect of substrate and in this condition a more efficient xylose conversion was possible, although alcohol inhibition was considerable.

**Table 3.2.** Data for the conversion of xylose into ethanol by *S. stipitis* in continuous fermentation at different dilution rates

D (h <sup>-1</sup> )	P (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>y</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	AA (g.L <sup>-1</sup> )	X (g.L <sup>-1</sup> )	Productivity (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	Viability (%)
0.150	2.8	---	---	0.6	0.420	0.140	0.029	100
0.120	2.5	---	---	0.6	0.300	0.156	0.043	100
0.080	3.0	---	---	0.7	0.240	0.317	0.061	100
0.040	9.1	---	---	1.1	0.364	0.365	0.047	100
0.020	14.8	1.5	---	1.4	0.296	0.328	0.047	100
0.014	19.2	0.2	1.8	1.6	0.269	0.376	0.043	100
0.010	28.3	5.4	0.5	3.8	0.283	0.358	0.065	94
0.008	41.9	1.8	0.1	5.5	0.335	0.437	0.071	90

--- Not detected; AA: acetic acid.



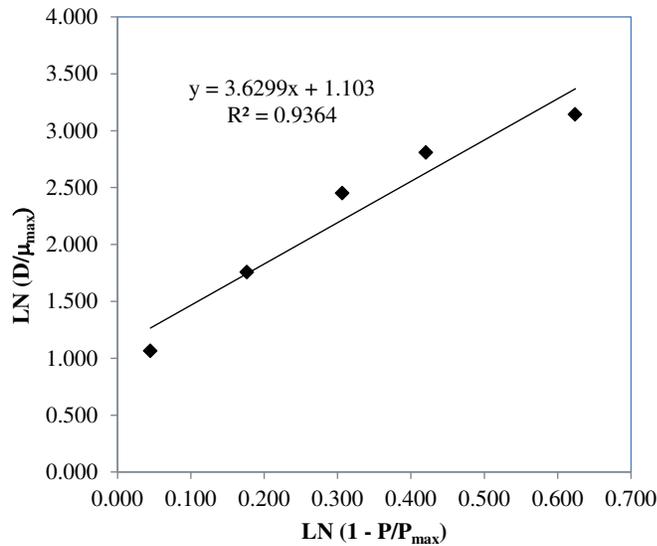
**Figure 3.2.** Data from continuous fermentation for xylose uptake, biomass accumulation and ethanol production for different dilution rates. Symbols: (●) substrate, (■) ethanol and (▲) cells.

### 3.3.1 Mathematical Modeling

The mathematical model to be computed consisted of equations 9 to 14. The system is formed by 8 parameters, 4 of which were fitted by Quasi-Newton algorithm ( $Y_{P/X}$ ,  $Y_X$ ,  $m_x$  and  $n$ ) and the remaining ones,  $\mu_{max}$ ,  $K_S$ ,  $K_I$  and  $P_{max}$  were kept fixed according to experimental determination.

The parameters of Andrews equation (Eq. 5),  $\mu_{max}$ ,  $K_S$  and  $K_I$ , were determined using experimental data from batch assays and performing the linearization of equations 4 and 5, as previously described. The parameter for substrate inhibition,  $K_I$  was calculated

through a mixed of graphical and algebraic procedures, as shown by equation 6, which was obtained by the derivation of equation 5 in relation to substrate ( $d\mu/dS=0$ ). In equation 6,  $S^*$  denotes the substrate concentration at maximum point in curve  $\mu$  vs.  $S$  (Figure 3.1a). Values of  $n$  and  $P_{max}$  were based on experimental data from continuous modes, performing the linearization of data according the curve  $\text{Ln}(D/\mu_{max})$  vs  $\text{Ln}(1-P/P_{max})$ , as shown in Figure 3.3 as an example, where  $n$  was obtained from the curve slope for the best alignment achieved according to a trial and error procedure with different  $P_{max}$  values. Data of  $n$  were fine-tuned afterwards by the Fortran routine, using the  $QN$  approach. All the remaining parameters varied with initial substrate concentration, except  $m_x$ , the maintenance coefficient, which changed lightly between experiments, so that it was kept constant in all situations and equivalent to the average of all values.

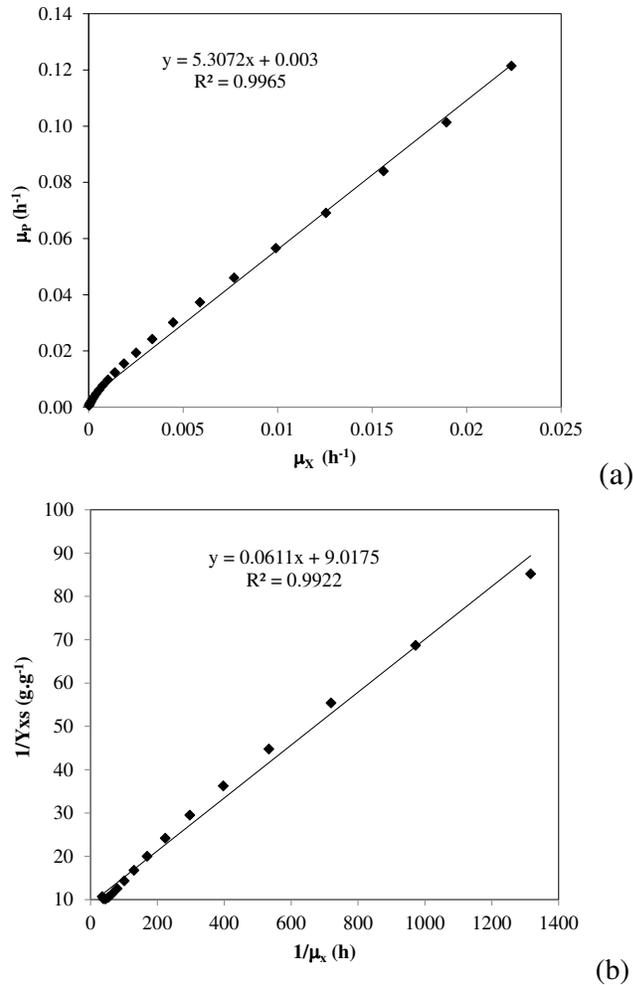


**Figure 3.3.** Calculation of parameter  $n$ .

Variation in parameter  $n$  with  $S_0$ , as found here, is unusual, and it was attributed to changes in the microorganism metabolism at higher substrate concentrations, which was supported by the increase of xylitol production as  $S_0$  increased (Table 3.1). However, metabolic models, such as the genome-scale metabolic models (GEMs), can be used to understand this effect and to predict metabolic capabilities of cells, to analyze metabolites connectivity and pathways redundancy (18). GEMs can also be used to predict genotypic-phenotypic relationships and for identification of metabolic engineering targets on *Scheffersomyces stipitis* (18, 31). A complete model describing the kinetics and stoichiometry of the xylose fermenting process is not found in the literature, however it would be a valuable tool for predicting optimum reactor configuration strategies, as well as scale-up procedures. A similar study using Levenspiel's model to evaluate ethanol inhibition in alcoholic fermentation from glucose by *Saccharomyces cerevisiae* was carried out by Atala et al. (32), who found a  $n$  value of about 1.5, lower than those found here for *S. stipitis*. As  $n$  is related to the ethanol inhibition effect, a higher  $n$  means that the microorganism is more sensitive to the ethanol concentrations, as it is the case of *S. stipitis*.

compared to *S. cerevisiae*. However, they are different strains of yeast using different substrates and metabolic routes, so that is difficult to compare kinetic parameters.

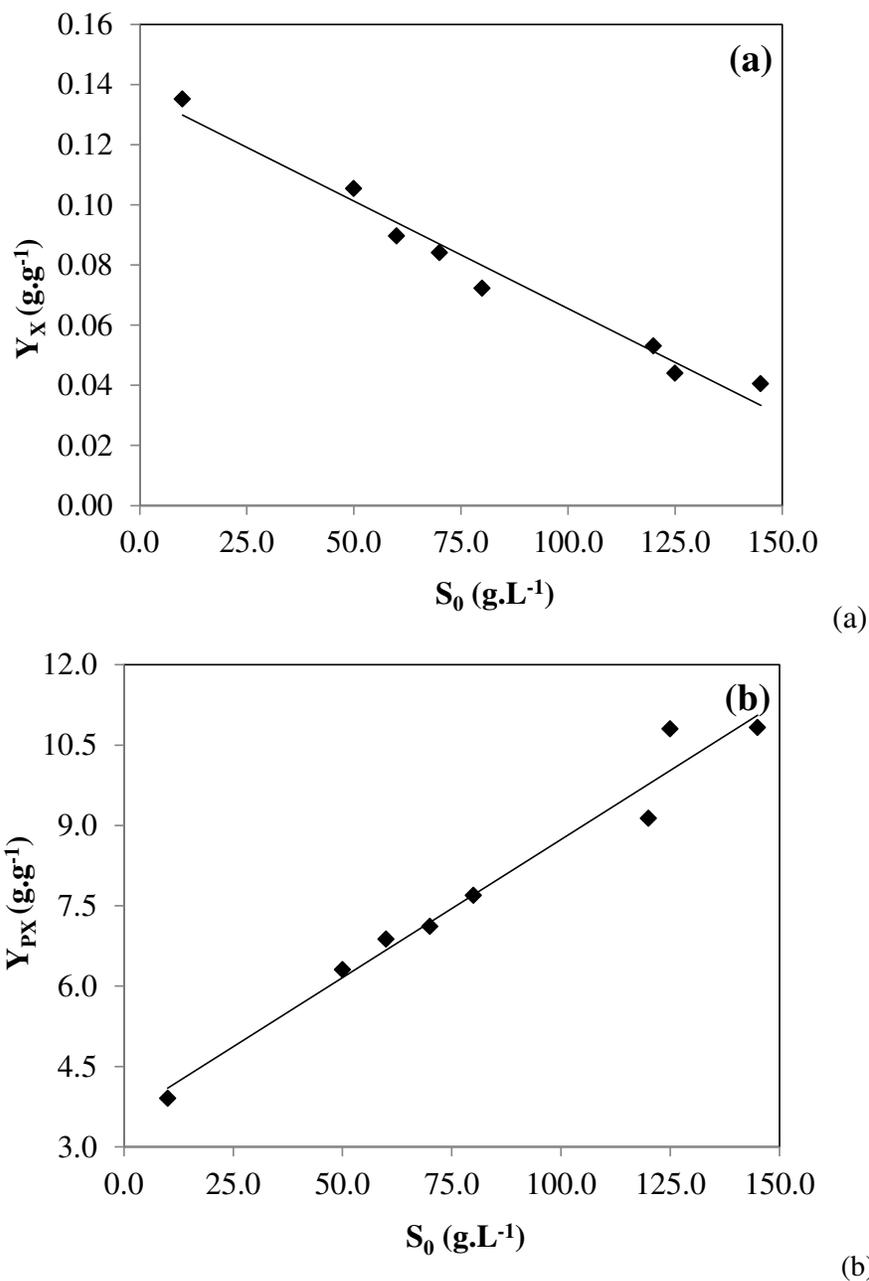
For initial estimation of  $Y_{P/X}$ , values of  $\mu_P$  (Eq. 3) calculated from experimental data (for several substrate concentrations) were plotted against  $\mu_X$  (Eq. 1), as shown in Figure 3.4a. The angular coefficient corresponds to the parameter  $\alpha$ , and the linear coefficient to  $\beta$ . As  $\beta$  is practically zero,  $\alpha$  was considered equivalent the parameter  $Y_{P/X}$ . The initial values for  $Y_X$  and  $m_X$  were also estimated by graphical method, plotting  $1/Y_{X/S}$  vs.  $1/\mu$  (Figure 3.4b). The angular coefficient corresponds to  $m_X$  (maintenance coefficient), and the linear one to  $1/Y_X$ . All experimental data for  $Y_{P/X}$ ,  $m_X$ , and  $Y_X$  are shown in Table 3.3, together with the fitted ones.



**Figure 3.4.** Determination of the kinetic parameters  $Y_{P/X}$  (a) and  $m_X$  and  $Y_X$  (b) for batch experiments. Data from fermentation with 50 g.L<sup>-1</sup> initial substrate concentration, as an example.

Figure 3.5a shows the values of  $Y_X$  (limiting cellular yield) as estimated by the model fitting (through Quasi-Newton routine) as a function of initial substrate

concentration, using data in batch mode. It can be noted that  $Y_X$  values decreased linearly with increasing initial substrate concentration. Opposite behavior was obtained for the conversion factor,  $Y_{PX}$  (Figure 3.5b), which increased linearly with the increase of substrate concentration, which means that the cells are more effective in ethanol production at higher substrate concentration.



**Figure 3.5.** Dependence of parameters  $Y_X$  (a) and  $Y_{PX}$  (b) on initial substrate concentration.

The values of  $Y_{P/X}$  and  $Y_X$  were written as functions of initial substrate concentration, according to equations 17 and 18, respectively, and used in simulations of the process.

$$Y_X = -0.0007S_0 + 0.1366 \quad R^2=0.9515 \quad (17)$$

$$Y_{P/X} = 0.05167S_0 + 3.772 \quad R^2 = 0.9699 \quad (18)$$

Through the simulations of the model formed by equations 9 to 14, 17 and 18 and kinetic parameters in Table 3.3 (fixed parameters:  $\mu_{max}=0.232 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_S=1.67 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $K_I=24.4 \text{ g.L}^{-1}$  and  $P_{max}=56 \text{ g.L}^{-1}$ ) the concentration profiles of ethanol (P), substrate (S) and biomass (X), were obtained. These data are plotted against time in Figure 3.6 for some of the batch assays, as example: 9.2, 49.6, 82.6, 125.0 and 145.6  $\text{g.L}^{-1}$  of initial substrate concentration. It can be seen that the proposed model fitted well the experimental data, whose standard residual deviations (RSD) are put together with the others simulations in Table 3.4.

**Table 3.3.** Kinetic and conversion parameters before and after fitting procedure for different initial substrate concentrations, for experiments in batch mode (fixed remaining parameters:  $\mu_{max}=0.232 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_S=1.67 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $K_I=24.4 \text{ g.L}^{-1}$  and  $P_{max}=56 \text{ g.L}^{-1}$ )

$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{P/X}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ ) Before /After	$Y_X$ ( $\text{g.g}^{-1}$ ) Before /After	$m_x^b$ ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	$n^c$ After
9.2	3.00 / 3.90	0.104 / 0.13	0.027	4.5
22.9	5.09 / 4.98	0.091 / 0.12	0.027	4.5
49.6	5.31 / 6.31	0.121 / 0.10	0.027	4.5
71.4	7.83 / 7.12	0.083 / 0.08	0.027	4.5
82.1	8.55 / 7.69	0.081 / 0.07	0.027	4.4
120.0	10.75 / 9.13	0.047 / 0.05	0.027	2.5
125.2	11.13 / 10.02	0.040 / 0.04	0.027	2.5
145.6	12.02 / 10.83	0.043 / 0.04	0.027	2.5
7.2 <sup>a</sup>	3.00	0.14	0.027	4.5
36.0 <sup>a</sup>	5.50	0.11	0.027	4.5

<sup>a</sup>Validations test; <sup>b</sup>Average of n values; <sup>c</sup>Initial value was 3.62.

**Table 3.4.** Residual standard deviations (%RSD) for X, S and P, at different initial substrate concentrations

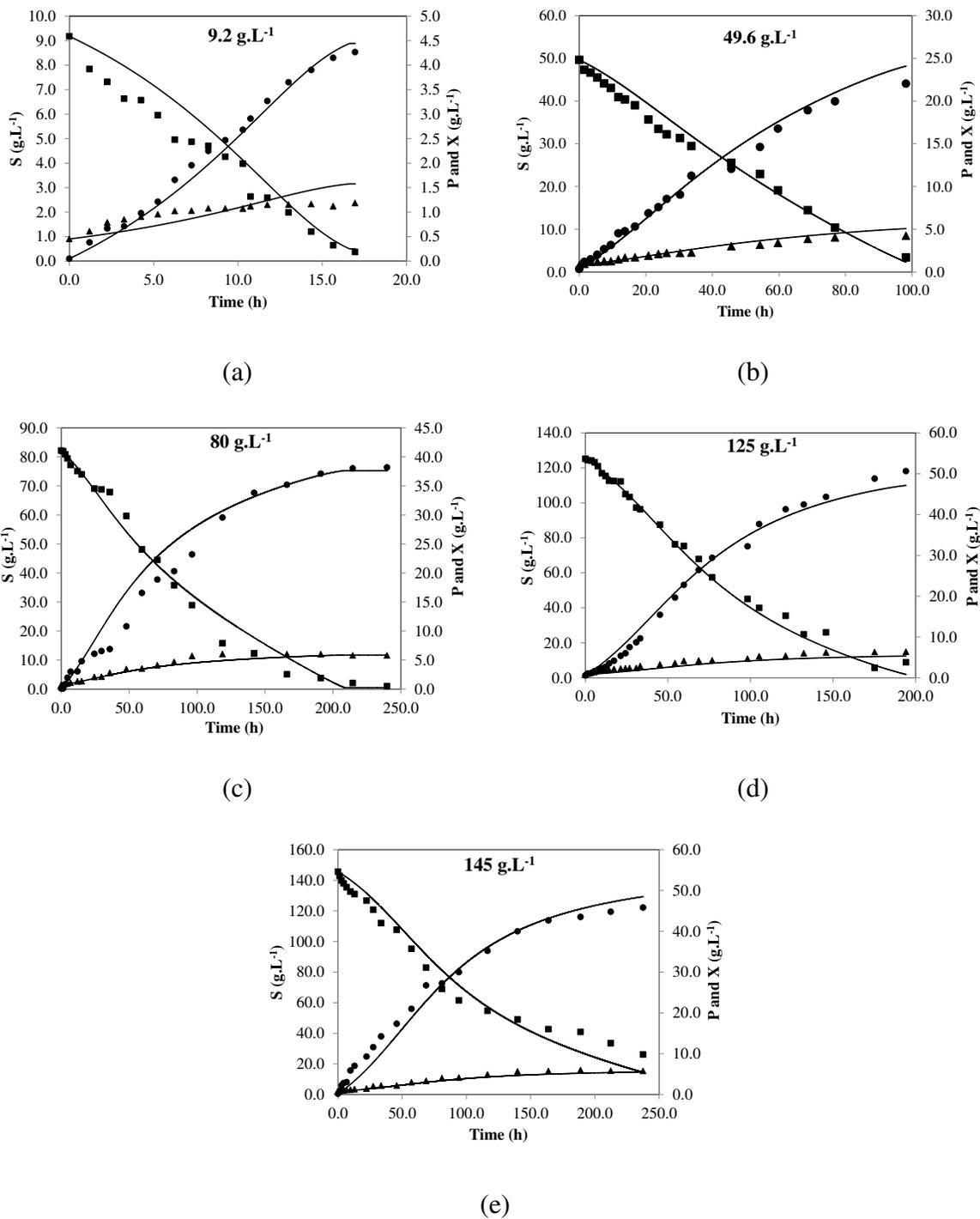
Variable	Substrate concentration (g.L <sup>-1</sup> )									
	9.2	22.9	49.6	71.4	82.1	120.0	125.2	145.6	7.2 <sup>a</sup>	36.0 <sup>a</sup>
X	20.3	14.3	11.7	12.4	13.6	6.7	25.1	15.0	16.9	12.0
S	18.2	10.4	7.1	4.8	7.2	10.9	4.0	8.3	10.6	10.9
P	7.2	9.7	10.3	16.2	17.7	11.4	9.6	11.6	10.2	10.5

<sup>a</sup> Validations test

The standard residual deviations (*RSD*), given by equation 19, describes the average percentage deviation of experimental and predicted values and is used to characterize the quality of model predictions.

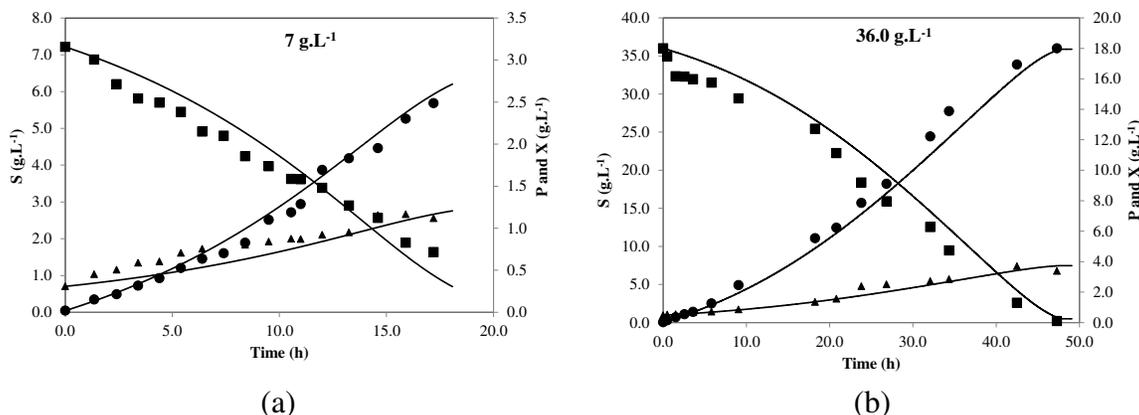
$$RSD(\%) = \left( \sqrt{RSD} / \bar{d}_p \right) 100 \quad (19)$$

where  $RSD = \frac{1}{np} \sum_{p=1}^{np} (d_p - x_p)^2$ ,  $x_p$  and  $d_p$  are respectively, the values predicted by the model and experimental data,  $\bar{d}_p$  is the average of experimental values, and  $np$  is the number of experimental points. It can be noticed that biomass concentration, substrate and ethanol presented deviations from 4.0% to 25.1%. Higher *RSDs* were obtained for biomass data (25.1% for the experiment at initial substrate concentration of 125 g.L<sup>-1</sup>). This can be explained due to the difficulty in measuring the biomass concentration in medium as a result of the increased flocculating characteristic of the microorganism at high ethanol concentrations.



**Figure 3.6.** Experimental (symbol) and model prediction (lines) data for batch mode fermentation, at different substrate concentrations. Symbols: (■) substrate, (●) ethanol and (▲) cells.

In order to validate the model, experiments with 7.2 and 36.0 g.L<sup>-1</sup> initial xylose concentration were used. The results are shown in Figure 3.7. The RSD (%) values between the model prediction and experimental values for biomass concentration, substrate and ethanol for validations test were low. The relative low RSD for validation suggests a good fitting performance of the model proposed. Therefore, the model can be used for optimization and process control. However, it can be stressed that the kinetic parameters are valid for the specific conditions used in these experiments. When operational conditions change, such as pH, temperature, fermentation medium or salt concentration, the kinetic parameters need to be re-estimated. According to Andrade et al. (33), although being a time consuming task, the parameter re-estimation is necessary to obtain accurate description of processes when changes in operational conditions/raw material composition occur.



**Figure 3.7.** Validation of the model. Experimental (symbols) and model prediction (lines) data for batch mode fermentation performed at 7 g.L<sup>-1</sup> (a) and 36.0 g.L<sup>-1</sup> (b) of initial xylose concentration. Symbols: (■) substrate, (●) ethanol and (▲) cells.

Atala et al. (32), Andrade et al. (33) and Rivera et al. (34) also used Levenspiel model to evaluate ethanol inhibition in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, and they found that the model fitted satisfactorily the experimental data for all cases. In our work, the Andrews-Levenspiel mixed model was applied in alcoholic fermentation by *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 at different xylose and ethanol concentrations to evaluate and describe the microorganism inhibition, as well to fit the kinetic parameters. It was also found that although the microorganisms are not the same and they present distinct metabolism of substrate consumption, the evaluated model fitted well the experimental data of this work as well. Therefore, the above mentioned model can be used for different processes where substrate and product inhibition are found.

The formulation of optimization criteria (objective function) basing on process simulation is one of the essential steps in model parameters estimation. The determination of a feasible region in multiparameter search of a deterministic model is a complex task (34). For this reason, the optimization was evaluated using QN algorithm. From computational results, it was found that the QN algorithm presented a good performance,

and the parameters were estimated for each concentration. The curves of estimated parameters as function of substrate concentration presented regression coefficient above 96%. Lower coefficients could lead to additional errors in the model.

It is important to mention that although raw material or media composition may change and parameters should be re-estimated, some of them can be fixed, because they do not present significant impact on model fitting performance. Thus, the results presented in this work can aid future modeling of processes in which biomass hydrolysates will be used as substrate. The kinetic model can also be used in process design, control and optimization, which may aid to reduce the developing costs of second generation bioethanol.

In this way, though knowledge obtained through the coupling of different modeling techniques experiments with optimal metabolic fluxes can be designed, and kinetic parameters for xylose uptake and ethanol production, as well as the evaluation of the correlations between gene expression and metabolic changes in response to environmental perturbation can be determined.

### 3.4. Conclusion

*S. stipitis* consumed xylose efficiently, reaching high conversion rates, near the maximum theoretically possible at low substrate concentrations. High ethanol contents were achieved for both batch and continuous mode, presenting double inhibitory effect by substrate and ethanol. A simple mechanistic non-structured model for yeast growth taking into account double inhibitory effect was proposed and the model predictions were in good agreement with experimental observations, thus allowing us to systematically investigate the kinetics characteristics and describing xylose consumption and ethanol yield of this yeast under microaerobic conditions. The kinetics parameters determined can be quite different from those found out for traditional alcohol producing microorganisms, such as *S. cerevisiae*, what the model used cannot explain. Perhaps, more recent model propositions, such as the genome-scale metabolic models (GEMs) would be useful in this respect.

The QN methodology associated with the model of Andrews-Levenspiel was successful to estimate kinetic parameters of xylose fermentation. The parameters  $Y_x$  decreased, and  $Y_{p/x}$  increased, probably due to the higher inhibitory effect caused by the ethanol accumulated and by high xylose concentration. The approach used in this work can be useful for process prediction and control, as well as for simulation and optimization of the fermentative process. Moreover, the evaluation of their impacts on yield, conversion and productivity can also be assessed, and useful insights were drawn on kinetic parameters estimation of *S. stipitis* from model simulations. These insights can be applied for efficient xylose utilization and high ethanol yields promoting cost reduction in industrial scale.

### Acknowledgments

The authors acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

## References

1. Ghaly, A.E. and El-Taweel, A.A. (1997) Kinetic Modelling of Continuous Production of Ethanol from Cheese Whey. *Biomass and Bioenergy*. 12:6, 461-472.
2. Prior, B.A., Kilian, S.G and du Preez, J.C. (1989) Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: prospects and problems. *Process Biochem.*, 21–32.
3. Krishnan, M.S., Blanco, M., Shattuck, C.K., Nghiem, N.P. and Davison, B.H. (2000) Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 86, 525–541.
4. Fu, N., Peiris, P., Markham, J. and Bavor, J. (2009) A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production in glucose/xylose mixtures. *Enzyme Microb. Tech.* 45, 210–217.
5. Silva, J.P., Mussatto, S.I., Roberto, I.C. and Teixeira, J.A. (2012) Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Ren. Energy*. 37 (2012), 259-265.
6. Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. (2004) Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolyzate treatment with activated charcoal for xylitol production. *Biotech. Prog.* 20, 134–139.
7. Nigam, N. (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. of Biotech.* 87, 17-27.
8. Jeffries, T.W. and Van Vleet, J.R.H. (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Res.* 9, 793-807.
9. Laplace, J.M., Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.M. (1991) Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial Strain: process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotech. Lett.* 13, 445–450.
10. Rouhollah, H., Iraj, N., Giti, E. and Sora, A. (2007) Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their co-cultures. *Afr. J. Biotech.* 6, 1110–1114.
11. Pereira, F.B., Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A. and Domingues, L. (2010) Optimization of low cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Biores. Tech.* 101, 7856-63.
12. Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.M. (1988) The ethanol tolerance of *Pichia stipitis* Y7124 grown on a D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture. *J. Ferm. Tech.* 66, 417–422.

13. du Prezz, J.C., van Driessel, B. and Prior, B.A. (1989) The fermentation of D-xylose by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen level. *Yeast* 5, 129–139.
14. Taniguchi, M., Tohma, T., Itaya, T. and Fuji, M. (1997) Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferm. Bioeng.* 83:84, 364–370.
15. Goldemberg, J., Coelho, S.T., Nastari, P.M. and Lucon, O. (2004) Ethanol learning curve—the Brazilian experience. *Biomass & Bioenergy* 26, 301–4.
16. Costa, C.P. and Ferreira, M.C. (1991) Preservação de microrganismos. *Rev. Bras. Microb.* 22, 263-268.
17. Lee, S.S., Robinson, F.M. and Wang, H.Y. (1981) Rapid Determination of Yeast Viability. *Biotech. Bioeng.* 11, 641–649.
18. Balagurunathan, B., Jonnalagadda, S., Tan, L. and Srinivasan, R. (2012) Reconstruction and analysis of genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*. *Microb. Cell Fact.* 11:27.
19. Lisha, K. P., Sarkar, D., 2013. Dynamic flux balance analysis of batch fermentation: effect of genetic manipulations on ethanol production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* doi: 10.1007/s00449-013-1027-y.
20. Liang, M., He, Q. P., Jeffries, T. W. and Wang, J. (2013) Elucidating Xylose Metabolism of *Scheffersomyces stipitis* by Integrating Principal Component Analysis with Flux Balance Analysis. *American Control Conference (ACC)*, Washington, DC, USA, June 17-19.
21. Garcia-Albornoz, M. A., Nielsen, J., 2013. Application of Genome-Scale Metabolic Models in Metabolic Engineering. *Ind. Biotechnol.* 9 (4), 203-214.
22. Roberto, I.C., Laci, L.S., Barbosa, M.F.S. and Mancilha, I.M. (1991) Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production of Ethanol. *Proc. Bioch.* 26, 15-21.
23. Barbosa, M.F.S., Medeiros, M.B., de Mancilha, Y.M., Schneider, H. and Lee, H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. of Ind. Microb. and Biotech.* 3, 241–251.
24. Amaral Collaço, M.T., Girio, F.M. and Peito, M.A. (1989) Utilization of the hemicelluloses fraction of agro-industrial residues by yeasts. *In: Enzyme Systems for Lignocellulosic Degradation*. London: Elsevier, 221:230.

25. Parajó, J.C., Dominguez, H. and Dominguez, J.M. (1996) Production of xylose from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. *Biotech. Lett.* 18, 593–598.
26. Slininger, P.J., Bothast, R.J., Okos, M.R., Ladisch, M.R. (1985) Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotech. Lett.* 6, 431-436.
27. Linko, Y.Y., Kautola, S., Uotila, S., Linko, P. (1986) Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis* yeast. *Biotech. Lett.* 8/1, 47-52.
28. Calleja, G.B., Levy-Rick, S., Mahmoudides, G., Labelle, J. and Schneider, H. (1984) Rapid Process for the Conversion of Xylose to Ethanol. Canadian Patent 1,266,245.
29. Dellweg, H., Rizzi, M., Methner, H., Debus, D. (1984) Xylose fermentation by Yeasts. *Biotechnol. Lett.*, 6, 395-400.
30. Hinman, N.D., Wright, J.D., Hoagland, W., Wyman, C.E (1989). Xylose Fermentation: An Economic Analysis. *App. Bioch. and Biotech.* 20/21: 391-401.
31. Caspeta, L., Shoaie, S., Agren, R., Nookaew, I. and Nielsen, J. (2012) Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and *in silico* evaluation of their potentials. *BMC Syst. Biol.* 6:24.
32. Atala, D.I.P., Costa, A., Maciel, R. and Maugeri, F. (2001) Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration Considering the Effect of Temperature. *App. Bioch. Biotech.* 91–93(1–9), 353–366.
33. Andrade, R.R., Rivera, E.C., Costa, A., Atala, D.I.P., Maugeri, F. and Maciel, R. (2007) Estimation of Temperature Dependent Parameters of a Batch Alcoholic Fermentation Process. *App. Bioch. and Biotech.* 136:140, 753-63.
34. Rivera, E.C., Costa, A., Atala, D.I.P., Maugeri, F., Maciel, R.W. and Filho, R.M. (2006) Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. *Proc. Bioch.* 41, 1682-1687.



## CAPÍTULO 4

### **4. Plackett-burman technique for sensitivity analysis of kinetic parameters for second generation ethanol by *Scheffersomyces stipitis***

Este capítulo apresenta o artigo científico submetido na revista “*Journal Chemical Technology Biotechnology*”. O artigo apresenta o desenvolvimento de uma análise de sensibilidade paramétrica para definição dos parâmetros mais importantes do modelo matemático proposto para descrever o perfil cinético de crescimento de biomassa, acúmulo de substrato e formação de produto pela linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124 durante o consumo de pentoses. Reduzir o número de parâmetros cinéticos a serem estimados pelo modelo através da técnica de análise de sensibilidade diminui significativamente a complexidade da otimização, possibilitando operar uma técnica rápida e que gere um desempenho preciso do modelo.



## 4. Plackett-burman technique for sensitivity analysis of kinetic parameters for second generation ethanol by *Scheffersomyces stipitis*

Daniele Farias<sup>1\*</sup>, Rafael R. de Andrade<sup>2</sup>, Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Exact and Earth Sciences, Federal University of São Paulo, UNIFESP, Diadema, São Paulo, Brazil

### ABSTRACT

The mathematical modeling of kinetic processes is a difficult and time consuming task. To obtain a robust model that describes accurately the kinetic behavior of biotechnological processes is necessary to implement reliable methodologies to update the model whenever changes in operational conditions occur. For this purpose, this study aimed applying parametric sensitivity analysis to assist the acquisition of the most significant input parameters of the model. For achieve this goal a systematic approach was developed, in which you can perform a preliminary selection of the model parameters and evaluate how they influence the variation in the response, as well as its subsequent application in biotechnological processes for the production of ethanol from C5-sugars, by *Scheffersomyces stipitis*. Kinetic parameters for batch and continuous experiments were used to develop a mechanistic model, considering the dual inhibitory effects over the micro-organism (substrate and accumulated ethanol). In order to select the most significant kinetic parameters in a mechanistic model, a Plackett-Burman method for sensitivity analysis was designed. The results can be used to verify the effectiveness of this method. Reducing the number of kinetic parameters to be estimated by the model through sensitivity analysis significantly decreases the complexity of optimization, leading to a much faster technique, and an accurate performance of the model.

**Keywords:** Second generation ethanol, *Scherffersomyces sitipitis*, Optimization, Parameters estimation, Plackett-Burman methodology.

### List of Symbols

$K_i$	substrate inhibition coefficient (g.L <sup>-1</sup> )
$K_s$	substrate saturation parameter (g.L <sup>-1</sup> )
$m_x$	maintenance coefficient (g.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )

$n$	parameter describing product inhibition
$P$	product concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$P_{max}$	maximal product concentration when cell growth ceases ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$S$	substrate concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$X$	biomass concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$r_p$	ethanol production rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$r_s$	substrate uptake rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$r_x$	cell growth rate ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )
$Y_{p/x}$	cell to product conversion factor ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_x$	limiting cell yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{x/s}$	biomass yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$Y_{p/s}$	ethanol yield ( $\text{g.g}^{-1}$ )
$\mu_{max}$	maximum specific growth rate as described by Monod's model ( $\text{h}^{-1}$ )

#### 4.1. Introduction

In view of the increasing concerns on the shortage of oil reserves and the negative ecological impacts of green-house gas emissions, there is a trend for searching renewable clean fuels to substitute the traditional fossil fuels (Wyman, (2007); Balat, (2008); Balat & Balat (2009)). Currently, lignocellulosic ethanol, considered as the second generation biofuel, has been widely recognized as one of the most attractive alternatives (Sanchez, 2008) to increase ethanol production and competitiveness. The rising demand of ethanol leads to an interest in developing economic routes to obtain lignocellulosic ethanol. The increasing demand of ethanol in an economical feasible manner requires an efficient fermentation process that is able to convert all sugars present in the feedstock to ethanol at high yield and high titer in a short fermentation time (Unrean, 2013).

Complete substrate utilization is one of the requirements for making lignocellulosic ethanol economically competitive. This means that both hexoses and pentoses in cellulose and hemicellulose must be converted to ethanol, and the microorganism that can efficiently perform this conversion under industrial conditions must be adopted (Liang et al, 2013). Efficient conversion of xylose (which is the most abundant pentose in lignocellulosic

material) to ethanol is still one of the major barriers to industrialize the production of second generation ethanol (Liang et al, 2013; Margeot et al, 2009).

*Scheffersomyces stipitis* (formerly known as *Pichia stipitis*) (Kurtzman and Suzuki, 2010) has the highest native capacity for xylose fermentation of any known microbes (van Dijken et al, 1986; du Preez et al., 1989). In addition, *S. stipitis* has been shown to be one of the most promising organisms for directing fermenting xylose into ethanol at equivalent high yields (80% of theoretical yield), without significant by-product formation (Ferrari et al., 1992; Jeffries T, and Shi NQ, 1999). However, several limitations still hinder *S. stipitis* from being used to ferment mixed sugars in industrial scale (McMillan, 1993). Among them, an important one is the low tolerance of *S. stipitis* to ethanol and other inhibitors such as acetic acid (Liang et al, 2013). Consequently, different approaches have been proposed to improve cell's ethanol tolerance. An efficient production of ethanol by *S. stipitis*, which results in high yield, productivity, and titers still have to be developed (Unrean, 2013). Thus, there is clear need for optimization of fermentation process of *S. stipitis*.

Mathematical modeling, simulation, and optimization are nowadays essential tools for understanding, explaining, and exploiting the behavior of large and complex dynamic systems (Franceschini and Macchietto, 2007; 2008). Optimization procedures require reliable and accurate models. They potentially reduce the cost of ethanol production by fermentation processes by eliminating unnecessary experimental work, allowing studies of various kinetic parameters and interaction among them through simulations. Furthermore, it allows the understanding of the process, which helps in defining operational policies that can later be applied to the optimization and control of larger scale fermentation processes (Andrade, 2009).

These models may be empirical or based on mechanistic knowledge (physical, chemical, or biological laws). The mechanistic models are more powerful because they allow extrapolation of the design space to conditions beyond that encountered during laboratory experimentation (Franceschini and Macchietto, 2007; 2008). In previous work, a mechanistic model considering the influence of substrate and ethanol concentration on the process kinetics by *S. stipis* was proposed (Farias, 2013). On the other hand, these models are only valid in the conditions used for their development. Thus, for obtaining accurate

models, whenever changes in operational conditions occur, it is required an automatically update of all parameters which influence the kinetic behavior of the process. In this way, the screening of significant variables is a key factor in an optimization study, because it enables the diminishing of the number of parameters to be updated, in such a way that only significant parameters become optimization variables and this approach has as consequence to reduce the cost of the processes (Riviera, 2007; Andrade, 2009).

In sensitivity analysis techniques, tests are performed systematically and comprehensively to verify how changes in model parameters may affect the model's output, as well as to check which parameters exert a significant influence on the output variables (Starfield and Beloch, 1991; Beres, 1999). Plackett–Burman screening design (Plackett and Burman, 1946; Rodrigues and Iemma, 2012) is a technique that provides a reliable alternative which can identify among large numbers of possible input variables (kinetic parameters) the ones that are significant for the desired response. Considering this, in order to select the most significant kinetic parameters in a mechanistic model for the second generation ethanol process from C5-sugars by *S. stipites*, a sensitivity analysis by Plackett-Burman method was designed.

## 4.2. Material and Methods

### 4.2.1. Microorganism and Media

*Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 was obtained from ARS Culture Collection (NRRL), United State Department of Agriculture, which present the ability to metabolize five-carbon sugars (C5) to produce ethanol. The organism was regularly maintained on GYMP slants (composition g.L<sup>-1</sup>): agar nutrient 20; glucose 10; yeast extract 5; malt extract 20 and monobasic sodium phosphate 2, at 4°C in the Laboratory of Bioprocess Engineering/School of Food Engineering/Unicamp, Campinas, Brazil. The activation was performed in two steps for 24 h in each one, with temperature at 28°C and agitation of 150 rpm. The medium composition was described in Farias *et al.* (2013).

The media were sterilized in an autoclave for 15 min at 121°C. In order to study the fermentation behavior and to perform kinetic modeling, the assays were carried out using a

defined media containing pure xylose and supplemented with nutrients (as described in Farias et al., 2014) to efficiently convert sugar and achieve high levels of ethanol.

#### 4.2.2. Experimental data

The simulations were performed using experimental data reported by Farias *et. al* (2014), which evaluated the kinetic parameters during the consumption of C5 sugars by *S. stipitis* NRRL-Y7124. The experiments were performed in batch and continuous mode to estimate the kinetic parameters of the rate equations as a function of substrate and ethanol concentrations, as well as to evaluate the inhibitory effect caused by substrate and ethanol, and how this effect affected the kinetic behavior of the process. As reference data, eight kinetic parameters of the model reported by Farias *et al.* (2014) were taken from a batch experiment performed with 145 g.L<sup>-1</sup> of initial xylose concentration. Additionally, a Plackett & Burman experimental design technique was carried out for the sensitivity analysis of the most relevant kinetic parameters of the process.

#### 4.2.3. Mathematical Modeling

A mixed mathematical model which combined Andrews and Levenspiel's models, for substrate and product inhibition was used. The dynamic description of ethanol fermentation was carried out using an unstructured model with 3 differential equations for microorganism growth, substrate uptake and ethanol formation (Eqs. 1-3) derived from mass balance in the reactor, including the kinetics rates that describe microorganism growth ( $r_x$ ), ethanol formation ( $r_p$ ) and substrate consumption ( $r_s$ ) (Eqs. 4-6). The methodology for the kinetic parameter calculations as a function of substrate concentration can be found in Farias *et al.* (2014).

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \quad (3)$$

$$r_X = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S + (S^2/K_I)} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad (4)$$

$$r_S = \frac{r_X}{Y_X} + m_X X \quad (5)$$

$$r_P = \alpha r_X + \beta X \quad (6)$$

Equation 6 was proposed by Leudeking-Piret (1959) and combines two terms for representing the rate of product formation: the first term ( $\alpha$ ) is related to product formation associated with the rate of biomass growth, and the second term ( $\beta$ ) with the biomass concentration in this process. According to Bailey and Ollis (1986), the ethanol production is associated to biomass growth, in the exponential growth phase. Thus, values of  $\beta$  (showed at Equation 6) are very close to zero, and consequently the first term presents major contribution. This behavior was observed by the microorganism *S. stipitis* during consumption of xylose to produce ethanol (data not shown, see Farias *et. al*, 2014). Therefore, the parameter  $\beta$  (Eq. 6) was not considered, and the parameter  $\alpha$  was associated to  $Y_{p/x}$ , the conversion factor biomass to product.

The mathematical model considering inhibition by substrate and ethanol, represented by equations 1 to 6, has as chosen kinetic parameters  $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $K_I$ ,  $P_{\max}$ ,  $m_X$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $Y_X$  and  $n$ , whose values were obtained from a batch experiment at 145 g.L<sup>-1</sup>, reported by Farias *et. al* (2013), shown on Table 4.2.

#### 4.2.4. Screening of Significant Parameters

The eight kinetic parameters above may interact with each other. Their influence on the kinetic behavior during the xylose consumptions by *S. stipitis* to produce ethanol was assessed using the Plackett-Burman methodology (PB).

The parametric sensitivity analysis is a technique that may indicate the most relevant parameters of a mathematical model. This analysis is helpful to assist in a huge number of simulations process, as well as in the re-estimation of kinetic parameters when experiments are carried out in different operational conditions, batches of raw material, etc. PB design provides an alternative which allows simultaneous examination of the entire suite of parameters. This technique specifies a selected subset of the scenarios prescribed by a complete factorial and provides a simple blueprint for accomplishing the investigation. Furthermore, PB is context-free; it is equally useful for any sort of model having many parameters (and numerical response), but especially for computer-coded simulation models and addresses the subject of the sensitivity of stochastic models in a prescriptive way (Beres, 2001).

The response variables chosen to represent the kinetic behavior were the biomass and product concentration and substrate uptake ( $X$ ,  $P$  and  $dS$ ). Different times of a batch fermentation (10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250 h) were chosen because there is the possibility that some non-significant parameters at the end of fermentation, present major influences early in the process, or vice and versa. Final substrate concentration was not used as a response (but its variation) because all the fermentations were performed until all the substrate was depleted.

For each parameter to be analyzed, an upper and lower value was selected. These values should be the endpoints of a plausible range for parameters. The typical  $\pm 10\%$  rationale should be followed only if it makes sense in the model context. The ranges do not need to be identically sized, but their selection should be reasoned (Beres, 2001). For this, the eight kinetic parameters were varied at two levels: by subtracting 10% of its original value, obtaining lower level (-) and by adding 10% of its original value to obtain the higher (+). The parameters are shown in Table 4.1.

**Table 4.1.** Low and high setting parameters used in PBSA design

Parameter	Level		
	Low (-)	Nominal (0) <sup>*</sup>	High (+)
$\mu_{max}$	0.198	0.220	0.242
$P_{max}$	50.4	56.0	61.6
$Y_x$	0.037	0.041	0.045
$Y_{px}(\alpha)$	9.744	10.827	11.910
$K_s$	1.503	1.670	1.837
$K_i$	18.0	20.0	22.0
$N$	2.25	2.50	2.75
$m_x$	0.021	0.024	0.027

<sup>\*</sup>Parameters for experiment at 145 g.L<sup>-1</sup> of initial xylose concentration (Farias *et al.*, 2013)

The PB matrix, as shown in Table 4.2, comprises 20 different trials, with 8 parameters and 11 inert variables. The calculations were made for 11 freedom degrees. The difference between the number of columns in the matrix and the numbers of parameters being tested defines the number of columns determined as inert variables, named in Table 4.2 as IV<sub>n</sub> variables, which are automatically used for calculation of the residues (Rodrigues and Iemma, 2012).

In the case of sensibility analyses, there is no need for a central point, and responses were obtained thorough the integration of the mathematical model using a Fortran algorithm program designed by Farias *et al.* (2014). The data analysis reflects the effects in the responses by varying each parameter in  $\pm 10\%$ .

A total of 20 simulations for batch fermentations were analyzed, at different times of fermentation, according to the essays shown in the PB matrix. The initial conditions of substrate, product and biomass concentration were fixed at 145.6 g.L<sup>-1</sup>, 0.61 g.L<sup>-1</sup> and 0.74 g.L<sup>-1</sup>, respectively. The results for the dependent variables ( $dS$ ,  $P$  and  $X$ ) were used as responses, for each time analyzed. The effects were calculated using the software Statistica 7.0 (Statsoft).

**Table 4.2.** Plackett & Burman design with 20 trials – PB20

Exp	$\mu_{max}$	$P_{max}$	$Y_x$	$Y_{p/x}$	$K_s$	$K_i$	$n$	$m_x$	IV <sub>1</sub>	IV <sub>2</sub>	IV <sub>3</sub>	IV <sub>4</sub>	IV <sub>5</sub>	IV <sub>6</sub>	IV <sub>7</sub>	IV <sub>8</sub>	IV <sub>9</sub>	IV <sub>10</sub>	IV <sub>11</sub>
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

### 4.3. Results and Discussion

#### 4.3.1. Plackett-Burman sensitivity analysis

The main effects of the 8 kinetic parameters over xylose consumption,  $dS$ , product concentration,  $P$ , and biomass concentration,  $X$ , for each time are given in Table 4.3, 4.4 and 4.5, respectively. The significant parameters, with 95% of confidence, are shown in bold. The values in tables and graphs represent the main effects of the parameters in the responses, and the higher the effect, the higher the influence. The figures for the main effects represent the changes in the responses when the input variables are changed from levels -1 to +1, in this case from -10% to +10% around the standard values as expressed in Table 4.1. A negative effect means a decrease in the response, and vice-versa. Additionally, high values in a parameter effect means that even small variations in the parameter lead to a significant variation in the response. The  $p$  value used in this case was a more strict one

(effects with  $p$  level  $\leq 0.05$  are considered significant) since no experimental work is involved, which means no experimental random errors are involved.

The influence of kinetic parameters on the substrate consumption was represented by the variation of  $S$  in each corresponding time ( $dS$ ). In Table 4.3 and Figure 4.1a it can be observed that the most significant parameters for substrate consumption are  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_x$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $K_i$  and  $n$ .  $Y_x$ ,  $Y_{p/x}$ , and  $n$  have negative effects, while the others positive ones.  $m_x$  was significant for substrate consumption until 50 h, interestingly during the more intensive growth phase when substrate consumption is higher, while  $K_s$  was not significant for all fermentation times. It can also be noted that the higher effects ( $Y_{p/x}$ ,  $Y_x$  and  $P_{max}$ ) were obtained at the end of the fermentation process, when low substrate and high ethanol concentrations are achieved, and cell growth virtually stopped, therefore at conditions of low rates and high conversions. In the cases of  $K_i$  and  $\mu_{max}$ , they are significant during the rate intensive phase, and turned out to be no significant at end of the process. Therefore, for the fine tuning of the model and prediction of substrate consumption, only  $Y_{p/x}$ ,  $Y_x$  and  $P_{max}$  would be significant if only conversion was focused. On the other hand, if the whole process is considered,  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $K_i$  and  $n$  should be included as significant parameters for the model fine tuning. This is an advantage of the PB method compared to the traditional one, since it provide a more accurate and comprehensive result, and it is possible to choose the right set of parameters according to the prediction focuses.

Concerning alcohol production and cells growth, the profiles are quite similar to substrate coconsumption, with  $P_{max}$  and  $n$  significant parameters for both variables, with  $Y_{p/x}$  been additionally significant for cell growth, all of them in the conversion phase, while  $\mu_{max}$ ,  $K_i$ ,  $Y_x$  are significant rather during the rate intensive phase, and  $m_x$  and  $K_s$  were not significant at all, which is much similar to the substrate consumption case. Parameters with high influence (high effects) need to be evaluated carefully, requiring periodic re-estimation whenever changes occur in the process. According to the results in Figure 4.1, in general, for profiles of  $dS$ ,  $P$  and  $X$ , the most relevant parameters ( $p$  level  $\leq 0.05$ ) for the entire fermentation time ( $t$ ) were  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_{p/x}$ ,  $n$  and  $Y_x$ , and then these parameters can be chosen to be fine-tuned. Parameters with minor significance can be fixed ( $K_i$ ,  $K_s$  and  $m_x$ ),

and this reduces the number of parameters to be re-estimated, decreasing significantly the time and complexity of this task, allowing more refinement in the quality of the model.

However, it is important to note that the results obtained from the PB method in this study are valid only for the range of parameters evaluated and the results describing the kinetic behavior of *S. stipitis* during xylose consumption, with the raw material used for this particular case. On the other hand, this analysis can be applied also to the case of different pentose compositions, as from hemicellulosic hydrolysates. Thus, for problems of parameters re-estimation involving the use of hemicellulosic hydrolysates this analysis will facilitate the work, reducing the time spent on parameter tuning, and as consequence, on model fitting. It is also important to observe that the results suggest that parameters with minor relevance can be kept fixed, with no significant change in the accuracy of the model.

Medium composition for fermentation processes, which use hemicellulose hydrolysates as carbon source, frequently undergo changes due to variations in composition of the raw material. Sources for these variations are usually considerable, and one of the most important relates to the large variety of pretreatment methods and their conditions, what leads to distinct proportions of hemicellulose and cellulose, and consequently glucose/xylose fractions in fermentation broth. This wide variety in sugar compositions results in impacts on kinetics of fermentation. Thus, the parameter re-estimation will be constantly necessary to obtain accurate models. Additionally, the amount of inhibitors released during pretreatment methods may also change, which affect fermentation kinetics.

**Table 4.3.** Effect of kinetic parameters on xylose consumption, PB design

Factors	10 (h)		20 (h)		30 (h)		50 (h)		100 (h)		150 (h)		200 (h)		250 (h)	
	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p
$\mu_{max}$	<b>1.292*</b>	<0.001	<b>3.024*</b>	<0.001	<b>5.126*</b>	<0.001	<b>9.785*</b>	<0.001	<b>16.774*</b>	<0.001	<b>12.993*</b>	<b>0.001</b>	6.382	0.159	1.414	0.772
$P_{max}$	-0.044	0.709	0.076	0.767	0.475	0.272	<b>2.259*</b>	<b>0.014</b>	<b>12.770*</b>	<0.001	<b>18.229*</b>	<0.001	<b>19.510*</b>	<b>0.001</b>	<b>18.090*</b>	<b>0.003</b>
$Y_x$	<b>-0.945*</b>	<0.001	<b>-2.138*</b>	<0.001	<b>-3.623*</b>	<0.001	<b>-7.465*</b>	<0.001	<b>-17.901*</b>	<0.001	<b>-20.098*</b>	<0.001	<b>-17.560*</b>	<b>0.002</b>	<b>-15.317*</b>	<b>0.008</b>
$Y_{p/x}$	<b>-0.275*</b>	<b>0.035</b>	<b>-0.827*</b>	<b>0.007</b>	<b>-1.752*</b>	<b>0.001</b>	<b>-4.888*</b>	<0.001	<b>-16.776*</b>	<0.001	<b>-22.837*</b>	<0.001	<b>-23.556*</b>	<0.001	<b>-20.604*</b>	<b>0.001</b>
$K_s$	0.154	0.203	0.355	0.183	0.603	0.170	1.239	0.173	2.936	0.252	-0.306	0.917	-0.659	0.879	-0.178	0.971
$K_i$	<b>1.143*</b>	<0.001	<b>2.666*</b>	<0.001	<b>4.501*</b>	<0.001	<b>8.517*</b>	<0.001	<b>14.112*</b>	<0.001	<b>9.503*</b>	<b>0.007</b>	6.446	0.155	4.863	0.330
$n$	-0.006	0.961	-0.183	0.478	-0.611	0.165	<b>-2.369*</b>	<b>0.018</b>	<b>-9.194*</b>	<b>0.003</b>	<b>-9.339*</b>	<b>0.008</b>	-8.868	0.060	-4.792	0.337
$m_x$	<b>0.281*</b>	<b>0.031</b>	<b>0.657*</b>	<b>0.023</b>	<b>1.126*</b>	<b>0.019</b>	<b>2.259*</b>	<b>0.022</b>	4.490	0.092	1.818	0.537	1.695	0.696	2.398	0.625

\*Significance for 95% confidence level (effects with P level  $\leq 0.05$  (in bold) are considered significant)

**Table 4.4.** Effect of kinetic parameters on ethanol concentration, PB design

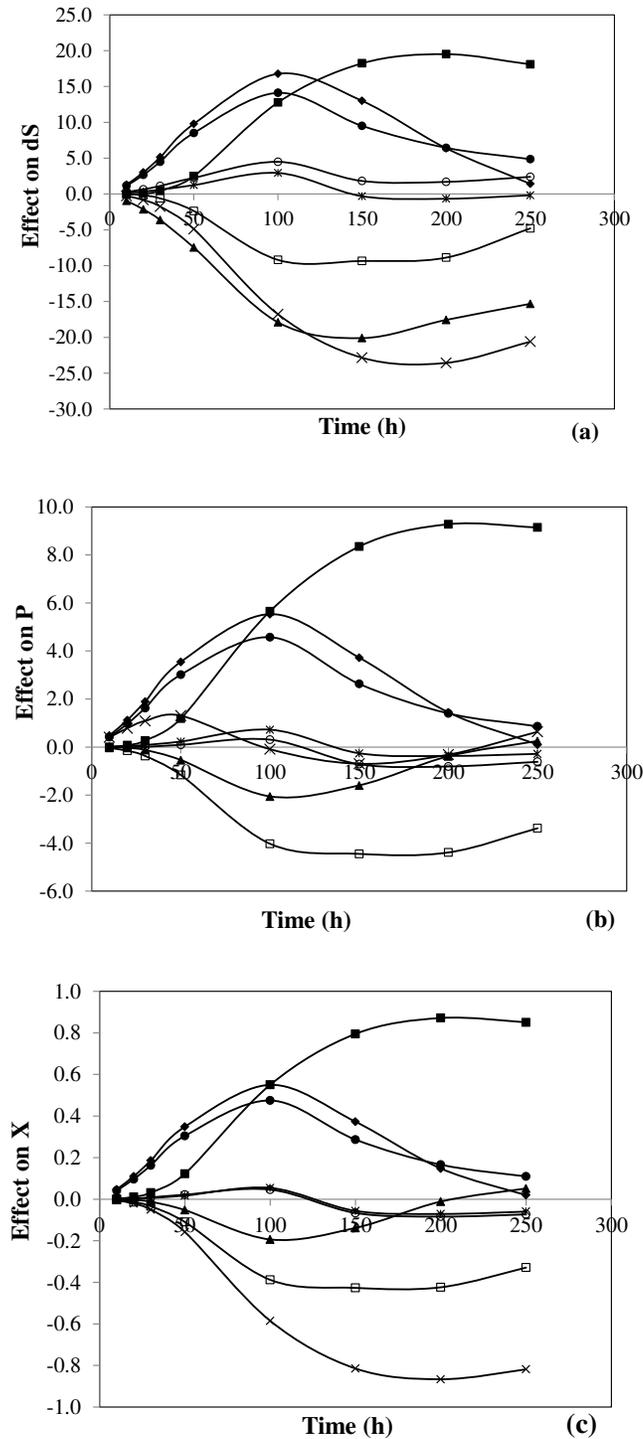
Factors	10 (h)		20 (h)		30 (h)		50 (h)		100 (h)		150 (h)		200 (h)		250 (h)	
	Effects	p														
$\mu_{max}$	<b>0.482*</b>	<0.001	<b>1.126*</b>	<0.001	<b>1.896*</b>	<0.001	<b>3.547*</b>	<0.001	<b>5.535*</b>	<0.001	<b>3.723*</b>	<0.001	1.444	0.159	0.106	0.920
$P_{max}$	0.002	0.914	0.076	0.076	<b>0.271*</b>	<b>0.002</b>	<b>1.182*</b>	<0.001	<b>5.654*</b>	<0.001	<b>8.349*</b>	<0.001	<b>9.277*</b>	<0.001	<b>9.143*</b>	<0.001
$Y_x$	<0.001	0.986	-0.032	0.422	-0.123	0.095	<b>-0.538*</b>	<b>0.007</b>	<b>-2.054*</b>	<b>0.003</b>	<b>-1.594*</b>	<b>0.012</b>	-0.384	0.696	0.254	0.811
$Y_{p/x}$	<b>0.403*</b>	<0.001	<b>0.784*</b>	<0.001	<b>1.088*</b>	<0.001	<b>1.309*</b>	<0.001	-0.090	0.874	-0.696	0.217	-0.316	0.747	0.636	0.552
$K_s$	0.014	0.407	0.042	0.300	0.086	0.228	0.230	0.189	0.724	0.218	-0.258	0.637	-0.369	0.707	-0.284	0.790
$K_i$	<b>0.415*</b>	<0.001	<b>0.967*</b>	<0.001	<b>1.623*</b>	<0.001	<b>3.014*</b>	<0.001	<b>4.574*</b>	<0.001	<b>2.628*</b>	<b>0.001</b>	1.402	0.171	0.863	0.423
$n$	<b>-0.039*</b>	<b>0.036</b>	<b>-0.153*</b>	<b>0.002</b>	<b>-0.371*</b>	<0.001	<b>-1.164*</b>	<0.001	<b>-4.027*</b>	<0.001	<b>-4.448*</b>	<0.001	<b>-4.388*</b>	<b>0.001</b>	<b>-3.382*</b>	<b>0.008</b>
$m_x$	-0.007	0.671	-0.006	0.881	0.010	0.883	0.094	0.580	0.307	0.590	-0.714	0.206	-0.809	0.416	-0.615	0.565

\*Significance for 95% confidence level (effects with P level  $\leq 0.05$  (in bold) are considered significant)

**Table 4.5.** Effect of kinetic parameters on biomass concentration, PB design

Factors	10 (h)		20 (h)		30 (h)		50 (h)		100 (h)		150 (h)		200 (h)		250 (h)	
	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p	Effects	p
$\mu_{max}$	<b>0.047*</b>	<0.001	<b>0.110*</b>	<0.001	<b>0.186*</b>	<0.001	<b>0.349*</b>	<0.001	<b>0.550*</b>	<0.001	<b>0.373*</b>	<0.001	0.147	0.121	0.020	0.840
$P_{max}$	0.002	<0.001	<b>0.011*</b>	<b>0.003</b>	<b>0.032*</b>	<0.001	<b>0.122*</b>	<0.001	<b>0.550*</b>	<0.001	<b>0.795*</b>	<0.001	<b>0.872*</b>	<0.001	<b>0.851*</b>	<0.001
$Y_x$	<0.001	0.962	-0.004	0.238	-0.012	0.061	<b>-0.052*</b>	<b>0.014</b>	<b>-0.194*</b>	<b>0.011</b>	<b>-0.138*</b>	<b>0.020</b>	-0.011	0.899	0.051	0.597
$Y_{p/x}$	<b>-0.006*</b>	<0.001	<b>-0.021*</b>	<0.001	<b>-0.050*</b>	<0.001	<b>-0.158*</b>	<0.001	<b>-0.585*</b>	<0.001	<b>-0.815*</b>	<0.001	<b>-0.866*</b>	<0.001	<b>-0.819*</b>	<0.001
$K_s$	0.001	0.333	0.003	0.315	0.006	0.321	0.017	0.360	0.054	0.412	-0.056	0.288	-0.071	0.436	-0.060	0.540
$K_i$	<b>0.041*</b>	<0.001	<b>0.096*</b>	<0.001	<b>0.163*</b>	<0.001	<b>0.304*</b>	<0.001	<b>0.475*</b>	<0.001	<b>0.287*</b>	<0.001	0.166	0.085	0.109	0.270
$n$	<b>-0.003*</b>	<b>0.006</b>	<b>-0.014*</b>	<b>0.005</b>	<b>-0.034*</b>	<0.001	<b>-0.110*</b>	<0.001	<b>-0.388*</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.427*</b>	<0.001	<b>-0.424*</b>	<b>0.001</b>	<b>-0.329*</b>	<b>0.005</b>
$m_x$	0.001	0.2678	0.004	0.216	0.008	0.201	0.022	0.248	0.046	0.484	-0.066	0.215	-0.084	0.360	-0.073	0.455

\*Significance for 95% confidence level (effects with P level  $\leq 0.05$  (in bold) are considered significant)



**Figure 4.1.** Main effects of the kinetic parameters on the profile of  $dS$  (a),  $P$  (b) and  $X$  (c) using PBSA design with 95% confidence level. Symbols: ■ ( $P_{max}$ ), ● ( $K_i$ ), \* ( $K_s$ ), ○ ( $m_x$ ), □ ( $n$ ), ◆ ( $\mu_{max}$ ), ▲ ( $Y_x$ ), × ( $Y_{p/x}$ ).

Andrade et al. (2009) also applied PB method in a mechanistic model for the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. According to the authors the most significant parameters in this case were  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_x$  and  $Y_{p/x}$  in a total of 11, and the updating of this 4 parameters are necessary to describe accurately experimental data even in the presence of changes in operational conditions. The same 4 parameters were significant in the study with *S. stipitis* proposed here, but the values of parameter impact on profiles of  $dS$ ,  $X$  and  $P$  were different. In this work,  $K_i$  and  $n$  were also significant for  $dS$  and  $X$  profiles, although the significance was of minor impact comparing to the other parameters. Even in the case of different strains of yeast using different kinds of substrate and metabolic routes it is possible to observe that the PB sensitivity analysis can be easily applied, as to any fermentation process, and this makes it useful for any kind of process analysis.

For the ethanol production becomes economically competitive, it is necessary to ensure high productivity, yield and conversion of substrate into product. To promote it, the use of controllers and optimizers becomes crucial. The use of suitable models capable of predicting kinetic behavior for longer periods of operation, even with the variability of raw material composition, is a key factor to obtain a successful process control. On the other hand, the parametric re-estimation becomes necessary always when changes in operational conditions occur. Obtaining a robust mathematical model that accurately describes the kinetic behavior of certain yeast in certain industrial plant can be a complex and time consuming task. Furthermore, even if mechanistic mathematical models have been proposed to describe the alcoholic fermentation process, they are only valid in the conditions used for their development. In this way, in order to decrease the complexity of parametric re-estimation, a PB method should be developed to select the most significant parameters of the model, and once reduced the number of parameters to be re-estimated, reduced also are the difficulty and time spent on this task.

#### 4.4. Conclusion

The application of the Plackett-Burman method for the sensitivity analysis design as developed in this work for the screening of the most significant kinetic parameters on the alcohol production by *S. stipitis* was satisfactory, simple and useful, requiring relatively low time even when a great number of parameters are involved. Furthermore, it was also shown that the right set of significant parameters can change according to the main focus on the modeling process, which can still reduce somewhat the complexity of the problem. It can also be concluded that setting the least significant kinetic parameters, it is possible to perform a fast re-estimation procedure without major differences in the model profiles. The most relevant parameters for all profiles ( $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_x$ ,  $n$  and  $Y_{p/x}$ ) must be necessarily adjusted in case of change in the operational conditions to obtain a robust model.

#### References

- [1] Wyman, CE: What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. Trends Biotechnology 2007, 25(4):153-157.
- [2] Balat M, Balat H, Oz C: Progress in bioethanol processing. Prog Energ Combust 2008 34(5):551-573.
- [3] Balat M, Balat H: Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. Appl Energ. 2009, 86(11):2273-2282.
- [4] Sanches OJ, Cardona CA: Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Biresourcer Technol. 2008, 99(13):5270-5295.
- [5] Urean P, Nguyen NHA: Optimized Fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. Appl Biochem Biotechnol. 2013, (169):1895-1909.

- [6] Liang M, Kim MH, He QP and Wang J: Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2013, 1-8.
- [7] Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F: New improvements for lignocellulosic ethanol. Current opinion in biotechnology 2009, (20):372-80.
- [8] Kurtzman CP, and Suzuki M: Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Bajeviola, Meyeroozyma, Millerozyma, Priceomyces and Scheffersomyces. Mycoscience 2010, (51):2-14.
- [9] van Dijken JP, van den Bosch E, Hermans JJ, de Miranda LR, Scheffers WA: Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. Yeast 1986, (2):123-127.
- [10] du Preez JC, van Dreissel B, Prior BA: Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. Appl Microbiology Biotechnology 1989, (30):53-58.
- [11] Ferrari MD, Neirotti E, Albornoz C, and Saucedo E: Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. Biotechnology Bioengineering 1992, (40):753-759.
- [12] Jeffries T and Shi NQ, Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. Advanced Biochemistry Eng Biotechnology 1999, (65):117-161.
- [13] McMillan JD, Xylose fermentation to ethanol: a review. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (1993).
- [14] Franceschini G, Macchietto, S: Model-based design experiments for parameter precision: State of the art. Chemical Engineering Science 2007, (63) 4846-4872.
- [15] Farias, D.; de Andrade, R.R.; Maugeri, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. Appl Biochem Biotechnol 2014, 172(1):361-79.

[16] Andrade RR, Rivera EC, Atala DIP, Maciel R, Maugeri F, Costa AC: Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization. *Bioprocess Biosyst Eng* 2009, 32:673-680.

[17] Rivera EC, Costa AC, Andrade RR, Atala DIP, Maugeri F, Maciel R: Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes. *Biochemical Eng J* 2007, 36(2):157-166.

[18] Starfield AM, Bleloch AL 2nd ed. Edina, MN: Burgess Press; 1991. *Building Models for Conservation and Wildlife Management*.

[19] Beres DL and Hawkins DM: Plackett-Burman technique for sensitivity analysis of many-parametered models. *Ecological Modelling* 2001, 141:171–183.

[20] Plackett RL, Burman JP (1946) *Biometrika* 33:305

[21] Rodrigues, M. I. and Iemma, A. F. *Experimental Design and Process Optimization*. Cárita Editora, Campinas (2012).

[22] Luedeking R, Piret, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation . Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

[23] Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition ed. New York: Mc Graw-Hill. 1986.



## CAPÍTULO 5

### **5. Kinetic modeling of a fed-batch process to optimize an efficient production of second generation ethanol from xylose by *Scheffersomyces stipitis***

Artigo em fase de desenvolvimento para submissão em periódico científico. O artigo apresenta o desenvolvimento de um modelo matemático, considerando os efeitos inibitórios da concentração inicial de substrato e etanol acumulado no meio, para a determinação dos parâmetros cinéticos de cultivo durante experimentos realizados em batelada alimentada visando à maximização da produção de etanol de segunda geração a partir de pentoses pela linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124.



## 5. Kinetic modeling of a fed-batch process to optimize an efficient production of second generation ethanol from xylose by *Scheffersomyces stipitis*

Daniele Farias<sup>1\*</sup>, Rafael R. de Andrade<sup>2</sup>, Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Food Engineering, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Department of Exact and Earth Sciences, Federal University of São Paulo, UNIFESP, Diadema, São Paulo, Brazil

### ABSTRACT

A key step in any process that converts lignocellulosic biomass to biofuels is the efficient fermentation of all sugars found in the hydrolysate. In this work we performed fed-batch experiments using *Scheffersomyces stipitis*, and developed a kinetic model to predict the effect of ethanol production by this strain, during consumption of pentoses sugars. To better predict how this yeast behaves in fed-batch culture and to optimize the system performance, a kinetic balance model which describes the metabolism behavior of this microorganism was developed. The fed-batch kinetic model used considers inhibitory effects caused by substrate and ethanol concentration. The impact of xylose concentration in feed stream on sugar consumption and ethanol production was investigated. Fed-batch mode cultivation has been utilized to avoid overflow metabolism as well as to ensure an accurate balanced feeding of nutrient substrate into reactor. The operation in fed-batch mode with an optimized feeding rate and cell growth rate resulted in higher titer, yield, and productivity of ethanol compared with batch cultures. The maximum ethanol concentration achieved was 46.4 g.L<sup>-1</sup>, obtained for xylose concentration of 200 g.L<sup>-1</sup> in the feed stream. The ethanol yield and productivity in the optimized fed-batch culture was 1.1 and 2.3-fold than those in batch mode. The fed-batch strategy developed in this work was capable to achieve higher efficiency in second generation ethanol production by *Scheffersomyces stipites*, and these results might be useful to guide to future improvements in industrial scale.

**Keywords:** Fuel ethanol production, *Scheffersomyces stipitis*, Fed-batch fermentation, Kinetic modeling.

## 5.1. Introduction

One of the largest ethanol producers, Brazil plays an important role in the bioenergy scenario (Della-Bianca, 2013a). The Brazilian first-generation ethanol (1G) is produced primarily by fed-batch fermentation of sugarcane juice and/or molasses (Della-Bianca, 2013b). Second-generation ethanol (2G) uses lignocellulosic biomass as feedstock, which is composed of a mixture of hexose and pentose sugars. The efficient fermentation of this mixture which results from biomass hydrolysis is a significant bottleneck in the overall process (Hanly, 2013, Unrean and Nguyen, 2013). Nowadays, 1G bioethanol from sugarcane replaces ~1% of the gasoline used in the world, and the potential of this technology is far from being exhausted (Della-Bianca, 2013b). The rising world demand for 2G bioethanol to replace the use of gasoline leads to an interest in developing an economical lignocellulosic ethanol production process.

To promote a system for efficiently produce 2G bioethanol it is desirable to develop a process capable of converting all sugars present in the hydrolysate (mainly composed of hexoses and pentoses) into ethanol at high yield and titer in a short fermentation time (Unrean and Nguyen, 2013). Complete substrate utilization is a factor key for rendering lignocellulosic ethanol process economically competitive (Liang, 2013). However, few fermentative microbes that efficiently convert both hexose and pentose sugars to liquid fuels such as ethanol have been identified (Gowen, 2010; Gírio, 2010).

*Scheffersomyces stipitis* (formerly known as *Pichia stipitis*) (Kurtzman and Suzuki, 2010) was proposed as one of the potential cellulosic bioethanol strain for direct high-yield fermentation process without significant by-product formation (Liang, 2013; Jeffries, 2000; Ferrari, 1992). The most dominant feature of this unconventional yeast is that it's capable of catabolizing glucose, mannose, galactose, rhamnose, xylose, arabinose, cellobiose, and even some lignin-related compounds (Jeffries, 2009). In particular, this strain is able to ferment xylose to ethanol more efficiently than any other natural yeast reported thus far (Unrean and Nguyen, 2013). On the other hand, some metabolic mechanisms involved in the production of bioethanol in *S. stipitis* were unclear, such as the slow sugar consumption rate and the tough control of precise oxygenation (Grotjen *et al.*, 1990; Weierstall *et al.*,

1999). Besides, the kinetic behavior of *S. stipitis* was poorly characterized, which hinders the effective process manipulation to improve yield and productivity.

Previous works have demonstrated that the fermentation performance of *S. stipitis* strongly depends on cultivation and process conditions (Slininger *et al.*, 2006; Agbogbo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Ferreira, *et al.*, 2011; Unrean, 2012; Unrean and Nguyen, 2013; Farias *et al.*, 2014). An efficient production of ethanol by *S. stipitis* from lignocellulosic biomass with high yield, productivity, and titers has to be developed yet. Inefficient conversion of biomass-derived sugars, hexoses and pentoses, into ethanol is major obstacles to the industries relying on process development (Unrean and Nguyen, 2013). Considering this scenario, there is a clear need for optimization of fermentation process of *S. stipitis*. In a previous work developed by Farias *et al.* (2014) the kinetic behavior during xylose fermentation by *S. stipitis* was investigated in order to identify favorable conditions to improve ethanol production in batch and chemostat modes and evaluated the inhibitory levels for xylose and ethanol on *S. stipitis* kinetic behavior. Batch mode experiments have several limitations preventing it from achieving high ethanol production. It occurs because in batch mode, commonly experiences inhibitory effect caused by high initial concentration of sugars and ethanol produced, as well by the accumulation of undesirable by-products, which could lead to reduction in ethanol yield and productivity (Riesenber *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2014). Farias *et al.* (2014) reported that high concentration of xylose resulted in more xylitol by-product being produced and, concomitantly a reduction in ethanol yield. This work also showed a higher ethanol production in *S. stipitis* at reduced cell growth. This relationship between cell growth and ethanol production was an apparent limitation in achieving high volumetric productivity of ethanol with *S. stipitis* (Unrean and Nguyen, 2013; Farias *et al.*, 2014).

To overcome these drawbacks, is essential the development of fed-batch processes in which experiments with optimized cell growth rate and substrate uptake will be maximized for ethanol production. Fed-batch mode is often desirable because it allows substrate addition to a batch bioreactor as the reaction occurs (Bailey and Ollis, 1986). The fed-batch mode is a special type of batch process where the substrate is continuously fed in the reactor during the fermentation process in order to maintain substrate concentration

constant, or nearly constant, resulting in a system with variable volume. This strategy of feeding substrate control avoids substrate inhibition, and accumulation of undesired by-products, maintaining low sugar levels, thereby minimizing catabolic repression, or extending the stationary phase by substrate addition, and thus producing additional ethanol, which is required for achieving high yield and productivity (Bailey and Ollis, 1986; Hong *et al.* 1986; Huang *et al.* 2004; Nor *et al.*, 2011; Unrean and Nguyen; 2013).

In Brazil, around 85% of the distilleries which produce 1G bioethanol are fed-batch processes (Godoy *et al.*, 2008). Aimed at developing processes that can integrate 2G ethanol production under current technological scenario of the Brazilian industry, this work investigate the establishment of an efficient fed-batch process of xylose into ethanol by *S. stipitis*. For the first time in the literature a kinetic mathematical model for fed-batch culture during xylose consumption by *S. stipitis*, considering the inhibitory effects caused by substrate and ethanol concentration was developed. To promote an efficient fed-batch process an adequate concentration of sugar in the feed medium is crucial to prevent both catabolic repression and accumulation of unwanted products, as well as for the effective ethanol formation. For this reason, in this work different sugar concentrations were tested to investigate an efficient feed strategy based on kinetic behavior of *S. stipitis* on fed-batch mode. Substrate feed rates were calculated from kinetic parameters obtained from chemostat and batch mode reported by Farias *et al.* (2014), such as specific growth rate, specific sugar uptake rate, and yield of ethanol. The fed-batch strategy and variable sugar concentration in the feed medium was applied to achieve high titers and yields of ethanol by *S. stipitis*. The results presented here might be useful for improvement the use of *S. stipitis* in scale-up studies for 2G bioethanol production.

## **5.2. Material and Methods**

### **5.2.1. Microorganism and inoculum preparation**

The microorganism used in the experiments was the *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 strain provided by ARS Culture Collection (NRRL), United States Department of Agriculture. The strain presents the ability to metabolize five-carbon (C5) sugars to produce ethanol. The yeast was regularly maintained in slants with GYMP composition

(g.L<sup>-1</sup>): agar nutrient 20; glucose 10; yeast extract 5; malt extract 20 and monobasic sodium phosphate 2, at 4°C in the Laboratory of Bioprocess Engineering/School of Food Engineering/Unicamp, Campinas, Brazil. The activation was performed in two steps in a medium at pH 5.0. Subsequently, the yeast growth was performed for 24 h at 28°C in a rotary shaker at 150 rpm in a GYMP medium without agar. In the second step the yeast was grown in a mineral medium with the same composition used in bioreactor during 24 h at 28°C and 150 rpm. The composition of mineral medium was described in Farias *et al.* (2014). The yeast and the malt extract were used to supplement the minerals, amino acids and vitamins required to promote cell growth. The assays were performed using a defined medium containing pure xylose, in order to study the fermentation performance.

### **5.2.2. Sterilization**

The sterilization of the medium was performed in an autoclave at 121°C for 15 min. To minimize variation in medium composition (and more especially in the initial xylose concentration), the solutions of xylose were cold sterilized separately using a sterile system of cellulose ester membrane, 0.2 µm of pore diameter (model Minikap HF Filter MK2M-512-V6S, Sprettrum Laboratories, Inc., Fl, USA) and aseptically added to the system according to each predefined concentration.

## **5.3. Fermentations**

### **5.3.1. Batch cultures**

Experiments in batch mode were carried out in a 2 L Bioflo III bioreactor (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) with 1.5 L of initial working volume at initial xylose concentration of 50 g.L<sup>-1</sup>. The bioreactor temperature and pH were controlled at 28 °C, and 5.0, respectively. For pH control sterilized solutions of NaOH 2 N and HCl 2N were added. Aeration and agitation were kept at 0.05 vvm and 200 rpm, respectively (Farias *et al.*, 2014). The seed culture, grown in the two steps, as described above, was inoculated in the reactor to give an initial OD<sub>600</sub> of approximately 0.1-0.2. Samples were taken periodically

for measurement of cell concentration, sugars, and ethanol. The assays initiated in batch mode until complete the exhaustion of xylose, and posteriorly, fed-batch operation was initiated.

### 5.3.2. Fed-batch cultures

Fed-batch cultures were carried out in the same conditions as described for the batch mode. The culture was started as a batch mode, with initial volume of 1.5 L until the total substrate depletion. The culture was then switched to fed-batch mode. In the fed-batch mode, the sterile feed solution, which was the same medium as the batch mode, started been pumped by a peristaltic pump into the reactor. The dilution rate was  $0.01 \text{ h}^{-1}$ , and it was defined on the base of the rate of substrate consumption investigated in previous work (Farias *et al.*, 2014). The temperature, pH, aeration, and agitation were kept at the same values as batch cultures. The mass amount of the feeding medium was monitored during cultivation. Samples were collected periodically for measurement of cell concentration, residual sugar, and ethanol. The concentrations of xylose changed in the feed medium according experimental planning and were 100, 150 and  $200 \text{ g.L}^{-1}$ . The feeding was carried out until the maximum working volume (approximately 2.5 L) was reached.

The liquid level in the reactor was controlled by a float-type switcher produced by Madison Co. model M5000. A supervisory software was developed in LabVIEW 10.1 language to promote supervision and data acquisition, and also to promote the accurate control of the process, enabling monitoring the process variables in real time.

### 5.2.4. Analytical methodology

Yeasts concentration was gravimetrically determined, after centrifuging 2 mL of each sample in triplicate for 10 min at 13.000 rpm, washing the precipitate twice with distilled water to remove soluble components and drying it in an oven kept at  $70^{\circ}\text{C}$ . The cell free supernatant, after dilution was used for the measure of xylose, xylitol, acetic acid, glycerol and ethanol concentrations in an ultra-performance liquid chromatograph (UPLC), model Accela, ThermoScientific, with an ion exchange HypeREX XP column. The temperature was maintained at  $30^{\circ}\text{C}$  with an eluent flow rate of  $1 \text{ mL.min}^{-1}$  (degassed and ultrapure

water with pH adjusted to 2.6 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Sugars, acids and alcohols were detected by refractive index (RI).

### 5.2.5. Fed-batch Mathematical Model

The mass balances of biomass, substrate and product) were carried out considering a variable reactor volume. In fed-batch mode, the global mass balance in the reactor is given by Eq. (1):

$$\frac{d(\rho V)}{dt} = \rho_A F \quad (1)$$

where  $\rho$  is the density of culture medium inside the reactor and  $\rho_A$  of the culture medium in the feed. Assuming  $\rho$  constant and equal to  $\rho_A$ , the feeding rate is given by Eq. (2):

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (2)$$

The kinetic rates related to the microorganism growth ( $r_x$ ), substrate consumption ( $r_s$ ), and ethanol formation ( $r_p$ ) can be written according to the mass balance in the reactor, and are given by Eqs. (3-5), respectively:

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_x V \quad (3)$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS - r_s V \quad (4)$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_p V \quad (5)$$

The growth rate expression for *S. stipitis* was the same used by *Farias et al.* (2014), as given by Eq. (6):

$$r_x = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S + (S^2 / K_i)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n * X \quad (6)$$

This equation was formed by a mixed model which considers the inhibitory effect caused by substrate concentration (S) and product (P) accumulated in the medium during the cell growth. The first term for substrate inhibition was proposed by Andrews (1968), where  $K_s$  is the substrate saturation parameter,  $K_i$  is the substrate inhibition coefficient and  $\mu_{max}$  is the maximum specific growth rate. The second term for ethanol inhibition was a non-linear generalized expression proposed by Levenspiel (1980), where  $n$  was an empirical parameter, and  $P_{max}$ , a parameter experimentally determined, which indicates the ethanol concentration where the microorganism growth ceases. Then, the rate for cell concentration for fed-batch mode (Eq. 10), can be achieved considering the inhibitory effect promoted by the substrate and ethanol, replacing Eq. (6) in Eq. (3), and by applying elementary rules of differentiation one obtains Eq. 10:

$$\frac{dXV}{dt} = \left[ \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + (S^2 / K_i)} \left( 1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^n \right] * XV \quad (7)$$

$$X \frac{dV}{dt} + V \frac{dX}{dt} = \left[ \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + (S^2 / K_i)} \left( 1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^n \right] * XV \quad (8)$$

Considering  $\frac{dV}{dt} = F$

$$XF + V \frac{dX}{dt} = \left[ \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + (S^2 / K_i)} \left( 1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^n \right] * XV \quad (9)$$

$$\frac{dX}{dt} = \left[ \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + (S^2 / K_i)} \left( 1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^n - \frac{F}{V} \right] * X \quad (10)$$

The rate of substrate consumption is described by Eq. (11):

$$r_s = \frac{r_x}{Y_x} + m_x X \quad (11)$$

The first term of Eq. (11) takes into account the substrate portion consumed for growth, and second fraction, the energy used for maintenance of existing cells (respiration,

motility, solutes transport through membranes).  $Y_x$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and  $m_x$  denote the limit cellular yield and/or maintenance parameter.

In fed-batch mode, rate of substrate consumption is achieved replacing Eq. (11) in Eq.(4), to obtain Eq.(13):

$$\frac{dSV}{dt} = FS_a - \left( \frac{r_x}{Y_x} + m_x X \right) V \quad (12)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_a - S) - \left( \frac{r_x}{Y_x} + m_x X \right) \quad (13)$$

For ethanol formation, it was used the Luedeking and Piret (1959) expression, which considers the product formation rate ( $r_p$ ) proportional to the cell growth rate ( $r_x$ ) and cell concentration ( $X$ ), as show in Eq. (14).  $Y_{p/x}$  ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) is the product yield based on cell growth, and  $m_p$ , the ethanol production associated with growth ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).

$$r_p = Y_{p/x} r_x + m_p X \quad (14)$$

According to Bailey and Ollis (1986), the ethanol formation is associated to biomass growth, in the exponential growth phase. Thus, values of  $m_p$  (shown in Eq. 14) are very close to zero, and consequently the first term presents major contribution. This behavior was observed for *S. stipitis* during consumption of xylose to produce ethanol (Farias *et. al*, 2014), therefore the parameter  $m_p$  (Eq.14) was not considered.

The product balance in fed-batch mode is obtained replacing Eq. (14) in Eq. (5), obtaining Eqs. (15-16):

$$\frac{d(PV)}{dt} = (Y_{p/x} r_x + m_p X) V \quad (15)$$

$$\frac{dP}{dt} = (Y_{p/x} r_x + m_p X) - P \frac{F}{V} \quad (16)$$

### 5.3. Results and Discussion

#### 5.3.1. Fed-batch Culture

Fed-batch process was implemented to avoid the inhibitory effect of high sugar concentration and overflow metabolism, which resulted in efficient ethanol fermentation by *S. stipitis*. Time course for cell, substrate and ethanol concentrations in batch and fed-batch modes for *S. stipitis* are shown in Figure 5.1, for substrate concentration in feed stream of 100 (1a), 150 (1b) and 200 gL<sup>-1</sup>(1c). For fed-batch stage, the optimized feed medium composition was determined according to experimental data from Farias *et al.* (2014), considering the substrate uptake rate and the substrate concentration in the feed culture medium so to maintain constant and low substrate concentrations inside the reactor. The experiments were divided in two steps. In the first step, the run was performed in batch mode at initial xylose concentration of 50 g.L<sup>-1</sup> until complete substrate exhaustion. After, the fed-batch step was started, with different xylose concentrations in the feed stream. The results for batch and fed-batch fermentations were summarized in Table 5.1.

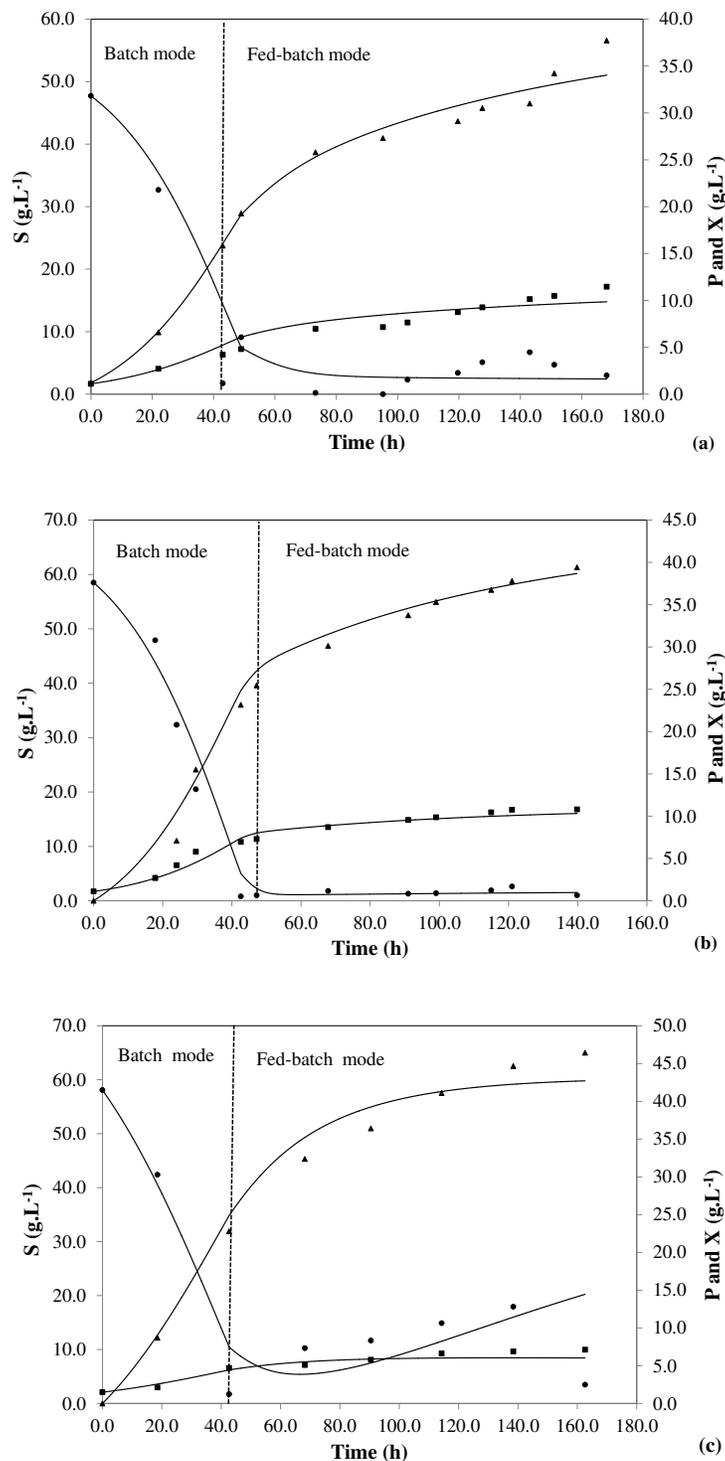
According to Figure 5.1 (a, b and c), it is possible to note that the batch mode step was conducted until about 40 h, for all experiments. The microorganism grew exponentially in batch culture and keep on growing in fed-batch culture. The ethanol concentration continuously increased in all cases and reached a maximal value of 46.4 g.L<sup>-1</sup> for the xylose concentration of 200 g.L<sup>-1</sup>. The ethanol concentration in fed-batch mode was then 2.21 fold higher than in batch culture (21 g.L<sup>-1</sup>) at 50 g.L<sup>-1</sup> of initial xylose. In fact, *S. stipitis* can withstand an alcohol concentration as higher as 55 g.L<sup>-1</sup>, as reported by Farias *et al.* (2014). Also, according to Ladisch and Dyck (1979), the ethanol concentration in fed-batch mode meets the established threshold range of the ethanol concentration that is of a technological interest for the economically recoverable range, and besides, the fermentation time is shorter than in batch mode, which is also of economical interest.

**Table 5.1.** Comparison of kinetic parameters performance between batch and fed-batch cultures

<b>Kinetic parameters</b>	<b>Batch*</b> <b>50 g.L<sup>-1</sup></b>	<b>Fed-batch</b> <b>100 g.L<sup>-1</sup></b>	<b>Fed-batch</b> <b>150 g.L<sup>-1</sup></b>	<b>Fed-batch</b> <b>200 g.L<sup>-1</sup></b>
Cell yield (g.g <sup>-1</sup> )	0.07	0.12	0.11	0.06
Cell titer (g.L <sup>-1</sup> )	4.7	11.4	11.8	7.13
Ethanol titer (g.L <sup>-1</sup> )	21.1	38.7	39.4	46.4
Ethanol yield (g.g <sup>-1</sup> )	0.39	0.43	0.40	0.38
Ethanol productivity (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.26	0.30	0.43	0.58

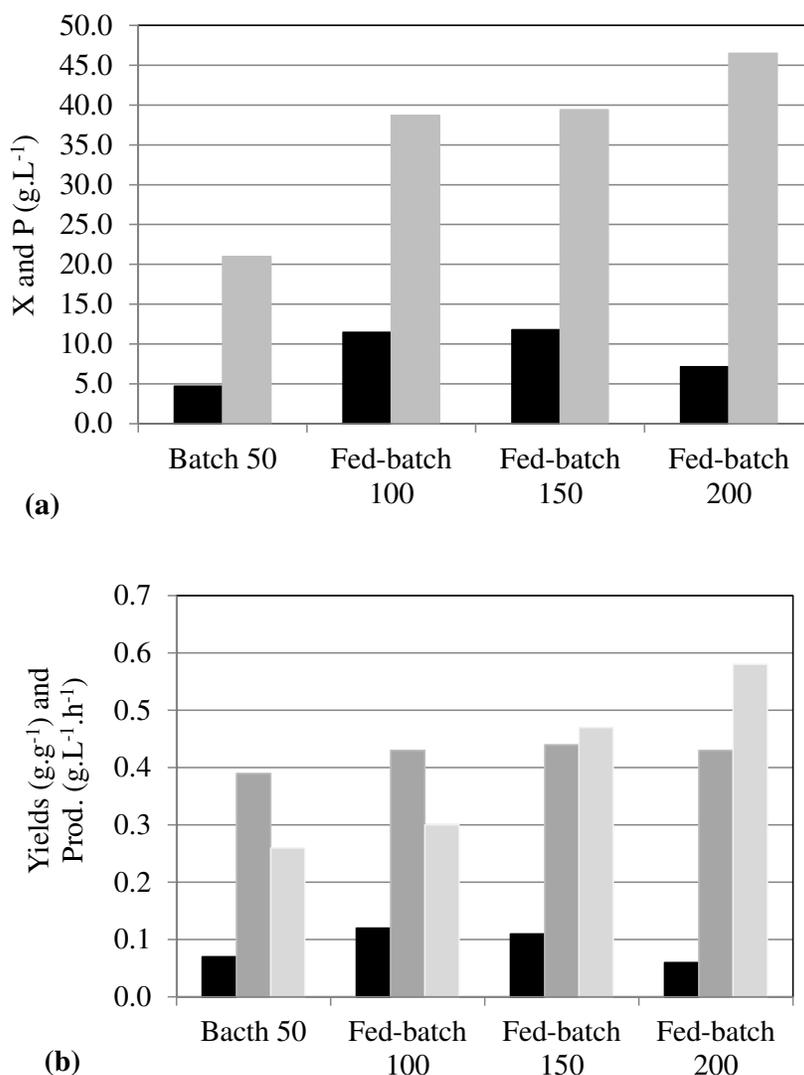
\*Cell was initially grown at 50 g.L<sup>-1</sup> of xylose during batch runs correspondent to a  $\mu_{max}$  value of 0.232 h<sup>-1</sup>

Cell yield was reduced from 0.12 to 0.06 g.g<sup>-1</sup> when the initial sugar concentration on fed-batch mode was raised from 100 to 200 g/L. This was likely due to the osmotic stress caused by high sugar concentration. Ethanol productivity in fed-batch mode was higher than in batch mode, which suggested that the feeding adopted (corresponding to  $D = 0.01 \text{ h}^{-1}$ ) was appropriated to promote a very efficient ethanol production as the microorganism was well capable of maintaining the substrate concentration in the reactor at low levels for all the cases (see Fig. 5.1a, b and c). This finding was consistent with previous report by Krahulec *et al.* (2012); Unrean and Nguyen, (2013) and Farias *et al.* (2014) who reported a decrease in ethanol yield at the elevated sugar concentration due the redirection of the carbon flow towards xylitol by-products instead of ethanol. This overflow metabolism of xylitol production is a result of an incomplete recycling of NAD(P)H cofactors of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in the xylose utilization pathway (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1986; Chu and Lee, 2007). However, despite the lower cell yield in fed-batch mode performed at 200 g.L<sup>-1</sup>, this condition led to a higher ethanol titer and productivity. Also, for assays in fed-batch mode at feed concentration of 100 and 150 g.L<sup>-1</sup>, cell and ethanol yields were higher than the obtained in batch. The efficient ethanol production was possible because the sugar concentration was low inside the reactor. Thus, fed-batch fermentation is preferred to minimize osmotic stress caused by high sugar concentration, which could then speed up sugar utilization and ethanol accumulation. Data showed the efficiency of the applied fed-batch strategy for production of ethanol at high yield and titer, and high productivity compared to batch culture.



**Figure 5.1.** Experimental (symbols) and predicted (solid lines) data (—) at 100 g.L<sup>-1</sup> (a), 150 g.L<sup>-1</sup> (b) and 200 g.L<sup>-1</sup> (c) of xylose concentration in the feed medium. Symbols: concentration of substrate, S (●); cell mass, X (■); and ethanol concentration, P (▲).

Comparison between fermentation performances in batch and fed-batch cultures is shown in Figure 5.2. In both modes, the results of ethanol yield were similar (next to 0.4 g.g<sup>-1</sup>). The highest productivity was 0.58 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (for initial xylose concentration in feed stream of 200 g.L<sup>-1</sup>) and it was 2.23 fold higher than the productivity obtained for batch mode (0.26 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).



**Figure 5.2.** Ethanol production by *S. stipitis*: comparison between batch at initial xylose concentration of 50 g.L<sup>-1</sup> and fed-batch modes at initial xylose concentration in the feed stream of 100 g.L<sup>-1</sup>, 150 g.L<sup>-1</sup> and 200 g.L<sup>-1</sup>. (a) Cell (black bars) and ethanol (dark grey bars) concentrations and (b) cell yield ( $Y_{xs}$ , black bars), ethanol yield ( $Y_{ps}$ , dark grey bars), and ethanol productivity (light grey bars).

### 5.3.2. Development of a kinetic model for xylose fermentation by *S. stipitis*

The development of a mathematical model enables the design of a process control and the scale up of a fermentation system. Measured concentration of ethanol, cell and substrate in batch and fed-batch cultures was compared with the predicted values computed by the model. Osmotic stress caused by high sugar concentration and inhibitory effect caused by ethanol concentration becomes significant, therefore causing deviations between measured and the model prediction data. To improve the accuracy of the model, these inhibitory parameters of ethanol were included in the model.

The mathematical model formed by Equations 6, 11 and 14 was previously used and validated by Farias *et al.* (2014) for alcoholic fermentation from xylose by *S. stipitis*. The model parameters include inhibition by substrate concentration and by ethanol.

### 5.3.3 Estimation of kinetic parameters by a Quasi-Newton (QN) algorithm

The parameters estimation procedure consists in finding values which minimize an objective function, formed by experimental data and results generated by the model simulation. Then, the optimization problem consists in minimizing Eq. (17), where  $\theta$  is the vector of kinetic parameters;  $Xe_n$ ,  $Se_n$  and  $Pe_n$  are experimental data of cell, substrate and product concentrations at sampling time  $n$ .  $X_n$ ,  $S_n$  and  $P_n$  are the concentrations computed by the model in each sampling time, and  $Xe_{max}$ ,  $Se_{max}$  and  $Pe_{max}$  are the maximum measured concentrations,  $np$  is the number of samples.  $\varepsilon_n(\theta)$  is the minimized error.

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[ \frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \varepsilon_n(\theta) \quad (17)$$

The relevant kinetic parameters were fitted to experimental data for cell accumulation, substrate consumption and ethanol production. The system described by Eqs. (6; 11; 14) is composed by eight parameters that can be fitted on the base of experimental observations. For this purpose, data from fed-batch fermentations shown in Table 5.2 were used. Among 8 parameters, 3 were fitted through the quasi-Newton (QN) algorithm:  $Y_{p/x}$ ,

$Y_x$ ,  $m_x$ . The remaining ones were fixed by Farias *et al.* (2014):  $\mu_{max} = 0.232 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_s = 1.67 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $K_i = 1.67 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $P_{max} = 56.0 \text{ g.L}^{-1}$  and  $n = 2.5$ . For simultaneous estimation of the kinetic parameters, a DBCONF routine from Compaq Visual Fortran version 6.6, based on quasi-Newton algorithm was used.

**Table 5.2.** Initial conditions for substrate, biomass, ethanol concentrations and model parameters to be estimated for experiments in fed-batch mode performed at different xylose concentration in the feed medium. The remaining parameters were fixed as follow:  $\mu_{max} = 0.232 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_s = 1.67 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $K_i = 20.0 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $P_{max} = 56.0 \text{ g.L}^{-1}$  and  $n = 2.5$

Initial conditions/parameters	Xylose concentration in feed medium ( $\text{g.L}^{-1}$ )		
	100	150	200
X ( $\text{g.L}^{-1}$ )	1.1	1.1	1.5
S ( $\text{g.L}^{-1}$ )	47.7	58.5	58.1
P ( $\text{g.L}^{-1}$ )	0.2	0.1	0.1
$Y_{p/x}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3.59	4.79	9.03
$Y_x$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0.12	0.11	0.07
$m_x$ ( $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0.020	0.020	0.020

#### 5.3.4. Experimental versus predicted culture times courses

Figure 5.1 indicate that the kinetic model adequately represents growth and xylose fermentation under a variety of starting conditions described on Table 5.2. Model predictions of cell concentration and ethanol production time courses were particularly good. However, there are a few discrepancies between observed and predicted time courses for xylose uptake profile, mainly for fed-batch performed at  $200 \text{ g.L}^{-1}$  in the feed medium. The model failed to predict the complete exhaustion of substrate at the end of batch and fed-batch modes. On the other hand, as the accuracy of prediction of the model consists in minimizing Eq. (17) and values very close to zero have been achieved in all the predictions performed, we consider that the model was able to adequately describe the kinetic profile of the alcoholic fermentation of xylose during fed-batch mode.

For initial estimation of  $Y_x$ ,  $Y_{p/x}$  and  $m_x$ , data from the previous work by Farias *et al.*, 2014, were used.  $Y_x$  and  $Y_{p/x}$  varied with xylose concentration in the feed medium, except  $m_x$ , the maintenance coefficient, which changed lightly between experiments so that it was kept constant in all situations and equivalent to the average of all values. Nevertheless, in comparison with batch runs performed in a previous work (see Farias *et al.*, 20014), which evaluated the kinetic behavior of *S. stipitis* during xylose consumption at different initial

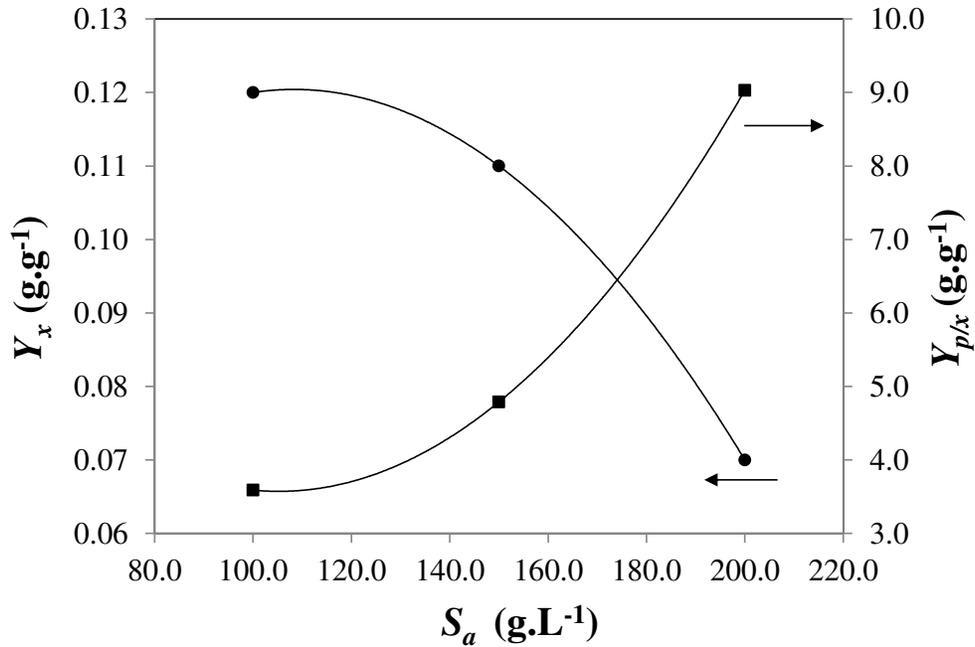
substrate concentration (9.2-145 g.L<sup>-1</sup>), the maintenance coefficient achieved for the fed-batch cultures was lower (0.020 g.g<sup>-1</sup> at fed-batch mode; 0.27 g.g<sup>-1</sup> at batch mode), showing that less substrate was needed for maintenance requirements in this kind of fermentative process. This occurs because during fed-batch runs the supply rate of xylose remains constant over time. In this way, biomass concentration will increase and consequently the availability of substrate for each individual cell decreases over time. So, during fed-batch runs at optimized feed medium strategy it was possible to improve yeast behavior during xylose consumption and then less energy was spent for basic cell functions, such as maintenance ( $m_x$ ), in comparison with batch runs.

In Figure 5.3,  $Y_x$  is shown to be rather a function of initial xylose concentration in the feed medium. It can be seen that the increase of the xylose concentration during fed-batch runs from 100 to 200 g.L<sup>-1</sup>, decreased  $Y_x$ , and this decrease is more accentuated at 200 g.L<sup>-1</sup>. During fed-batch cultures performed at 100 g.L<sup>-1</sup>, the  $Y_x$  value was maximum (0.12 g.g<sup>-1</sup>) and this value achieved was much higher than batch runs at the similar conditions (around 0.05 g.g<sup>-1</sup>) described by Farias *et al.* (2014). This difference probably happened due to the improvement in the biomass accumulation when fed-batch runs are performed in comparison with batch runs, as explained above.

On the other hand,  $Y_{p/x}$  values increased with xylose concentration in the feed medium in the range considered (Fig. 5.3). The minimum value was 3.59 g.g<sup>-1</sup> at 100 g.L<sup>-1</sup>, and increased to around 9.03 g.g<sup>-1</sup> at 200 g.L<sup>-1</sup>, suggesting that ethanol yield in relation to cell mass is higher in high xylose concentrations. The same behavior for  $Y_x$   $Y_{p/x}$  was found in Farias *et al.*, 2014. It also important to note that the results of  $Y_{p/x}$  during fed-batch runs diminished when compared to batch runs performed at similar conditions. In this work the decrease of ethanol yield in relation to cell ( $Y_{p/x}$ ) occurred possibly due to the salt accumulation in the medium, leading to increase of osmotic pressure when fed-batch runs were performed, reducing consequently product formation. The values of  $Y_{p/x}$  and  $Y_x$  can be written as polynomial functions of xylose concentration in the feed medium ( $S_a$ ), according to Eqs. 18 and 19, respectively, and can be used in futures works

$$Y_{px} = 6 \times 10^{-4} S_a^2 - 0.128 S_a + 10.31 \quad R^2 = 0.99 \quad (18)$$

$$Y_x = -6 \times 10^{-6} S_a^2 + 0.001 S_a + 0.05 \quad R^2 = 0.99 \quad (19)$$



**Figure 5.3.** Dependence of both QN fitted  $Y_{p/x}$  (■) and  $Y_x$  (●) with xylose concentration in the feed medium ( $S_a$ ) in fed-batch cultures. The symbols denote the optimized parameters by QN, and (—) the parameters fitting by polynomial regression. The kinetic behavior is corresponding xylose consumption under fed-batch runs.

The residual standard deviation (RSD), Eq. (20), written as a percentage of the average of the experimental values, was the measurement used for characterizing the quality of model fitting.

$$RSD(\%) = \left( \sqrt{RSD} / \bar{dp} \right) \cdot 100 \quad (20)$$

where  $RSD = \frac{1}{n_p} \sum_{p=1}^{n_p} (d_p - x_p)^2$ , in which  $x_p$  and  $d_p$  are, respectively, the value predicted by the mathematical model and experimental value,  $\overline{d_p}$  is the average of the experimental values and  $n_p$  is the number of experimental points.

The RSD were computed for all the experiments and the values are shown in Table 5.3. It can be noticed that biomass, substrate and ethanol concentrations present deviations from 6.3 to 25.4 %. Higher RSDs were obtained for substrate uptake data (25.4 % for the experiment at xylose concentration in the feed medium of 200 g.L<sup>-1</sup>). This can be explained due to the poor fit of the model to substrate concentration. However, the RSD (%) values for biomass and ethanol concentrations were quite low, what suggests an overall good fit of the model to experimental data. Farther fitting assays may well be necessary for more accurate description to substrate profile, mainly if to the model is reserved a more demanding task as process scale-up.

**Table 5.3.** Residual standard deviations (%RSD) for X, S and P at different xylose concentration in the feed medium during fed-batch runs

Variable	Fed-batch runs - Xylose concentration in feed medium (g.L <sup>-1</sup> )		
	100	150	200
X	12.8	10.6	11.7
S	22.5	20.5	25.4
P	6.3	7.5	7.1

In the search of ways to improve ethanol productivity, some approaches in minimizing the inhibitory effects promoted by xylose and ethanol to the yeast metabolism have been considered as major interest. Recently, Unrean and Nguyen (2013) have proposed a kinetic model for *S. stipitis* NRRL Y-714 to design feeding profile during fed-batch fermentation from a mixture of xylose and glucose (67 and 200 g.L<sup>-1</sup>, respectively). The authors also obtained a good efficiency during fed-batch runs (P = 40.7 g.L<sup>-1</sup> with productivity of 0.42 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), but the model did not consider inhibition by ethanol, which is a pitfall, since at higher ethanol concentrations inhibition is the prevalent phenomenon, and there will certainly be poor fit to experimental data. In fed-batch this fact can be rather critical since ethanol can reach very high titers, and in order to improve the accuracy of the

model, not only ethanol effect but all inhibitory parameters to the process must be included in the model.

Since our model was based on experiments in a synthetic medium, it does not account for the effect of inhibitors that may occur in natural acid hydrolyzates of hemicellulose. With additional experiments, this analysis could be applied also to the case of different pentose compositions, as from hemicellulosic hydrolysates. It should be noted that inhibitors such as acetate or furfural are commonly present in actual hydrolysate. In order to evaluate the effect caused by the inhibitors present in the hydrolysate, a mathematical model with kinetic parameters considering the effect caused by these inhibitors on sugar concentration and ethanol production should be developed. While nutrient content will likely impact model performance, determining these inhibitory parameters is essential for future research for second generation ethanol.

#### **5.4. Conclusions**

Fed-batch mode has been used to avoid overflow metabolism caused by the overfeeding of a substrate. As a result, maintaining low sugar concentration in reactor was a key to obtain an efficient ethanol production by *S. stipitis* from xylose. Optimal feed medium concentration was necessary to improve the ethanol production from xylose. It was possible to achieve high yield, titer and productivity of ethanol in fed-batch mode with the optimized rate of feed medium. The feed strategy was based on a kinetic model, considering the inhibition effect caused by ethanol and substrate concentrations. In the fed-batch the yield, titer, and productivity of ethanol were higher compared with those obtained in batch fermentation. The optimized feed strategy proposed and used in this work can lead to an efficient fermentation process by shortening fermentation times, improving yields and productivities, which consequently reduces production costs, making the process more attractive and economically viable.

## References

- Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K., & Jeffries, T. W. The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007, 137:653–662.
- Andersson, L., Stranberg, L., Haggstrom, L., & Enfors, S. O. Modeling of high cell density fed-batch cultivation. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994, 14:39–44.
- Andrews, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotech. and Bioeng.* (1968), 10(6):707:723.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Second Edition ed. New York: Mc Graw-Hill. 1986.
- Cho, Y. H., Song, J. Y., Kim, K. M., Kim, M. K., Lee, I. Y., Kim, S. B., Kim, H. S., Han, N. S., Lee, B. H., & Kim, B. S. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *New Biotechnology*. 2010, 27: 341–346.
- Chu, B. C., & Lee, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances*. (2007) 25, 425–441.
- Della-Bianca, B.E.; A.K., Gombert. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013a, 104:1083-1095.
- Della-Bianca, B.E.; Basso, T.O.; Stambuk, B.U.; Basso, L.C.; Gombert, A.K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013b, 97(3):979-991.
- Farias, D.; de Andrade, R.R.; Maugeri, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 172(1):361-79.
- Ferreira, A. D., Mussatto, S. I., Cadete, R. M., Rosa, C. A., & Silva, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. *Yeast*. 2011, 28:547–554.
- Gírio, F.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; & Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101:4775–4800.
- Godoy, A.; Amorim, H.V.; Lopes, M.L.; Oliveira, A.J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *Int Sugar J*. 2008, 110:175–181
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microb> and Biotech.* (2007) 74, 937–953.
- Hanly, T. J. and Henson, A. M. Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Biotech. for Biouels*. 2013, 6:44.

Hong, J. Optimal substrate feeding policy for a fed batch fermentation with substrate and product inhibition kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. 1986, 28:1421–1431.

Huang, H., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 2004, 27:63–69.

Jeffries, T. W., & Van Vleet, J. R. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. *FEMS Yeast Research*. 2009, 9:793–807.

Jeffries, T. W. and Jin, Y. S.: Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts, *Adv. Appl. Microbiol.* 2000, 47: 221-268.

Krahulec, S., Kratzer, R., Longus, K., & Nidetzky, B. Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation. *Microbiologyopen*. (2012). 1: 64–70.

Kurtzman CP, and Suzuki M: Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Bajejiella*, *Meyeroozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 2010, (51):2-14.

Ladisich, M. R., & Dyck, K. Dehydration of ethanol: New approach gives positive energy balance. *Science*. 1979, 205:898–900.

Levenspiel, O. The monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol. Bioeng.* (1980), 22 (8):1671–1687.

Lee, J., Rodrigues, R. C., & Jeffries, T.W. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface. *Biores Technol.* 2009, 100:6307–6311.

Liang M, Kim MH, He QP and Wang J: Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2013, 1-8.

Luedeking, R.; Piret, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation . Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

Nor, Z. M., Tamer, M. I., Scharer, J. M., Moo-Young, M., & Jarvis, E. J. Automated fed-batch culture of *Kluyveromyces fragilis* based on a novel method for on-line estimation of cell specific growth rate. *Biochemical Engineering Journal*. 2001, 9:221–231.

Riesenberg, D. High-cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1991, 2:380–384.

Silva, J. P., Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162:1306–1315.

Slininger, P. J., Dien, B. S., Gorsich, S.W., & Liu, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRLY-7124. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 72:1285–1296.

Unrean, P., & Nguyen, N. H. Rational optimization of culture conditions for the most efficient ethanol production in *Scheffersomyces stipitis* using design of experiments. *Biotech Prog.* 2012, 28:1119–1125.

Unrean P, Nguyen NHA: Optimized Fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013, (169):1895-1909.

## CAPÍTULO 6

### **6. Montagem e instrumentação do protótipo experimental C5-REV (Retentostato extrativo a vácuo)**

Este capítulo aborda questões relacionadas com a montagem e a instrumentação do processo fermentativo extrativo. A montagem do sistema fermentativo partiu de um protótipo experimental inicialmente concebido por Atala (2006) para produção de etanol de primeira geração que, após realizações de diversos ensaios e testes preliminares, precisou ser modificado para se adequar às restrições tecnológicas resultantes do uso do micro-organismo em estudo (*Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124).



## **6. Montagem e instrumentação do protótipo experimental C5-REV (Retentostato extrativo a vácuo)**

### **RESUMO**

Ensaio preliminares possibilitaram evidenciar que o consumo de açúcares C5 pelo micro-organismo *S. stipitis* é um processo lento, e fortemente inibido por concentrações de açúcar e etanol. O processo de produção de etanol 2G por esta linhagem necessita de condições operacionais de agitação e aeração específicas para estimular a rota metabólica de produção de etanol e não desviar o fluxo de carbono para o acúmulo de biomassa. Dentre as dificuldades operacionais encontradas durante os testes preliminares realizados com o protótipo experimental inicialmente concebido por Atala (2006) (dados não apresentados), verificou-se a dificuldade de manutenção do sistema estéril por longos períodos, e, conseqüentemente, não foram obtidos resultados satisfatórios. Para contornar estes inconvenientes operacionais e fisiológicos foi desenvolvido então outro protótipo experimental, com possibilidade de ser operado na forma totalmente asséptica, em processos contínuos abertos, semi-abertos do tipo batelada alimentada, e no que se convencionou chamar ‘retentostato extrativo a vácuo’, e fechados, caracterizados pelas bateladas simples.. Na tecnologia caracterizada pelo ‘retentostato’, o meio fermentativo é constantemente alimentado ao reator e efluente é removido, mantendo reciclo total de células no reator através do acoplamento de um sistema de ultrafiltração conectado na linha de efluente. Para a instrumentação do protótipo experimental proposto foram utilizados transmissores de pressão e vácuo, boias de nível, válvulas solenoides, bombas peristálticas micro processadas, entre outros. O acondicionamento e a conversão dos sinais fornecidos, sendo eles analógicos e digitais de entrada e saída, foram realizados com equipamentos fabricados pela *National Instruments* modelo *Field Point 1600* e *Enet-232/4*. Esta instrumentação permite a implementação de controles e a monitoração de todas as variáveis do processo fermentativo extrativo em tempo real. Testes com solução de etanol em água e, posteriormente com meio fermentativo foram realizados demonstrando a funcionalidade e operacionalidade do processo ‘retentostato extrativo a vácuo’.

## 6.1. Introdução

A evolução contínua da área de controle de processos vem acontecendo principalmente em função da automação industrial, aliada aos expressivos avanços na área de informática. O controle automático tem desempenhado papel fundamental no avanço da engenharia e da ciência. Os avanços no controle automático vêm produzindo meios para otimizar o desempenho de processos dinâmicos, melhorar a produtividade, bem como para diminuir o trabalho árduo de várias rotinas de operações manuais repetitivas (Ogata, 2006). Além disso, visam à eliminação de possíveis riscos envolvidos na produção, diminuindo o contato direto dos operadores com as máquinas de produção, função esta agora que pode ser feita remotamente, via comando por computadores (Atala, 2006).

A automação industrial se torna necessária sempre que novas técnicas de controle são introduzidas no processo e está associada, concomitantemente, à necessidade de tornar o processo mais produtivo (Pupo, 2002; Silveira, 2006). Assim, é comum pensar que a automação pode acarretar na substituição da mão-de-obra de funcionários por máquinas ou simplesmente na redução dos custos de produção, no entanto, o foco é muito maior que este. Automação decorre muito mais de necessidades tais como maior nível de qualidade do produto final, reciclagem de funcionários, maior flexibilidade de modelos de processo para o mercado, maior segurança pública e de operários, menores perdas de material e energia, maior disponibilidade e qualidade da informação sobre o processo e melhor planejamento e controle da produção (Pupo, 2002; Moraes, 2007).

A automação se define então como um conjunto de técnicas que envolvem a implantação de sistemas interligados e assistidos por redes de comunicação por meio das quais se constroem sistemas ativos capazes de atuar com uma ótima eficiência através do uso de informações recebidas do meio sobre o qual atuam, sendo que o processo é então composto por um sistema supervisório (*software*) e por interfaces homem-máquina (interfaces gráficas) que auxiliam os operadores no exercício da supervisão, controle e análise de problemas que porventura venham a ocorrer (Silveira, 2006; Moraes, 2007).

De acordo com Atala (2006), a automação de um processo industrial ocorre através da implementação de sensores e atuadores comandados por operadores através de sistemas remotos. As medidas dos sensores e tomada de decisões dos atuadores são realizadas por sinais que transitam entre o sistema supervisório e a planta piloto. Conforme Silveira

(2006), com base nas informações recebidas, o sistema remoto calcula a ação corretiva mais apropriada para a execução da ação e esta é uma característica de malha fechada, conhecidas como sistemas de realimentação, ou seja, aquele que mantém uma relação expressa entre o valor de saída em relação ao da entrada de referência do processo. Essa relação entrada/saída serve para corrigir eventuais valores na saída que estejam fora dos valores desejados. Para promover tal intuito, são implantados os controladores que, por meio da execução de uma lógica algorítmica de um programa ou circuito eletrônico, comparam o valor atual com o valor desejado (*set-point*), efetuando assim os cálculos necessários para ajuste e correção do sistema. Assim, uma planta automatizada, com aquisição de variáveis em tempo real e munida de estratégias bem configuradas possibilita benefícios tanto ao produtor (aumento de produtividade, rendimento e qualidade, redução de custos e re-processos, etc), como ao consumidor final que disponibiliza de produtos mais qualificados e padronizados.

Apesar da automação industrial já encontrar-se bem difundida em praticamente todos os ramos industriais, na engenharia de bioprocessos ainda têm-se muito a pesquisar, principalmente no aprimoramento de processos que visam à produção de etanol de primeira e segunda geração, de maneira a proporcionar às usinas brasileiras processos eficientes e com elevados rendimentos e produtividades.

O programa Proálcool desenvolvido no Brasil na década de 70 estimulou diversas pesquisas para estimular a produção de etanol, no entanto, atualmente, as usinas produtoras de etanol combustível no país não são caracterizadas por grandes investimentos em automação e controle. Esta estagnação tecnológica no setor sucroalcooleiro se decorreu tanto em virtude das oscilações em relação à produção de etanol, sendo que no final da década de 90 o aumento do preço dos barris de petróleo acarretou na desaceleração do incentivo à produção deste combustível, como também pelo desconhecimento dos usineiros em relação aos benefícios de implantação de tecnologias automatizadas no processo.

Atala (2006) alavancou as pesquisas e avanços tecnológicos na produção de etanol 1G promovendo a automação e controle de um processo industrial fermentativo extrativo a vácuo, visando o consumo de açúcares C6 pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Visando aprimorar novas tecnologias que englobem a produção de etanol 2G, este trabalho objetivou desenvolver um processo automatizado que leva em conta as características

cinéticas e fisiológicas durante o consumo de açúcares C5 pelo micro-organismo *S. stipitis* NRRL-Y7124. Frente ao exposto, este capítulo detalha a montagem e instrumentação do protótipo experimental configurado para possibilitar a produção de etanol 2G, com detalhamento dos equipamentos, sensores e atuadores utilizados para promover a automação, monitoramento e controle do sistema.

## **6.2. Material e Métodos**

### **6.2.1. Equipamentos**

Para montagem do sistema fermentativo extrativo, foram necessários os seguintes equipamentos: i) fermentador; ii) sistema de microfiltração; iii) tanque *flash*, iv) bombas peristálticas; v) sistema de vácuo; vi) condensador, os quais estão descritos detalhadamente nas etapas subsequentes.

#### **6.2.1.1. Fermentador**

O biorreator utilizado no protótipo foi um *Bioflo III System* produzido pela *New Brunswick Scientific Corporation* (Inc., Edison, NJ), o qual consiste de uma cuba de vidro, com volume útil de aproximadamente 3 L, confeccionada para suportar temperaturas elevadas, necessárias para promover a esterilização do sistema. O biorreator é equipado com sistemas de controladores para manutenção das condições operacionais constantes (temperatura, pH, aeração, velocidade de agitação, adição de antiespumante).

Para manutenção da temperatura constante do sistema foi necessário o acoplamento de um banho térmico externo, capaz de promover a circulação de água a temperaturas inferiores à água da rede, devido à grande geração de calor durante o processo.

#### **6.2.1.2. Sistema de filtração**

As células foram recicladas e mantidas no sistema através de um sistema de microfiltração tangencial projetado e construído pela *Millipore Co.*, modelo *Ceraflow*. A técnica de microfiltração é aplicada quando se deseja a separação de partículas em

suspensão, neste caso a concentração de biomassa no reator, baseando-se na dimensão dos poros da unidade filtrante.

O microfiltro é composto por uma fina membrana permeável, suportada em material cerâmico, que retém partículas de determinado tamanho (biomassa) e permeia outras pequenas partículas dissolvidas ou suspensas no meio, incluindo o solvente (meio fermentativo). Portanto, a característica de retenção de uma membrana é função direta do diâmetro de seus poros. O princípio da filtração se baseia no gradiente de pressão entre a parte interna do filtro e a parte externa, de modo que o permeado migre através dos poros da unidade filtrante, e o líquido retido retorna ao sistema.

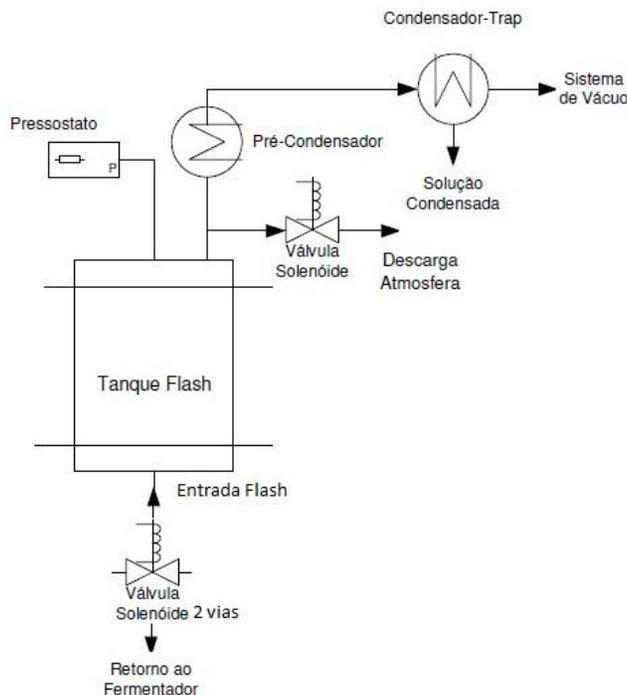
O elemento filtrante acoplado ao sistema é do tipo inorgânico externo feito de alumina de alta pureza, de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro, 0,0372  $\text{m}^2$  de área filtrante e 22,8 cm de comprimento, montados internamente numa carcaça de aço inox 316. O conjunto filtrante possui um manômetro para controle da pressão interna do filtro e válvulas diafragmas modelo 4196-862 em aço inox 316, que possibilitam o controle da passagem de fluido pelo sistema, bem como controle da pressão interna do sistema de filtração. Membranas inorgânicas são extremamente estáveis a altas temperaturas e sob fortes tensões, o que significa que estas podem ser repetidamente esterilizadas no local e são ideais para trabalhar em altas pressões.

### **6.2.1.3. Tanque *flash***

O tanque *flash* é o equipamento no qual é promovida a extração de etanol do meio fermentativo através da aplicação de pressões negativas (vácuo), na temperatura do processo fermentativo é decorrido. De acordo com Atala (2006), o vácuo do tanque *flash* deve estar dentro da faixa de 100 a 150 mmHg para promover uma extração eficiente, pois quanto maior o vácuo aplicado ao sistema, maior será a concentração do etanol extraído. No entanto, devido à diferença de volatilidade de um componente em relação ao outro, parte da água do caldo fermentativo evapora juntamente com o etanol, reduzindo conseqüentemente a concentração do álcool no condensador, e, conseqüentemente, contribuindo para alterações no volume líquido do sistema.

A extração é promovida em períodos de tempo determinados pelo operador, e definidos através do acompanhamento da concentração de etanol no meio, de maneira a manter dentro do reator uma concentração constante e suficientemente baixa para evitar os efeitos tóxicos do etanol ao micro-organismo. Dessa forma, no momento da extração, uma bomba de vácuo era acionada e o meio fermentativo era enviado para o tanque *flash* devido à abertura de uma válvula solenoide posicionada na entrada do tanque, do tipo normalmente fechada, produzida pela *Asco Numatics*, e assim, devido a diferença de pressão (promovida pelo vácuo), o líquido mantido no reator era succionado para o tanque *flash* e a válvula solenoide era então fechada novamente para manter o líquido no tanque e promover a extração. Promovida a extração, o vácuo do sistema era quebrado através da abertura para atmosfera de outra válvula solenoide, também do tipo normalmente fechada, acoplada na saída do tanque. Quebrado o vácuo do sistema, a válvula solenoide da entrada do tanque *flash* era novamente acionada e, devido à diferença de altura de coluna d'água mantida entre o *flash* e o fermentador, o meio com menor concentração de etanol retornava ao reator, dando continuidade ao processo fermentativo.

O tanque *flash* foi construído em vidro pirex para facilitar a visualização e acompanhamento da entrada e saída do caldo fermentativo. Assim, eventuais problemas, como transbordamento e formação excessiva de espuma, podiam ser visualizados e eventualmente tratados. O tanque contém um volume total de 3,5 L com 52 cm de diâmetro e conseqüentemente uma altura de 25 cm. O *flash* possui uma configuração específica que possibilita trabalhar com altas e baixas pressões e consta de duas linhas principais: i) uma linha de alimentação e retorno do caldo fermentativo, proveniente do reator e ii) uma linha de retirada do evaporado produzido devido ao vácuo, ao qual também foi acoplado o sistema de quebra de vácuo, conforme apresentado na Figura 6.1.



**Figura 6.1.** Montagem e Instrumentação do tanque *flash*.

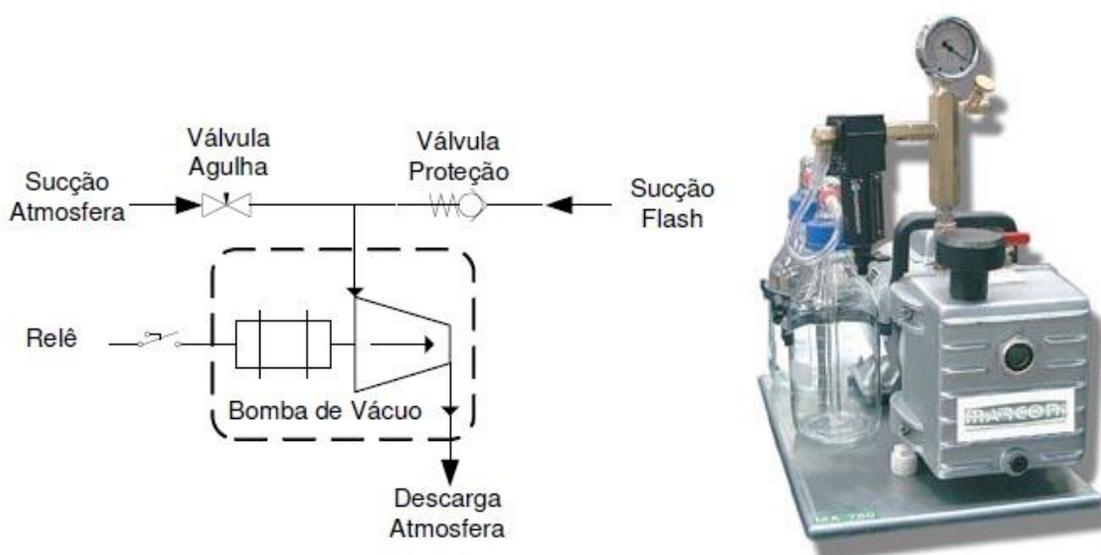
#### 6.2.1.4. Bomba peristáltica

Para o controle da vazão de entrada do meio fermentativo e saída do permeado (fluido que passa pelo filtro livre de células) foram utilizadas bombas peristálticas, especialmente concebidas para atuar pelo sistema supervisório, produzidas pela *Masterflex (Cole-Parmer International, USA)* modelo L/S. Essas bombas permitem ser operadas em diversas vazões de bombeamento com erro inferior a 5%, possibilitando estudar uma ampla faixa das taxas de alimentação e retirada de meio.

Para promover a circulação de meio pelo sistema de filtração foi utilizada outra bomba peristáltica, também produzida pela *Masterflex (Cole-Parmer International, USA)* modelo 7019-00, a qual possibilitava operar o sistema de filtração a uma pressão suficientemente alta para promover a circulação e permeação de meio pelo processo.

### 6.2.1.5. Sistema de vácuo

O vácuo do tanque *flash* foi fornecido através de uma bomba de vácuo de ar de compressão de dois estágios produzido pela Marconi modelo MA 760. Sua capacidade de sucção é de 10.000 L/h garantindo o vácuo do sistema independente do volume utilizado no tanque *flash*. A Figura 6.2 apresenta o esquema do sistema de vácuo, onde a bomba é acionada por um relê de estado sólido com comando de 0-10 V. No processo, a válvula agulha de sucção da atmosfera permanece totalmente fechada, sendo a sucção realizada somente do lado do tanque *flash*. Foi utilizada também uma válvula de proteção contra retorno para impedir que o vácuo seja quebrado quando a bomba estiver desligada.

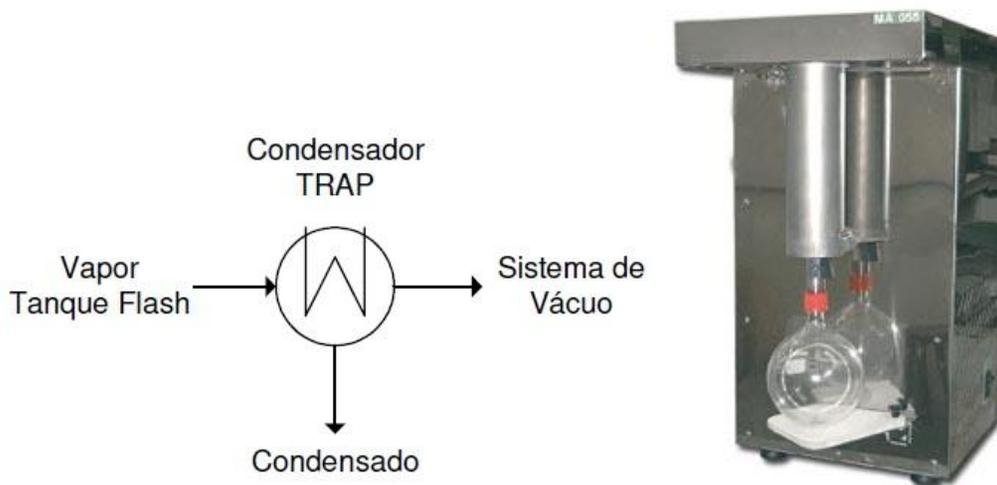


**Figura 6.2.** Montagem e instrumentação do sistema de vácuo.  
Adaptado de Atala (2006).

### 6.2.1.6. Condensador

O sistema de condensação foi realizado através de uma armadilha de vácuo (*trap*) ultratermostatizado conforme apresentado na Figura 6.3, produzido pela Marconi LTDA modelo MA-055. Este equipamento é ideal para condensar vapores voláteis de uma evaporação sob vácuo ou não, servindo como um ótimo protetor da bomba de vácuo. O sistema *trap* possui uma unidade de refrigeração com compressor hermético operando a uma temperatura de trabalho de  $-25^{\circ}\text{C}$ . Dessa forma, o vapor rico em etanol é transferido

por sucção pela linha de saída do tanque *flash* e é condensado imediatamente assim que entra em contato com o sistema refrigerado.



**Figura 6.3.** Sistema de condensação *trap*.  
Adaptado de Atala (2006).

## 6.2.2. Instrumentação

Para promover o monitoramento, controle e tomada de decisões *on line* do processo ‘retentostato extrativo a vácuo’ houve a necessidade de promover a instrumentação do sistema com a colocação de instrumentos de medição e atuação, bem como de acondicionamento e conversão de sinais analógicos e digitais.

### 6.2.2.1. Instrumentos de Medição e Atuação

Os sensores de medição e atuação acoplados ao processo para possibilitar o controle e monitoramento *online*, assim como os sinais fornecidos pelos mesmos, estão descritos detalhadamente na sequência. Após a adequada instalação e configuração dos mesmos no sistema supervisor, o aparato experimental ficou apto para realização dos testes experimentais para avaliar a operacionalidade e funcionalidade do sistema proposto.

#### A) Transmissor de Pressão Negativa (Vácuo)

O transmissor de pressão foi acoplado ao tanque *flash* para possibilitar o monitoramento e manutenção do vácuo no sistema. O transmissor de vácuo apresenta uma faixa de operação de 0 / -760 mmHg, sendo produzidos pela Markare LTDA, modelo STP 101. O instrumento de medição foi alimentado com uma tensão de 24 VDC sendo que o sinal de saída é de 4-20 mA, proporcional ao vácuo do sistema.

#### B) Medidor de Nível

O nível do fermentador foi controlado através de um chaveador tipo boia produzido pela *Madison Co.* modelo M5000. Quando o nível do reator estava baixo, o contato permanecia aberto e então ocorria o bombeamento da alimentação de meio fresco para dentro do reator através das bombas *Masterflex*. Quando o nível do reator atingia seu nível máximo, o contato era então fechado, fornecendo uma corrente de cerca de 1 mA, observada pelo sistema supervisor, parando então conseqüentemente a alimentação do reator pela bomba *Masterflex*, mantendo dessa forma o volume do sistema constante.

#### C) Válvulas solenoides

O sistema foi instrumentado com quatro válvulas solenoides. Duas delas foram utilizadas para o acionamento da bomba de vácuo produzidas pela *Asco Numatics*, modelo 8262 C13, sendo aplicadas: i) na sucção da atmosfera, do tipo normalmente aberta e ii) na sucção do tanque *flash*, normalmente fechada.

As outras duas válvulas, também produzidas pela *Asco Numatics*, modelo SC8210C087V, ambas do tipo normalmente fechada foram aplicadas: i) na entrada do tanque *flash*, para promover a sucção e/ou retorno do líquido do reator para o tanque e ii) na saída do tanque *flash*, com abertura para atmosfera, possibilitando promover a quebra de vácuo do sistema. Todas as válvulas foram alimentadas com uma tensão de 110 V e acionadas por um relê de contato com tensão de 24 VDC.

### 6.2.2.2. Acondicionamento e Conversão de Sinal

Após a aquisição, montagem e instalação de todos os equipamentos e instrumentos de medição e atuação com seus respectivos sinais, tornou-se necessário realizar o acondicionamento e a conversão destes sinais para possibilitar a comunicação do protótipo com o sistema supervisor de monitoramento e controle do processo. A Tabela 6.1 apresenta uma lista dos equipamentos e instrumentos de controle utilizados na montagem do protótipo, assim como os sinais fornecidos e o número de portas utilizadas. O total de sinais acondicionados para a monitoração e controle do processo foram 12, subdivididos em sinais do tipo (quantidade): digital serial (3), entrada analógica de 0-20 mA (2), termopares (1) e saída digital chaveadora (6 relês).

Para transmitir os sinais acima descritos e possibilitar a comunicação do protótipo experimental com o sistema supervisor foi utilizado o protocolo TCP/IP (*Transmission Control Protocol / Internet protocol*) padrão para transmissão de dados por redes de internet. O protocolo TCP/IP trata-se de uma linguagem usada para permitir a comunicação entre dois ou mais sistemas de dados. Dessa forma, para tornar possível a comunicação dos sinais analógicos e digitais aplicados no protótipo com o sistema supervisor, tornou-se necessária a conversão destes sinais para este protocolo, possibilitando assim a comunicação, e, conseqüente monitoramento do sistema.

**Tabela 6.1.** Tipo de sinal e quantidade de portas usadas pelos equipamentos e instrumentos de controle utilizados na montagem do protótipo experimental

Equipamentos (Qtd)	Canais	Sinal
Fermentador (1)	1	Sinal digital serial RS 232-C
Bombas peristálticas (3)	1	
Medidor de vazão (1)	1	
Transmissor de Vácuo	1	Entrada analógica 0-20 mA
Bóia de Nível (Reator)	1	
Temperatura (Sala)	1	Termopar
Relê de estado sólido (Bomba de vácuo/Sistema <i>flash</i> )	2	Saída digital (Relê) 24 VDC
Válvulas solenoides (Vácuo/Sistema <i>flash</i> )	4	

Os sinais digitais do sistema, baseados no protocolo de comunicação serial RS232C foram convertidos no padrão TCP/IP através da utilização do conversor ENET-232/4 produzido pela *National Instruments*, o qual possui entrada para 4 portas seriais. O

protocolo TCP/IP foi escolhido em virtude de que o protocolo RS232C possibilita a conexão de equipamentos em curtas distâncias, de até 15 metros, enquanto que o padrão TCP/IP possibilita conectar equipamentos através de HUB a uma extensão de até 100 metros, podendo assim promover o monitoramento do sistema a longas distâncias.

Os demais sinais do protótipo também foram convertidos para o protocolo TCP/IP pela utilização do conversor *Field Point* 1600 produzido pela *National Instruments*. No *Field Point* os sinais são acondicionados por módulos, sendo que cada módulo é responsável por determinado tipo de sinal de entrada ou saída, de acordo com a Tabela 6.2.

**Tabela 6.2.** Módulos *Field Point* usados para acondicionamento e comunicação dos sinais dos equipamentos e instrumentos

<b>Módulo <i>Field Point</i></b>	<b>Sinal</b>	<b>N° de canais</b>	<b>Tipo de sinal</b>
FP-AI-111	0-20 mA	16	Entrada analógica
FP-TC-120	Termopar	8	Entrada analógica
NI FP-AO-210	0-10 VDC	8	Saída analógica
FP-DO-403	Relê 5 a 30 VDC	16	Saída digital

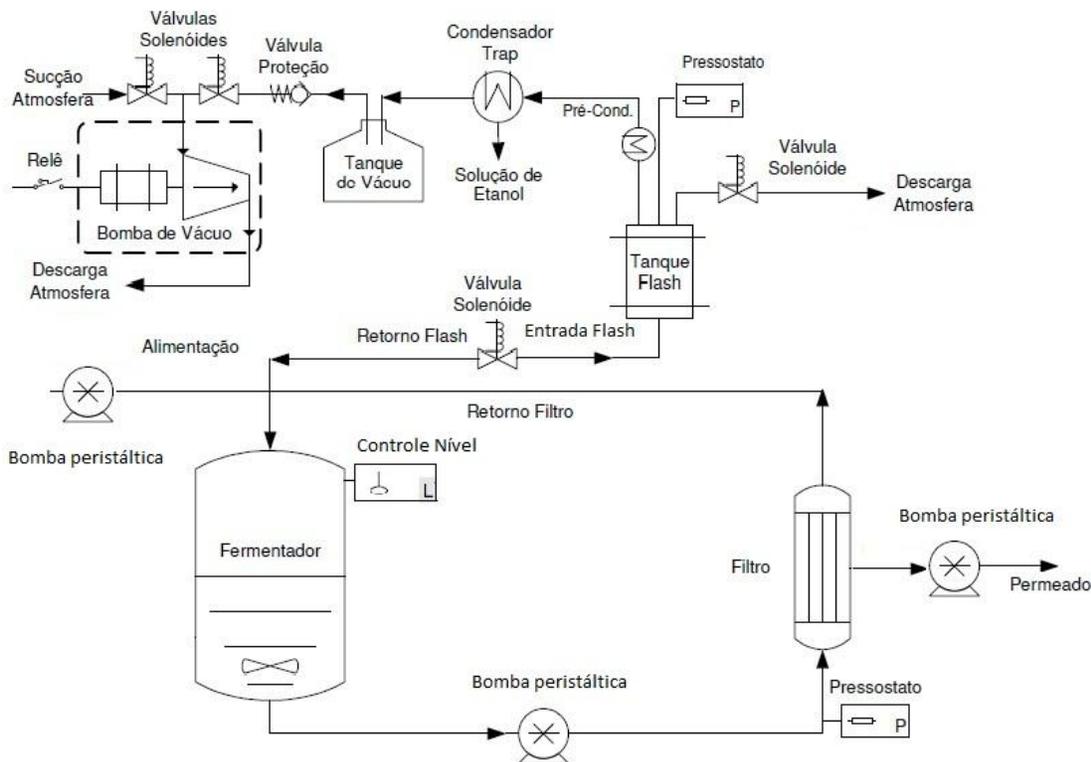
### 6.3. Testes e validação do sistema

#### 6.3.1. Protótipo experimental

O protótipo experimental utilizado neste estudo encontra-se esquematizado na Figura 6.4. A tecnologia utilizada aqui foi adaptada de um protótipo experimental proposto por Atala (2006). O protótipo desenvolvido possibilita operar um processo na forma asséptica, sem a presença de micro-organismos contaminantes, reduzindo de fatores provedores de estresse ao metabolismo da levedura. Este sistema conduz a obtenção de elevadas concentrações celulares (devido à aplicação do reciclo e retenção celular no reator) e opera em condições otimizadas que estimulam o consumo de substrato pelo micro-organismo, de maneira a proporcionar uma composição no reator apropriada (especialmente em relação às concentrações de xilose e etanol), evitando ou ao menos postergando a inibição do micro-organismo devido à eliminação destes fatores inibitórios. O sistema operando então em condições otimizadas, as quais consideram as características cinéticas da levedura em estudo (como velocidade de consumo de substrato, vazão de alimentação de substrato, manutenção de baixas concentrações de substrato e etanol no

meio) induz ao crescimento microbiano e promove a conversão de substrato em produto de maneira mais eficiente, possibilitando enfim a obtenção de elevados rendimentos e produtividades.

Durante os estudos do comportamento cinético da linhagem *S. stipitis*, descritos em Farias *et. al* (2014) foi possível constatar que a relação apresentada entre o crescimento celular, inibição pela concentração inicial de substrato e inibição pelo etanol acumulado têm se mostrado como principais fatores limitantes na obtenção de elevadas produtividades volumétricas na produção de etanol de segunda geração a partir pentoses. Dentro deste panorama, a construção deste protótipo experimental teve como objetivo investigar quantitativamente e qualitativamente o comportamento cinético do micro-organismo *S. stipitis* dentro de condições de 'crescimento nulo' possibilitando assim o consumo eficiente de pentoses visando à produção de etanol com elevados rendimentos e produtividades. Crescimento nulo é aqui definido como uma situação onde não há acréscimo na massa celular, no entanto o micro-organismo permanece metabolicamente ativo.



**Figura 6.4.** Protótipo experimental do 'retentostato extrativo a vácuo'  
Adaptado de Atala (2006).

### 6.3.2. Testes etanol-água

Com o intuito de testar a funcionalidade e operacionalidade do protótipo experimental proposto na Figura 6.4 testes experimentais com soluções alcólicas foram realizados. Para a realização destes testes, o processo foi operado no reator, onde ocorre o processo fermentativo propriamente dito, de maneira a simular o processo e testar a capacidade extrativa do sistema, bem como averiguar o adequado funcionamento dos instrumentos de medição e atuação. Para tal, com o auxílio de uma bomba peristáltica a solução alcólica do reator circulou através do sistema de filtração, com retorno do líquido para o reator, conforme apresentado na Figura 6.4. Solução alcólica foi constantemente alimentada ao reator, e permeada pelo filtro, também com auxílio de bombas peristálticas de maneira a testar o funcionamento dos mesmos e simulando assim o processo fermentativo a ser implementado. A alimentação de solução alcólica foi promovida até atingir o volume máximo de trabalho do sistema (aproximadamente 3 L). Após ser atingido o volume máximo, o nível do reator foi mantido constante com auxílio de uma boia de nível, controlada *on line* através do sistema supervisor, que será descrito nos capítulos subsequentes.

Para promover a etapa extrativa, a qual era feita por comandos operados manualmente, foi acoplado ao sistema um tanque *flash*, o qual promoveu a extração do etanol da solução alimentada, em períodos de tempo pré-determinados pelo operador. Através da etapa extrativa, a concentração de etanol no reator pode ser controlada em uma faixa constante, evitando, conseqüentemente, efeitos tóxicos ao micro-organismo pelo etanol acumulado no meio.

Para promover o teste da operacionalidade do processo, uma solução de etanol em água de aproximadamente 150 g/L foi inicialmente adicionada ao reator. No momento da extração, após acionamento do sistema de vácuo do tanque *flash* e abertura da válvula solenoide posicionada na entrada do *flash*, um volume controlado de solução alcólica foi transferido por sucção para o compartimento, promovendo assim a extração desejada. Depois de promovida a extração, o vácuo do sistema era quebrado através da abertura para atmosfera de outra válvula solenoide posicionada na saída do *flash*. Com a quebra do vácuo, a válvula posicionada na entrada do *flash* foi novamente aberta, possibilitando assim o retorno da solução alcólica para o reator, até o próximo ciclo de extração ser promovido.

Como o intuito do protótipo é promover uma concentração de etanol no reator constante e abaixo do valor tolerado pelo micro-organismo em estudo, é necessário que as extrações sejam realizadas concomitantemente à produção do mesmo no reator. De maneira a promover uma concentração baixa e constante no sistema foram avaliados diferentes ciclos de operação, com variações na faixa de vácuo aplicada, bem como avaliação do tempo de extração promovido, avaliando assim parâmetros importantes do processo como a taxa de extração de etanol (g/Lh), vazão de etanol recolhido no condensador (mL/h), além do vácuo máximo que pode ser aplicado ao sistema sem promover possíveis vazamentos e transbordamentos.

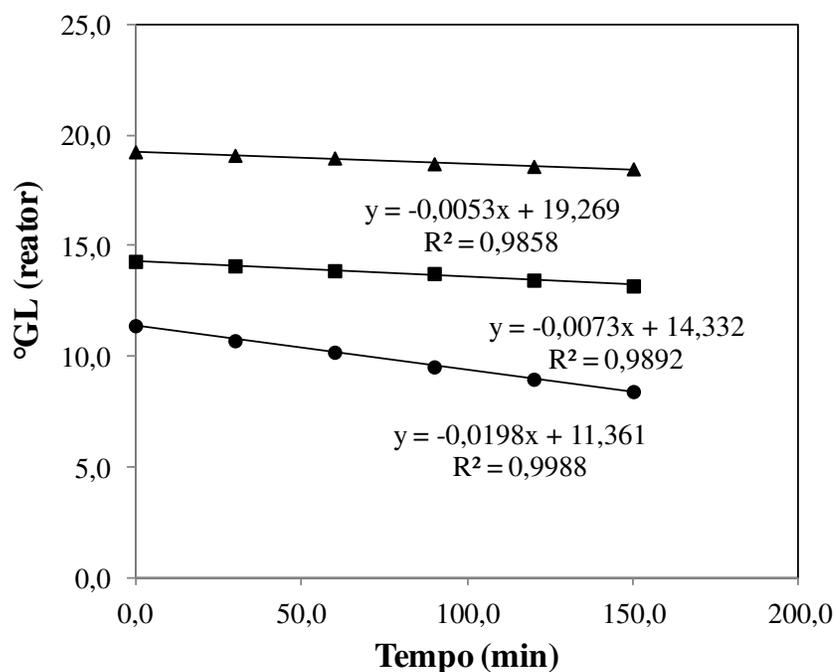
De acordo com Atala (2006) vácuo acima de 150 mmHg não é suficiente para promover uma extração suficiente, por outro lado níveis abaixo de 95 mmHg promovem formação excessiva de espuma do meio, devido à grande volatilidade provocada no meio bem como pelas características físico-química do processo fermentativo, podendo ocorrer então o transbordamento do tanque *flash*, desestabilizando assim o volume do processo, e, conseqüentemente, a condição de estado estacionário.

Testes preliminares (dados não apresentados) mostraram que a operação do protótipo experimental em alto vácuo (valores abaixo de 100 mmHg) provocavam vazamentos de ar através das conexões das válvulas solenoides do sistema, apesar da capacidade destas válvulas de operar nessa faixa, desestabilizando também o controle de vácuo no *flash*, bem como tornando o sistema suscetível a entrada de ar não estéril, possibilitando assim o risco de contaminações indesejáveis. Por outro lado, quando o sistema era operado na faixa de vácuo acima de 125 mmHg, nenhum vazamento foi evidenciado.

Frente a isso, a faixa de vácuo estudada nos testes dos ciclos de extração foi de 125 a 200 mmHg, de maneira a respeitar as características físico-químicas do meio fermentativo e possibilitar a extração do etanol produzido. Com o vácuo do sistema controlado é possível manter constante a taxa de extração no tanque *flash* e vazão de volume de etanol condensado, resultando então num processo constante e com resultados mais reprodutíveis e dentro de um padrão pré-determinado.

A Figura 6.5 apresenta perfil da variação da concentração de etanol no reator, conforme a faixa de vácuo aplicada. O sistema operou corretamente, sem a detecção de

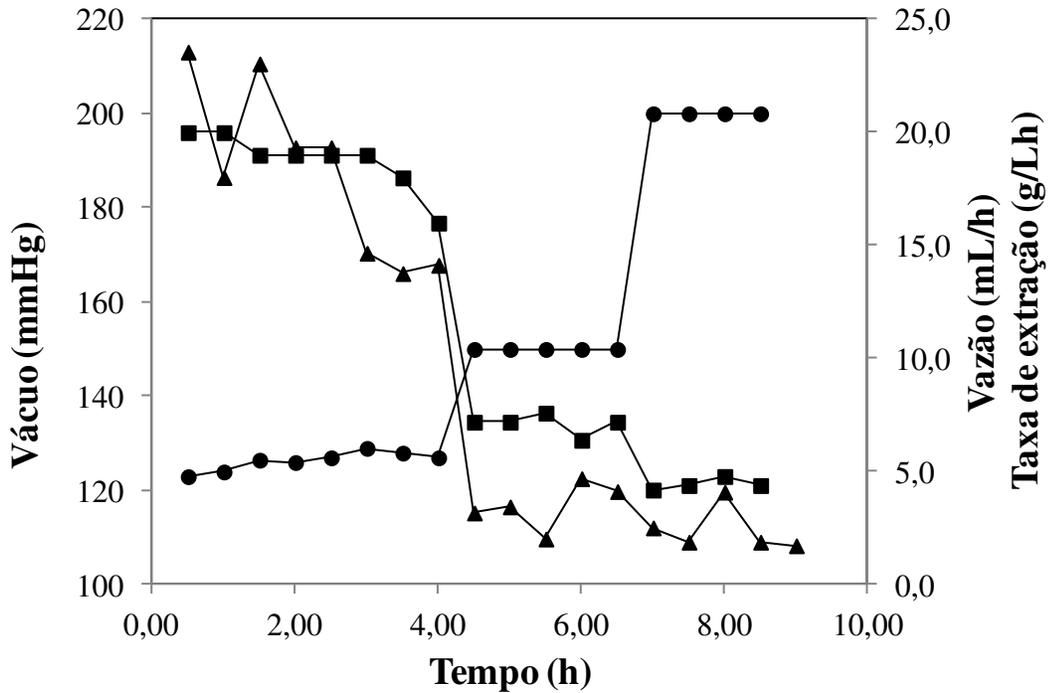
eventuais problemas, em ciclos de extração de 30 min cada, sendo que foram acompanhadas as concentrações de etanol no reator antes e após cada ciclo de extração. Com isso foi possível observar que as diferentes faixas de vácuo aplicadas provocaram diferentes perfis de extração, evidenciados pelas diferentes inclinações das retas expostas na Figura 6.5. A maior inclinação de reta foi obtida para o vácuo máximo testado (125 mmHg), o qual foi capaz de promover um perfil de extração mais eficiente comparado aos demais valores de vácuo aplicados.



**Figura 6.5.** Perfil de concentração de etanol no reator em função do tempo de extração e do vácuo utilizado no tanque *flash*, em ciclos de extração de 30 min cada, para os valores de vácuo de 125 mmHg (●), 150 mmHg (■) e 200 mmHg (▲)

Na Figura 6.6 é possível acompanhar o perfil do aumento do vácuo no tanque flash e sua influência no comportamento da vazão de condensado (mL/h) e na taxa de extração de etanol (g/Lh). Já a Tabela 6.3 apresenta de maneira detalhada os parâmetros obtidos nos testes de extração com a solução etanol em água. Através da análise dos resultados obtidos é possível detectar que a faixa de vácuo aplicada não influenciou significativamente a concentração de etanol obtida no condensador, sendo que estes valores encontram-se na

faixa de 310 g/L (aproximadamente 40°GL), independentemente do vácuo aplicado. Por outro lado o vácuo aplicado influenciou consideravelmente na taxa de extração de etanol (g/Lh), bem como na vazão de etanol recolhida no condensador (mL/h), sendo que a maior taxa de extração de etanol (7,80 g/Lh) foi obtida com vácuo de 125 mmHg, com vazão média de condensado de 17,2 mL/h. Quando foram aplicados vácuos de 150 e 200 mmHg a taxa de extração atingida foi menor (3,5 e 2,43 g/Lh, respectivamente) e a vazão média de etanol condensado foi drasticamente reduzida (7,14 e 4,20 mL/h, respectivamente).



**Figura 6.6.** Comportamento da taxa de extração de etanol no tanque *flash* e da vazão de etanol recolhida no condensador com o aumento do vácuo do sistema (125-200 mmHg). Símbolos: Vácuo em mmHg (●), Vazão de etanol condensado em mL/h (■) e Taxa de extração em g/Lh (▲)

**Tabela 6.3.** Acompanhamento dos parâmetros de extração no tanque flash

Vácuo (mmHg)	Vazão (mL/h)	Taxa extração (g/Lh)	Etanol no reator (g/L)		Etanol cond. (g/L)	°GL (cond)
			Início	Fim		
200	4,20	2,43	152,19	146,11	311,18	39,4
150	7,14	3,35	113,02	104,25	330,14	41,8
127	17,20	7,80	97,07	57,92	311,97	39,5

Com esse estudo foi possível verificar que a intensidade do vácuo repercutiu consideravelmente na taxa de extração, assim, com o intuito de promover uma extração eficiente, e, de maneira a manter no reator baixas concentrações de etanol, a faixa de vácuo adotada nos ensaios subquentes foi de 125 mmHg.

Os resultados encontrados permitiram adquirir conhecimento sobre o sistema, com a definição de parâmetros importantes do processo, como o tempo de cada ciclo de extração, tempo de abertura das válvulas solenoides de entrada e saída do *flash*, tempo necessário para o enchimento do *flash* no nível desejado, tempo de retorno de meio para o reator, faixa de vácuo necessária para promover uma extração eficiente e, principalmente, para a definição da taxa de extração de etanol. Após comprovada a operacionalidade e funcionalidade do sistema, o protótipo experimental ficou pronto para serem realizados os testes experimentais do ‘restentostato extrativo a vácuo’ e aquisição dos dados experimentais visando a produção de etanol 2G a partir de um meio fermentativo contendo pentoses (especificamente xilose) para avaliar o comportamento cinético da levedura *S. stipitis* na configuração proposta.

#### **6.4. Conclusão**

Após a montagem e instrumentação do protótipo experimental, o sistema ficou apto para a realização dos testes de validação experimental, realizados com água e etanol. O sistema operou corretamente, sem a detecção de eventuais problemas. Através dos testes de validação e ensaios experimentais com etanol e água, foi possível definir o tempo dos ciclos de extração, definidos em 30 min cada. Também foi avaliada a faixa de vácuo aplicada para promover uma taxa de extração satisfatória de maneira a manter uma baixa concentração de etanol no reator, a qual foi definida na faixa de 125 mmHg, sendo esta faixa capaz de promover uma taxa de extração de 7,8 g/Lh, corresponde a uma vazão de extração de 17,2 mL/h.

## Referências

Atala, D. I. P. Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo Fermentativo Extrativo de Produção de Etanol. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 172p, 2006.

Farias, D.; Andrade, R.R.; Maugeri, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. Appl. Biochem. Biotechnol. 2014, 172(1):361-79.

Moraes, C.C.; Castruvvi, P.L. Engenharia de Automação Industrial. Rio de Janeiro: LCT, 2001.

Ogata, K. Engenharia de Controle Moderno. Tradução de André Fábio Kohn e outros. Rio de Janeiro: Prentice Hall do Brasil, 1985. 929p.

Pupo, M.S. Interface homem-máquina para supervisão de umCLP em controle de processos através da WWW. São Carlos, 2002. 113p. Dissertação (Mestre em Engenharia Elétrica). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP).

Silveira, P.R.D.; Santos, W.E. Automação e controle discreto. São Paulo: Editora Érica, 1998, 230p.



## **CAPÍTULO 7**

### **7. Elaboração das Rotinas de Comunicação, Monitoramento e Controle do *Software* supervisorio**

Este capítulo aborda questões relacionadas com a configuração das rotinas de comunicação entre os equipamentos, sensores e atuadores envolvidos no protótipo experimental, bem como a configuração do *software* supervisorio desenvolvido para monitorar e controlar o processo fermentativo extrativo visando produção de etanol 2G.



## 7. Elaboração das Rotinas de Comunicação, Monitoramento e Controle do *Software* supervisorio

### RESUMO

Este capítulo descreve detalhadamente a configuração do sistema de aquisição de dados, os controles implementados no protótipo e a construção do sistema supervisorio utilizado para monitorar, e atuar no processo fermentativo quando necessário. O sistema supervisorio foi montado no *software LabVIEW* 10.1 que é uma programa utilizado para promover a comunicação e configuração dos equipamentos com sinais analógicos e digitais, bem como configurar os controles de processo. Com este intuito foi desenvolvida uma interface homem-máquina amigável através da elaboração no *software* de telas didática e ilustrativas (Painel de Controle) para facilitar o manuseio do processo pelo operador. Dessa maneira, através da manipulação do Painel de Controle o operador pode monitorar, controlar, adquirir dados e tomar de decisões em tempo real. Para o desenvolvimento das rotinas de comunicação apresentadas neste capítulo, teve-se como base um *software* previamente desenvolvido por Atala (2006) aplicado a um sistema de fermentação extrativa de etanol 1G, sendo que foram necessárias diversas adaptações devido à atualização do *software* e reestruturação e readaptação do protótipo experimental para suprir os inconvenientes apresentados pelo lento metabolismo da levedura *S. stipitis* durante o consumo de açúcares C5. Concluída a elaboração das rotinas de comunicação e configuração dos controladores através do *software LabVIEW* deu-se início aos testes experimentais para testar a operacionalidade do sistema supervisorio.

### 7.1. Introdução

Processos biotecnológicos estão sendo cada vez mais utilizados para a produção de biocombustíveis, dentre estes se destacam a produção de etanol de primeira e segunda geração. Consequentemente, a necessidade de controlar estes processos de maneira eficiente e confiável tem ganhado importância. Através do controle e monitoramento do processo é possível operar o sistema em condições otimizadas que levam em consideração

o comportamento cinético do processo, bem como as características fisiológicas e metabólicas dos micro-organismos. Operar em condições otimizadas possibilita ao micro-organismo operar sem a presença de substâncias tóxicas ao seu metabolismo, atingindo assim maiores rendimentos e produtividades.

Em virtude disto, o principal objetivo hoje em dia dos cientistas de bioprocessos é o desenvolvimento de novos processos industriais totalmente controlados e automatizados baseados em análises realizadas e monitoradas em tempo real (Gregory, 1993). O uso de computadores para promover a aquisição de dados, monitoramento, instrumentação e controle cresceu rapidamente nos últimos anos, possibilitando operar processos mais confiáveis e, conseqüentemente, com os maiores rendimentos e produtividades almejados. No entanto, o desenvolvimento de novas técnicas de controle requer habilidades em programação e eletrônica, bem como experiência e conhecimento do comportamento cinético do processo biotecnológico em estudo (Gregory, 1993; Moore, 1995). Por outro lado, este aumento no interesse de automatização de processos industriais, aumentou paralelamente a disponibilidade de linguagens amigáveis de programação gráfica e com velocidade de execução comparável com as linguagens de programação mais convencionais e complexas como Pascal ou C (Morre, 1995).

O fator chave para um sistema de instrumentação modelo é *software* aplicado. Para possibilitar um adequado monitoramento do processo o *software* deve suportar todos os aspectos envolvidos no sistema de instrumentação, incluindo aquisição de dados, controle, análise de dados e representação gráfica. Uma das tendências mais populares em aplicação de *software* é o ambiente de programação gráfica. O desenvolvimento gráfico de instrumentação virtual tornou-se possível desde a introdução do *LabVIEW* em 1986 (Jamal, 1995).

*LabVIEW* (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) é um *software* poderoso e flexível que possibilita através de interfaces amigáveis a instrumentação e análise de sistemas de controle (Jamal, 1995). De acordo com Kraub et al. (1999) o *LabVIEW* é um sistema de programação universal, composto por uma interface gráfica (Painel de Controle) e um código de programação gráfica (Diagrama de Blocos). Aplicações criadas em *LabVIEW* são referenciadas como VIs (do inglês *virtual*

*instruments*). Cada VI é composto de três partes principais: i) Painel de controle, que representa a interface gráfica; ii) Diagrama de Blocos, onde é realizado o código de programação gráfica e iii) Ícone/conector, o qual representa o instrumento real no painel de controle (Moore, 1995; Jamal, 1999; Kraub, 1999).

De acordo com Kalkman et. al (1995), programação gráfica significa que as informações, variáveis e funções são representadas por ícones no Painel de Controle e interligadas por linhas no Diagrama de Blocos, ao invés de linhas de texto como as outras linguagens de programação (Pascal, C, Fortran). No painel frontal de um instrumento real encontra-se a interface gráfica na qual o usuário pode operar de maneira interativa e específica, com valores de entrada, chamados de controles, e saída, conhecido como indicadores. O programador pode empregar uma variedade de controles e indicadores, componentes como displays, botões, interruptores, leds, gráficos, etc, de maneira a criar um ambiente operacional virtual amigável e de fácil acesso. Os elementos de controle são posicionados pelo usuário no Painel de Controle, enquanto que os conectores correspondentes aparecem simultaneamente na janela do Diagrama de Blocos (Kalkman, 1995; Jamal, 1999; Atala, 2006).

Num programa desenvolvido em *LabVIEW*, a execução não é controlada pela ordem em que as instruções foram escritas no código-fonte (programação orientada linha a linha) mas, em vez disso, pelos dados que são gerados (fluxo de dados orientado). Assim, funcionando como um editor de circuitos esquematizados, os conectores correspondentes aos elementos posicionados no Painel são ligados a outros elementos como funções, cartões de entrada e saída de sinais e operações matemáticas por meio de linhas conectoras no Diagrama. O grande número de elementos de controle e indicadores torna fácil e prática a construção destas interfaces gráficas (Kalkman, 1995; Kraub, 1999; Atala, 2006).

Dentro deste contexto, devido à maior facilidade de aplicação de uma interface amigável com o operador do processo, o *LabVIEW* foi o *software* selecionado para promover a aquisição e monitoramento de dados, bem como acionamento de equipamentos e válvulas, supervisão e controle do processo fermentativo extrativo proposto neste trabalho visando à produção de etanol de segunda geração. Atala (2006) utilizou o *software LabVIEW* para promover a aquisição de dados, implementação de controladores e

monitoramento de um protótipo experimental de produção de etanol 1G. Posteriormente esta tecnologia foi transferida para escala industrial, em parceria com o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) situado em Piraciba, SP. O aumento de escala (*scale-up*) possibilitou otimizar as variáveis importantes do processo visando a maximização de desempenho, medido em rendimento e produtividades, com consequente minimização dos gastos energéticos.

O aprimoramento e amadurecimento deste processo para produção de etanol 1G desenvolvido por Atala (2006), passando da etapa de concepção em escala laboratorial para posterior aumento de escala para unidades semi-industriais, agregam confiança e credibilidade para esta tecnologia tornando sua aceitação imediata pelo setor sucro-alcooleiro. Este fato nos encorajou desenvolver uma tecnologia visando incorporar processos para produção de etanol 2G, de maneira a abranger e solucionar as diversas barreiras encontradas na área atualmente. Dentro do escopo, este capítulo apresenta a configuração do sistema proposto para aquisição de dados, os controles implementados no protótipo experimental bem como a construção do *software* supervisorio utilizado para monitorar, supervisionar e atuar no processo fermentativo.

## **7.2. Material e Métodos**

A elaboração das rotinas de comunicação, das interfaces do *software* supervisorio e da implementação de controladores do processo foi desenvolvida utilizando o *software* LabVIEW 10.1 da *National Instruments*. Os equipamentos e instrumentos utilizados para criação e montagem do protótipo experimental estão descritos detalhadamente no Capítulo 6.

### **7.2.1. Monitoramento e Controle de Processos**

Esta etapa detalha a configuração e a sintonia dos controladores implementados no processo.

### 7.2.1.1. Controle de Nível do Fermentador

O controle do nível do fermentador foi realizado conforme esquema exposto na Figura 7.1 e, tem por finalidade manter o nível do meio no fermentador constante. Este controle é realizado por uma boia chaveadora, do tipo liga/desliga, que aciona a bomba *Masterflex* de alimentação de meio de fermentação para dentro do reator, quando o nível está baixo. A variável manipulada neste caso é a vazão de alimentação de meio ao sistema. A Figura 7.2 apresenta o fluxograma do controle de nível do reator. Dessa maneira, quando o nível do fermentador encontrar-se baixo, a bomba peristáltica de alimentação é acionada, adicionando um volume pré-determinado para uma taxa de diluição específica, baseada nas características cinéticas e fisiológicas do micro-organismo e, a uma vazão superior da bomba de permeado do processo, com isso o volume do fermentador permanece constante. A bomba de permeado funciona intermitentemente, em sincronia com a bomba de alimentação, e é então responsável pela manutenção da taxa de diluição ou tempo de residência do processo. No momento em que o reator apresentar nível alto, a boia fecha contato, parando então simultaneamente ambas as bombas (de alimentação e de permeado) do sistema.

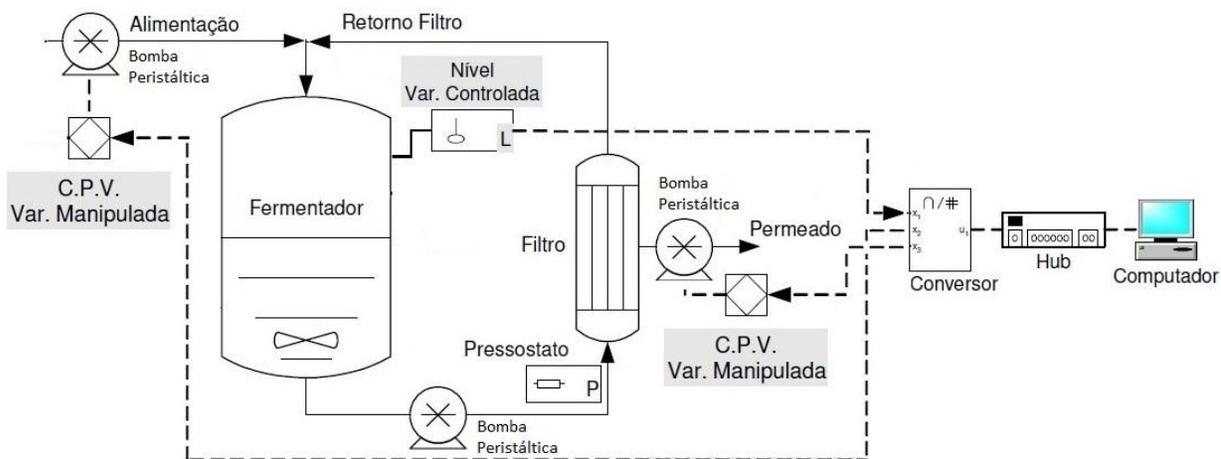


Figura 7.1. Esquema do controle de nível do reator

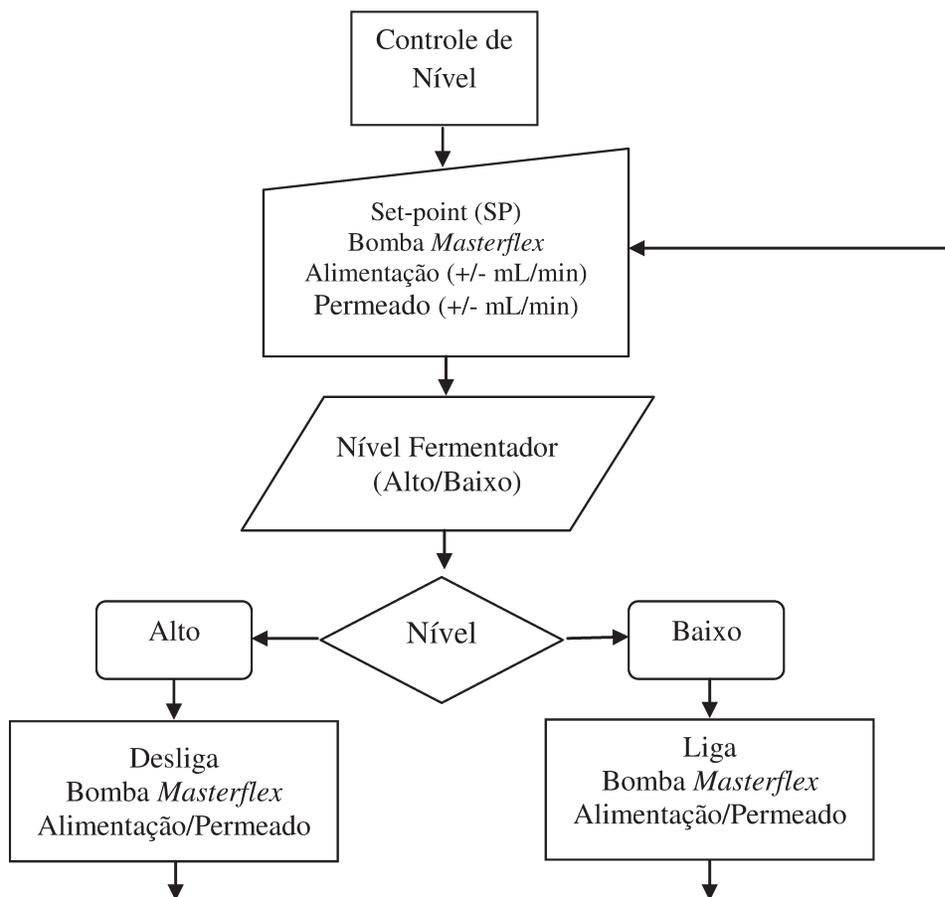


Figura 7.2. Fluxograma do controle de nível do reator

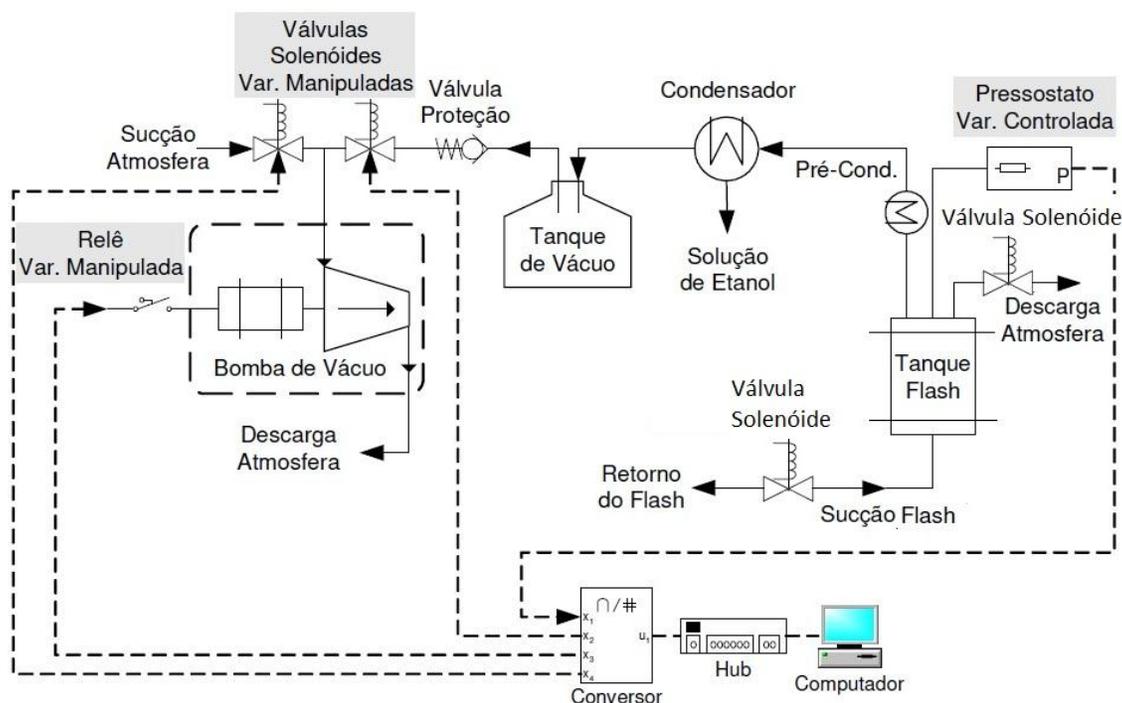
### 7.2.1.2 Controle do Vácuo do Tanque *Flash*

O controle de vácuo foi desenvolvido para promover alto vácuo no tanque flash, bem como para manter também este vácuo constante. De acordo com estudos desenvolvidos por Atala (2006), para promover uma taxa de extração de etanol no tanque *flash* eficiente é necessário manter o vácuo em pressões na faixa de 100 a 150 mmHg. Dessa maneira, com o intuito de se obter altas taxas de extração de etanol no tanque flash tornou-se necessário incorporar o controle de vácuo no sistema.

A medida de vácuo foi fornecida pelo transmissor de pressão conectado ao tanque *flash* e esta foi a variável controlada. As variáveis manipuladas foram às válvulas

solenoides, de sucção atmosférica e de sucção do tanque *flash*, e o relê de acionamento da bomba de vácuo, conforme esquematizado na Figura 7.3.

Conforme apresentado na Tabela 7.1, as válvulas solenoides são acionadas através de relês (24 VDC) de modo sincronizado e com intervalo de 1 segundo entre uma ação e outra. Inicialmente, o conjunto de bombas e válvulas solenoides estava desativado. No momento da extração, o operador definia o set-point da pressão do sistema de vácuo, através do sistema supervisor de controle do processo, acionando então o sistema. Assim, a bomba começava aspirando ar atmosférico, pois a válvula solenoide de sucção atmosférica é do tipo normalmente aberta. Após um segundo, a válvula solenoide de sucção atmosférica era fechada, ocasionando assim o vácuo no compartimento da bomba. No próximo segundo, ocorria a abertura da válvula solenoide de sucção do tanque *flash*, até que o vácuo atingisse o set-point determinado pelo operador do sistema, ocorrendo então o desligamento da bomba. Da mesma maneira, quando o vácuo atingia limite inferior ao pré-determinado no *software* supervisor, ocorria novamente o acionamento da bomba, mantendo assim o vácuo no tanque *flash* constante.



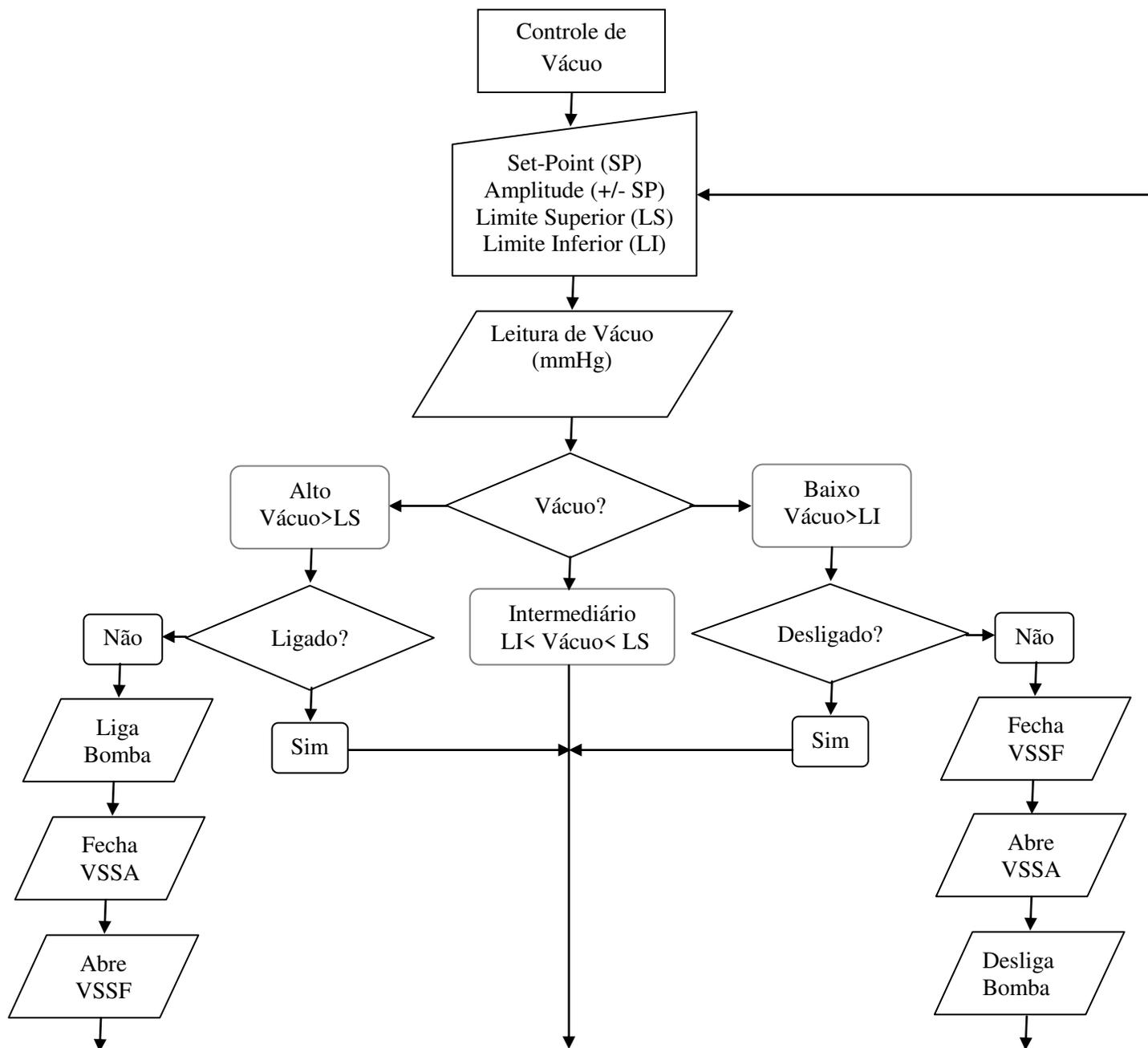
**Figura 7.3.** Variáveis controladas e manipuladas durante o controle de vácuo do tanque *flash*

Promovida à extração, o desligamento de vácuo do sistema ocorria de modo inverso, desligando primeiramente a válvula solenoide de sucção do *flash* e no próximo segundo a válvula solenoide de sucção atmosférica, deixando-a aberta. Com isso, o compartimento da bomba de vácuo era mantido à pressão atmosférica e logo em seguida ocorria o desligamento da bomba de vácuo terminando assim um ciclo de operação, o qual pode ser melhor visualizado no fluxograma apresentado na Figura 7.4.

**Tabela 7.1.** Esquema de acionamento e desligamento do sistema de extração a vácuo

	Etapa	BV	VSSA (NA)	VSSF (NF)	Ação
Liga	1	L	D	D	Liga bomba de vácuo
	2	L	L	D	Fecha sucção atmosférica
	3	L	L	L	Abre sucção do <i>flash</i>
Desliga	1	L	L	D	Fecha sucção do <i>flash</i>
	2	L	D	D	Abre sucção da atmosférica
	3	D	D	D	Desliga bomba de vácuo

BV: bomba de vácuo; VSSA: válvula solenoide sucção atmosférica; VSSF: válvula solenoide sucção *flash*; NA: normalmente aberta; NF: normalmente fechada; L: liga; D: desliga.



**Figura 7.4.** Fluxograma de controle, acionamento e desligamento do sistema de vácuo durante a etapa de extração. Adaptado de Atala (2006)

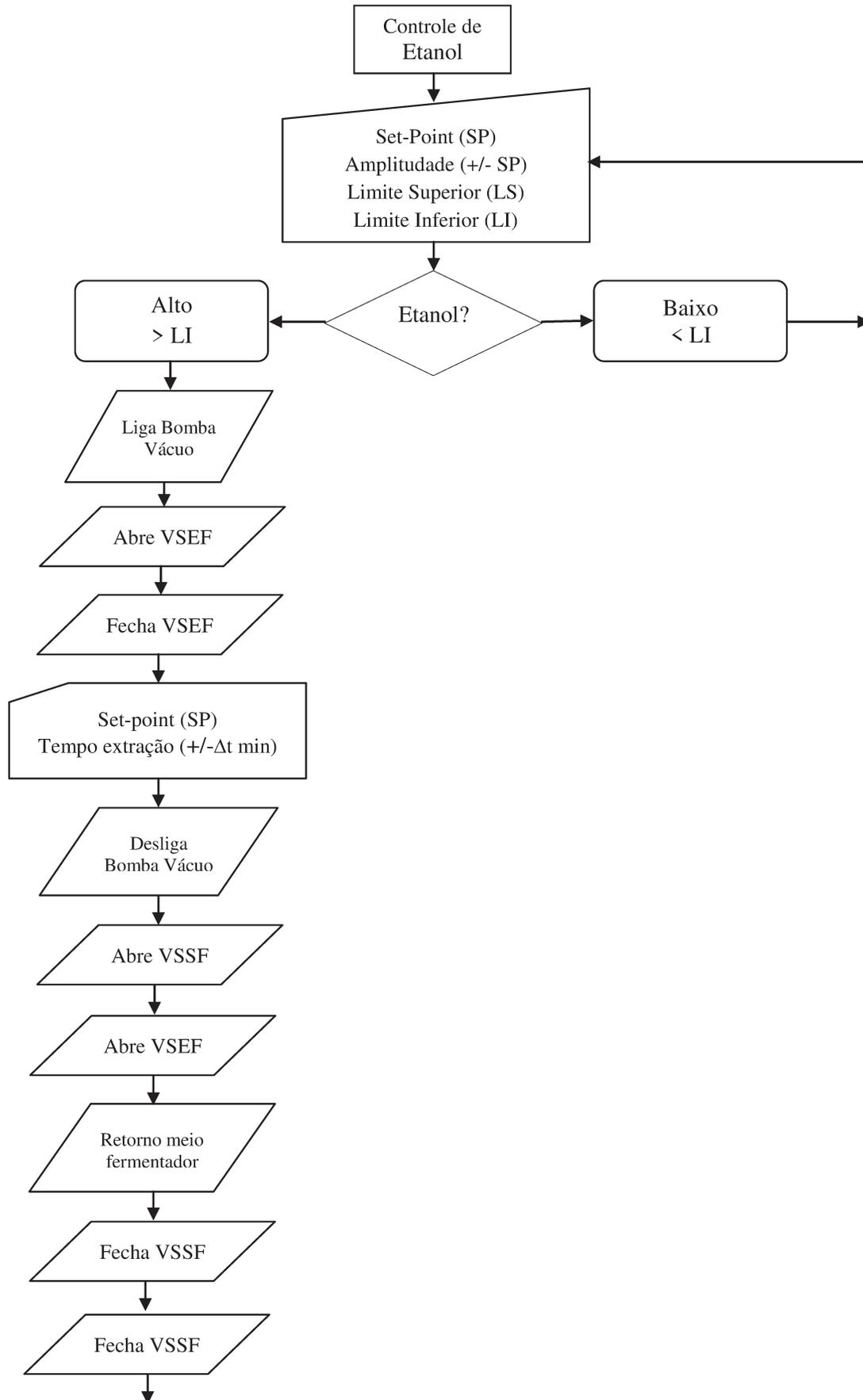
### 7.2.1.3. Controle da Extração no Tanque *Flash*

O controle da extração no tanque *flash* era feito manualmente, e decorria em períodos de tempo determinados em virtude da concentração de etanol no reator. Dessa maneira, o etanol era retirado constantemente do processo à medida que ele era produzido,

mantendo a concentração deste no meio fermentativo em níveis baixos (na faixa de 25 a 35 g.L<sup>-1</sup>) eliminando-se, conseqüentemente, o efeito inibitório exercido sobre o metabolismo das leveduras, tornando o processo mais produtivo.

No momento da extração, parava-se a alimentação no reator, juntamente com a parada das bombas de circulação do meio pelo filtro, de alimentação e de permeado. O meio era então aspirado para o tanque *flash* para promover a extração no vácuo e no tempo determinado pelo operador do sistema supervisor. Testes preliminares para testar a funcionalidade do processo demonstraram a necessidade de operar o sistema a um vácuo na faixa de 100-150 mmHg, pois o vácuo abaixo dessa faixa não foi capaz de promover uma extração eficiente.

O Fluxograma da Figura 7.5 apresenta detalhadamente as ações tomadas no momento da extração. Primeiramente, as bombas peristálticas de circulação do meio pelo filtro, alimentação e permeado foram paradas. A bomba de vácuo era acionada e o meio fermentativo era enviado do reator para o tanque *flash* pela diferença de pressão promovida pelo vácuo. Assim, após a parada das bombas peristálticas, acionava-se controle de vácuo, na faixa desejada e, após 1 segundo a válvula solenoide posicionada na entrada do tanque *flash* (VSEF), do tipo normalmente fechada, era então acionada e aberta por aproximadamente 20 segundos, possibilitando aspirar então o meio do reator para o tanque *flash*. Uma vez no tanque *flash*, a extração era promovida por curtos períodos tempo (30 min a 1 h) e, o etanol evaporado condensava no condensador previamente resfriado. Decorrida a extração, desliga-se a bomba de vácuo e quebrava-se o vácuo do sistema através da abertura para atmosfera de uma válvula solenoide posicionada na saída do tanque *flash* (VSSF), também do tipo normalmente fechada. Após a descarga atmosférica, promovia-se a abertura da VSEF e o líquido, com concentração de etanol mais baixa, retornava para o reator devido à diferença de altura de coluna d'água. Com o líquido no reator, fechavam-se as VSEF e VSSF, as bombas peristálticas eram novamente acionadas, retomando então o processo fermentativo.



**Figura 7.5.** Fluxograma de controle da etapa de extração a vácuo do etanol acumulado para manter baixas concentrações deste produto no meio fermentativo.

### 7.2.2. Interfaces Homem-Máquina

Programas desenvolvidos no *software* LabVIEW são chamados de instrumentos virtuais (VIs), os quais representam os instrumentos reais. Os VIs são compostos de três partes principais: o painel frontal, o diagrama de blocos, e um ícone e/ou conector. Analogamente, no painel frontal de um instrumento real está a interface do usuário, denominada interface homem-máquina (IHM), pela qual podem ser realizadas as operações de monitoramento e controle. Cada painel frontal tem um diagrama de blocos correspondente, o qual define o fluxo de dados reais entre as entradas e saídas.

As interfaces de controle Homem Máquina foram programadas no *software* LabVIEW 10.1 conforme as lógicas apresentadas anteriormente para possibilitar o monitoramento e controle do nível do fermentador, do vácuo do tanque *flash*, da vazão das bombas peristálticas de alimentação e permeado, e, para o controle da extração no tanque *flash*. Estas interfaces foram divididas em diversas pastas de monitoramento e controle de uma determinada variável do processo e as telas construídas (IHM) estão apresentadas a seguir.

#### 7.2.2.1. Controle Geral

A Figura 7.6 apresenta a IHM do status do *field point* do programa desenvolvido para o protótipo experimental ‘retentostato extrativo’. Nesta interface são monitoradas todas as variáveis do processo e pode-se verificar o status geral do processo. Estas interfaces estão divididas em diversas pastas de monitoração e controle de uma determinada variável do processo.

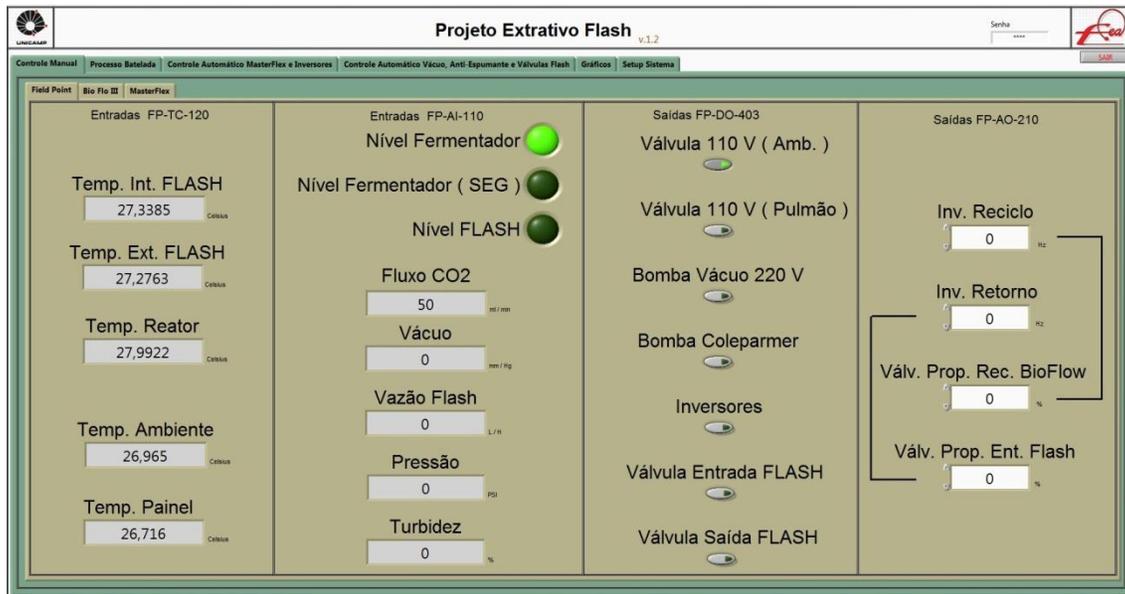


Figura 7.6. IHM do controle geral do processo

As Figuras 7.7 e 7.8 apresentam as condições operacionais (*set-point*) do fermentador e das bombas peristálticas de alimentação de substrato, de retirada do permeado e de purga do sistema, respectivamente. Para o fermentador, são fornecidas as condições de agitação, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e adição de antiespumante e o valor das variáveis fornecidas pelo operador são registradas *on line*. O controle das bombas peristálticas é realizado através dos valores de vazão, diâmetro da tubulação utilizada, o sentido de rotação e o volume a ser adicionado. Esta leitura fornece além das variáveis de controle, a vazão total adicionada ao fermentador.

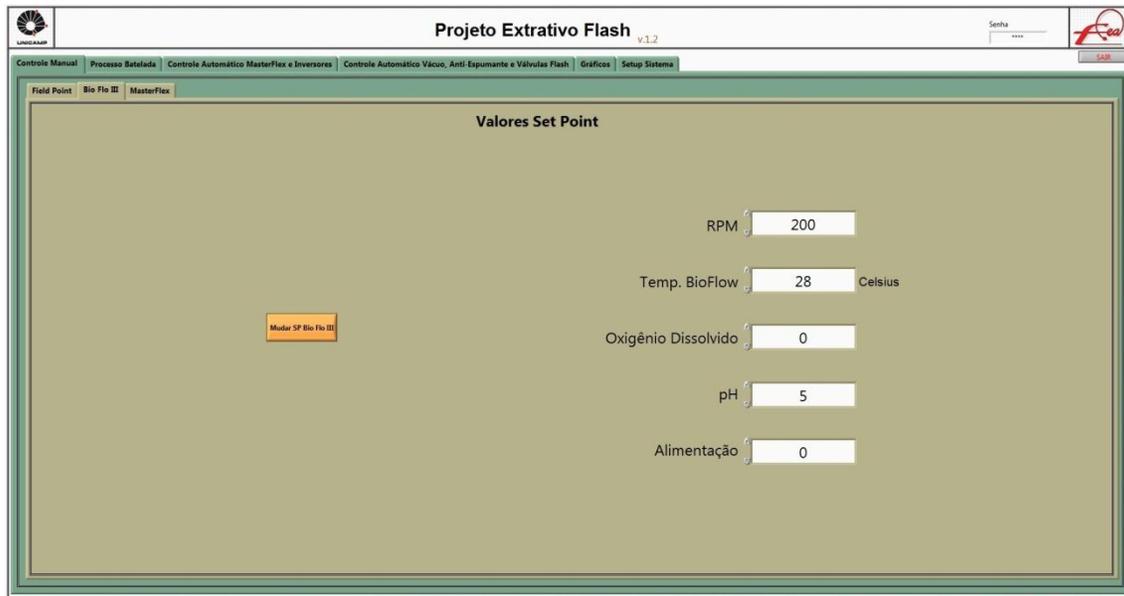


Figura 7.7. IHM do controle do fermentador

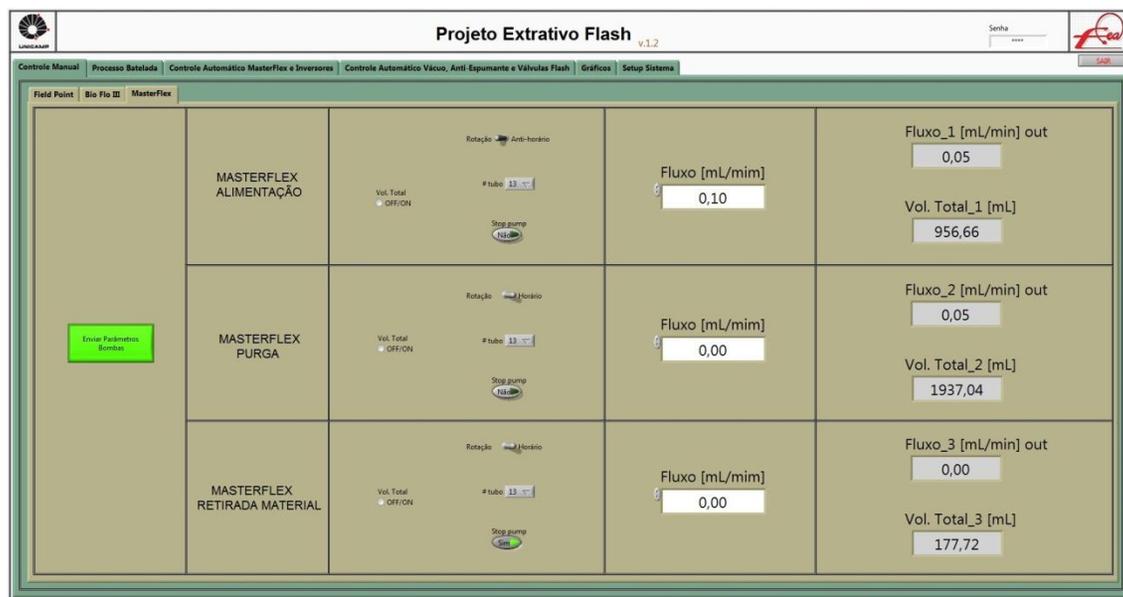
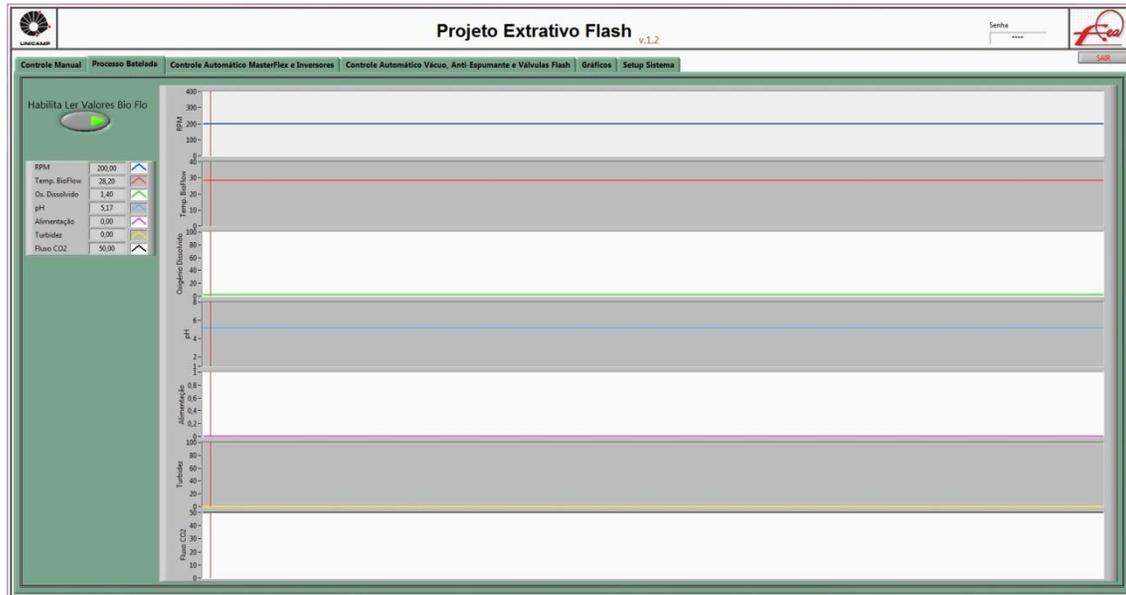


Figura 7.8. IHM do controle da vazão das bombas peristálticas de alimentação, retirada de permeado e purga do sistema.

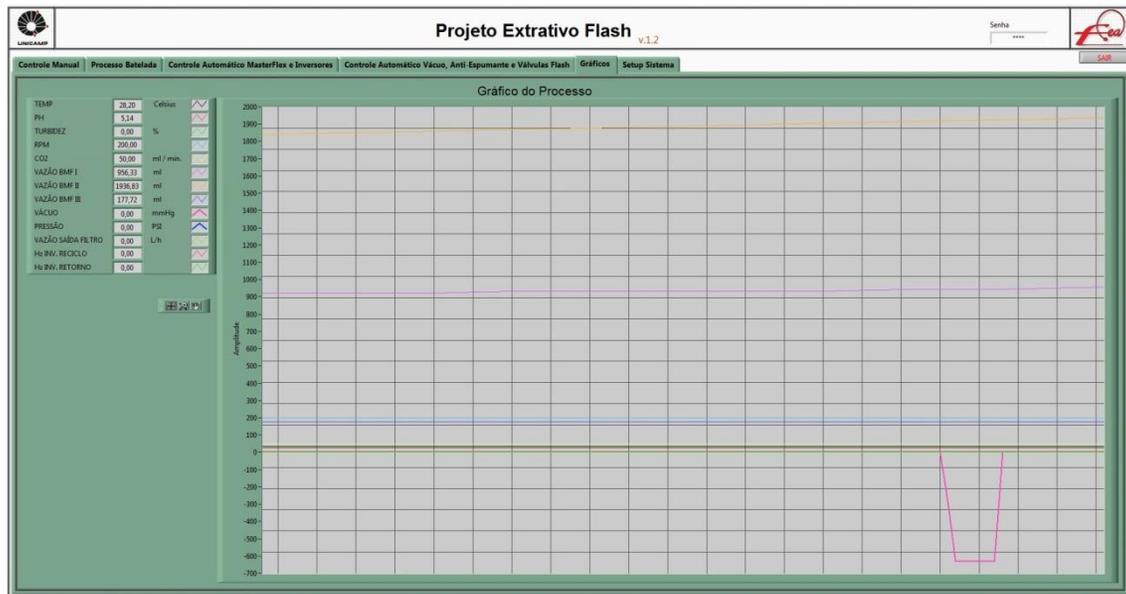
### 7.2.2.2. Comportamento

A Figura 7.9 apresenta a interface onde é possível visualizar o comportamento das variáveis monitoradas no reator, enquanto que a Figura 7.10 apresenta o comportamento de todas as variáveis de controle durante o processo fermentativo. Os dados usados para a realização dos gráficos de comportamento são fornecidos pelo arquivo de registro de dados configurados pelo operador. Em cada caso os gráficos apresentam um perfil das variáveis

manipuladas e controladas durante um determinado tempo de processo (tempo de amostragem determinado pelo operador). Com isso, o operador verifica se os parâmetros estão dentro das condições desejadas, podendo interferir de modo a promover uma ação mais rápida ou lenta dos dispositivos de controle.



**Figura 7.9.** IHM de visualização do comportamento das variáveis monitoradas no reator.



**Figura 7.10.** IHM de visualização do comportamento das todas variáveis monitoradas no processo fermentativo.

### 7.2.2.3. Controle do Nível do Fermentador

A IHM de monitoração e de controle do nível do fermentador é apresentada na Figura 7.11, que apresenta o esquema que possibilita o acionamento do controle automático do sistema. Para o controle automático do nível do fermentador, ajusta-se a vazão de alimentação e de permeado do sistema. A vazão de alimentação e permeado são definidas conforme a taxa de diluição a ser avaliada no processo. No caso do retentostato extrativo, promoveu-se o reciclo total de células, devido às características fisiológicas do micro-organismo, não ocorrendo então a purga do sistema (retirada de células). Esta interface possibilita ao operador controlar o volume recolhido pela linha do permeado e o volume alimentado no reator, através dos valores de entrada fornecidos para as vazões das bombas peristálticas. O erro apresentado entre o volume recolhido e alimentado no sistema foi menor que 5 % para mais ou menos.

Dessa forma, a bomba de permeado funciona intermitentemente, em sincronia com a bomba de alimentação, e é então responsável pela manutenção da taxa de diluição ou tempo de residência do processo, mantendo assim o volume constante. Quando o reator apresentava nível alto, a boia de nível fechava contato, parando consequentemente o controle automático das vazões de alimentação e permeado, o qual era acompanhado também pelo desligamento do led de indicação do nível do reator na IHM do controle geral do processo (ver Figura 7.6). Quando o nível baixava, automaticamente a boia abria contato e ocorria o acionamento novamente das bombas peristálticas de alimentação e permeado, de maneira a restabelecer o estado estacionário do processo.

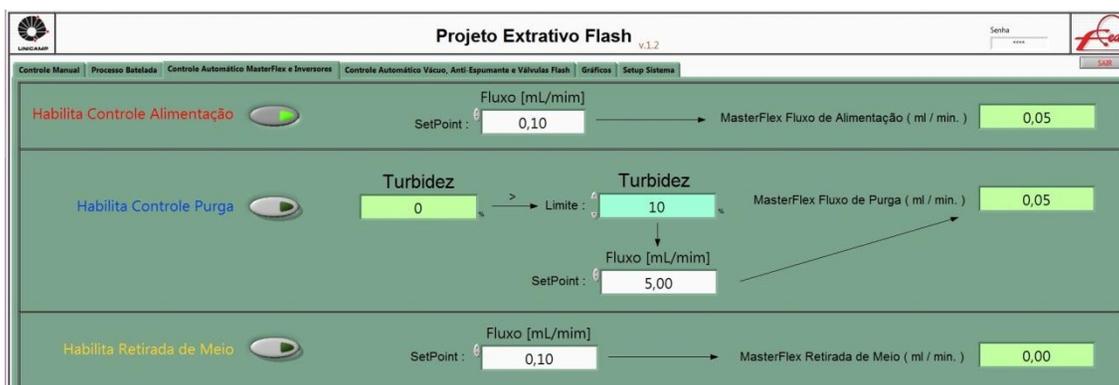
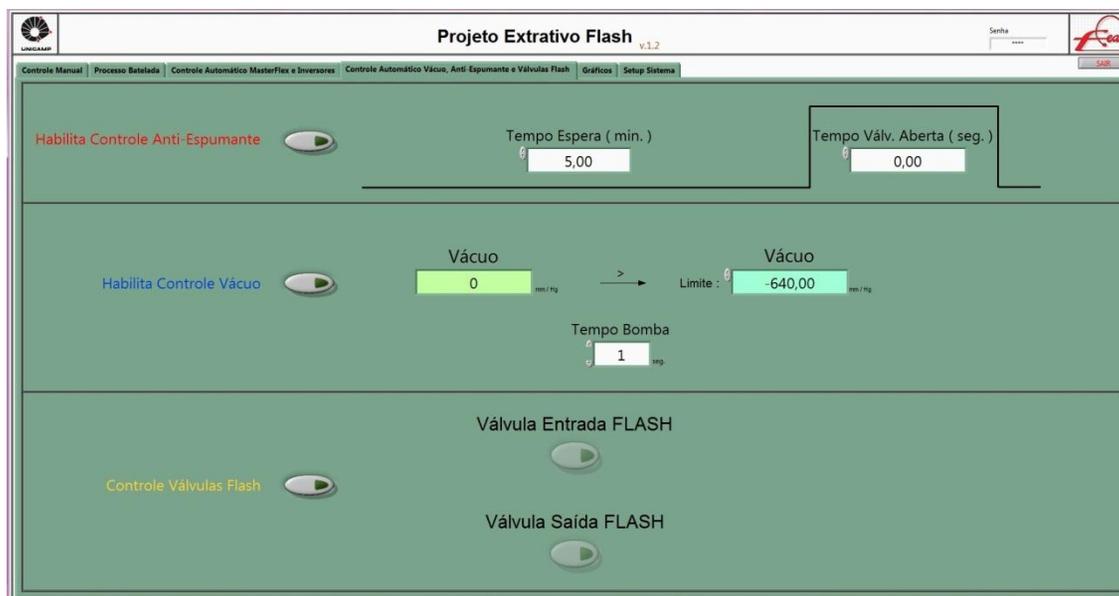


Figura 7.11. IHM do controle automático do nível do fermentador

#### 7.2.2.4. Controle de Vácuo e de Extração do Tanque *Flash*

Já no controle do vácuo do tanque, o operador ajusta o nível de vácuo desejado e a oscilação (limite superior e inferior) em que o vácuo pode operar e ativar o mecanismo de acionamento e desligamento do sistema de vácuo automaticamente, conforme exposto na IHM da Figura 7.12.

Nesta interface, também é possível acionar as válvulas solenoides posicionadas na entrada do tanque *flash*, para sucção e/ou retorno do meio mantido no reator nos períodos de extração e na saída, para quebrar o vácuo do tanque *flash* e possibilitar o retorno do meio para o fermentador. O controle de extração de etanol foi feito manualmente pelo operador, e teve como base a concentração de etanol acumulado no meio, acompanhada através de análises paralelas em HPLC, conforme metodologia descrita em Farias *et. al* (2013). Dessa maneira, possibilitou-se a manutenção no sistema de baixas concentrações de etanol durante todo o processo, aumentando consequentemente a produtividade do micro-organismo.



**Figura 7.12.** IHM do controle automático de extração e vácuo no tanque *flash*.

O programa desenvolvido para o controle e monitoramento do processo fermentativo através das Interfaces Homem Máquina (IHM) pode ser acessado externamente através de qualquer navegador de internet. O acesso externo pode ser aberto a qualquer pessoa, com ou sem senha, ou ser limitado a uma máquina através de seu número

IP (*Internet Protocol*) que foi o caso deste trabalho. Com isso, é possível acompanhar o processo mesmo estando longe, podendo monitorar e alterar condições operacionais, visto que os ensaios experimentais apresentam um longo tempo de duração, fermentando por semanas, 24 horas por dia. Através da configuração do sistema supervisorio do protótipo experimental ‘retentostato extrativo a vácuo’ foi possível monitorar e controlar *online* o processo fermentativo. Resultados para os ensaios experimentais comprovando a operacionalidade do aparato experimental e do sistema supervisorio estão apresentados no capítulo subsequente.

### 7.3. Conclusão

No Capítulo 7 foram descritas detalhadamente a elaboração das rotinas de comunicação desenvolvidas no *software* supervisorio, bem como a implementação, configuração e sintonia dos controladores de processo do protótipo experimental proposto. Após o desenvolvimento do *software* supervisorio, o operador do sistema foi capaz de monitorar, controlar, adquirir dados e tomar decisões em tempo real através da manipulação de dados pelo Painel de Controle.

Dessa maneira, através da manipulação e operação do *software* supervisorio foi possível concluir que as rotinas e sub-rotinas desenvolvidas para o controle, monitoramento e aquisição de dados do protótipo experimental retentostato extrativo apresentaram um bom desempenho e robustez, operando corretamente. As Interfaces Homem Máquina foram construídas de forma didática, o que facilitou o manuseio do sistema pelo operador do processo. Por fim, o *software* supervisorio foi capaz de satisfazer as necessidades do processo fermentativo, fornecendo uma boa visualização das variáveis do processo, uma adequada disposição das informações nos Painéis de Controle, possibilitando assim um adequado controle das variáveis de interesse através do auxílio dos dispositivos de segurança, bem como a tomada de decisões em todo real. Isto possibilitou operar um sistema com menores oscilações das variáveis de controle de interesse, além de menor interferência do operador no protótipo, auxiliando na obtenção de um processo rigorosamente controlado, e, conseqüentemente, com maiores produtividades.

## **Referências**

Atala, D. I. P. Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo Fermentativo Extrativo de Produção de Etanol. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 172p, 2006.

Gregory, M.E.; Keay, P.J.; Dean, P.; Bulmer, M.; Thornhill, N.F. A visual programming environment for bioprocess control. *Journal of Biotechnology*, 1994, 33:233-241.

Jamal, R. Graphical object-oriented programming with LabVIEW. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research*, 1994, 352:438-441.

Kalkman, C.J. LabVIEW: A Software System for Data Acquisition, Data Analysis, and Instrument Control. *J Clin Monit*, 1995, 11:51-58.

Kraub, A.; Weimar, U.; Göpel, W. LabVIEW for sensor data acquisition. *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18(5):312-318.

Moore, J.H. Artificial intelligence programming with LabVIEW: genetic algorithms for instrumentation control and optimization. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 1995, 47:73-79.



## CAPÍTULO 8

### **8. Produção de etanol de segunda geração utilizando tecnologia retentostato extrativo a vácuo (C5-REV) por *Scheffersomyces stipitis***

Patente em fase de desenvolvimento para submissão em periódico científico. O artigo apresenta o desenvolvimento de um sistema extrativo à vácuo com reciclo de células para promover alta densidade celular, promovendo assim elevadas taxas de conversão de substrato em produto maximizando conseqüentemente a produção de etanol. A estratégia ‘retentostato extrativo a vácuo’ possibilitou operar um sistema sem a presença de fatores inibitórios devido à manutenção de baixas concentrações de etanol e açúcar no meio fermentativo, atingindo assim maiores rendimentos e produtividades.



## 8. Produção de etanol de segunda geração utilizando tecnologia retentostato extrativo a vácuo (C5-REV) por *Scheffersomyces stipitis*

Daniele Farias<sup>1\*</sup>, Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo

### RESUMO

Para aumentar os ganhos em rendimento e produtividade na produção de etanol de segunda geração (2G) é necessário obter um melhor entendimento do comportamento cinético das leveduras envolvidas bem como do processo industrial ao qual o micro-organismo é submetido. *Scheffersomyces stipitis* apresenta grande potencial para produção de etanol 2G devido ao fato desta levedura se apresentar como um biocatalisador eficiente para converter os açúcares pentoses (C5) derivados da hidrólise da biomassa lignocelulósica em etanol. Além disso, um processo que produza etanol 2G de uma maneira mais eficiente, a partir de açúcares C5 (especialmente xilose) ainda não foi proposto na literatura. Frente ao exposto, neste trabalho desenvolveu-se um processo fermentativo que foi denominado 'retentostato extrativo a vácuo' (REV), com retenção total de células, usando o micro-organismo *S. stipitis*. O desempenho da levedura foi avaliado em diferentes concentrações de xilose. A velocidade específica de crescimento ótima para atingir uma produção de etanol de maneira eficiente foi  $0.025 \text{ h}^{-1}$  obtida para experimento realizado com  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose no meio de alimentação. O efeito tóxico promovido pelo etanol em altas concentrações foi minimizado pela extração intermitente em tanque *flash* operado a vácuo. Esta estratégia permitiu manter uma baixa concentração de etanol no meio fermentativo ( $\sim 25\text{-}35 \text{ g.L}^{-1}$ ). O sistema retentostato extrativo a vácuo operado em condições apropriadas resultou em altos rendimentos e produtividades quando comparado aos cultivos realizados em batelada simples e batelada alimentada. O melhor desempenho no acúmulo de etanol foi atingido para a condição de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose administrada no meio de alimentação. A máxima produtividade em etanol obtida para os cultivos operados no modo retentostato extrativo foi de  $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , valor 4.35 vezes maior quando comparado aos cultivos no modo batelada

simples. A estratégia proposta aqui pode contribuir para aprimorar futuras pesquisas na produção de etanol 2G por meio do desenvolvimento de processos de baixo custo em escala industrial.

**Palavras-chave:** *Scheffersomyces stipitis*, etanol de segunda geração, processo extrativo, retentostato.

### Nomenclatura

$F_a$  vazão de alimentação do sistema ( $L \cdot h^{-1}$ )

$P_i$  concentração inicial de etanol no início da etapa batelada ( $g \cdot L^{-1}$ )

$P_f$  concentração de etanol no final da etapa batelada ( $g \cdot L^{-1}$ ),  $S_i$  concentração inicial de substrato ( $g \cdot L^{-1}$ )

$P_{ext}$  concentração de etanol extraída (g)

$P_{max}$  concentração de produto quando o crescimento celular cessa ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_a$  concentração de substrato no meio de alimentação ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_i$  concentração inicial de substrato na etapa batelada ( $g \cdot L^{-1}$ )

$S_f$  concentração final de substrato na etapa batelada ( $g \cdot L^{-1}$ )

$X_i$  concentração inicial de células na etapa batelada ( $g \cdot L^{-1}$ )

$X_f$  concentração final de células na etapa batelada

$t_f$  tempo final de fermentação da etapa batelada

$t_1$  tempo de fermentação antes da extração de etanol ser promovida (h)

$t_2$  tempo de fermentação após a extração de etanol ser promovida (h)

$S_1$ ,  $X_1$  e  $P_1$  concentrações de substrato, células e etanol (g), respectivamente, no tempo de fermentação  $t_1$

$S_2$ ,  $X_2$  e  $P_2$  são as concentrações de substrato, células e etanol (g), respectivamente no tempo de fermentação  $t_2$

$Y_{p/s}$  rendimento de produto baseado no consumo de substrato ( $g \cdot g^{-1}$ )

$Y_{x/s}$  rendimento de células baseado no consumo de substrato ( $g \cdot g^{-1}$ )

$Q_p$  produtividade volumétrica de etanol ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )

D taxa de diluição do sistema ( $h^{-1}$ )

$\mu$  velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

## 8.1. Introdução

A produção de etanol de primeira geração (1G) pelas destilarias brasileiras a partir de matéria-prima baseada na cana de açúcar é um exemplo bem sucedido de bioprocessos em larga escala, que proporciona um biocombustível avançado, a preços competitivos e de baixo impacto ambiental (Della-Bianca *et al.*, 2013). Hoje em dia, a produção de etanol de segunda geração (2G) (derivado da biomassa lignocelulósica) tem recebido muita atenção no cenário bioenergético como uma fonte de combustível renovável para substituir a gasolina. A crescente demanda por biocombustíveis para substituir o petróleo leva a um aumento no interesse do desenvolvimento de processos economicamente viáveis, o que pode gerar enormes benefícios tanto econômicos quanto ambientais (Duff and Murray, 1996; Lin *et al.*, 2006; Lynd *et al.*, 2008; Unrean *et al.*, 2012; Unrean *et al.*, 2013). A matriz lignocelulósica é composta por uma mistura complexa de açúcares, a qual contém em média 40 % de açúcar xilose. No entanto, um grande gargalo ainda permanece na fermentação desta fração de xiloses (Slininger *et al.*, 2014). Para produzir etanol 2G de uma maneira economicamente viável, o processo fermentativo deve ser desenvolvido de forma a otimizar a fermentação a partir da matriz lignocelulósica, visando a obtenção de elevados rendimentos e produtividades.

Xilose é um açúcar de cinco carbonos (denominado C5), o qual não é diretamente fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem amplamente utilizada para produção de etanol 1G). Por outro lado, *Scheffersomyces* (anteriormente *Pichia*) *stipitis* (Kurtzman and Suzuki, 2010) é um biocatalisador potencial para a produção de etanol 2G a partir de derivados lignocelulósicos, pois esta levedura é capaz de fermentar naturalmente os açúcares C5 a um nível comercialmente promissor (Abgogo *et al.*, 2008; Unrean *et al.*, 2013; Farias *et al.*, 2014; Slininger *et al.*, 2014).

A maximização dos ganhos em base a altos rendimentos e produtividades é um dos pré-requisitos para o desenvolvimento de um processo economicamente rentável. Por outro lado, atualmente os estudos laboratoriais desenvolvidos para investigar a produção de etanol 2G por leveduras são conduzidos principalmente no modo de operação batelada simples. A operação de fermentadores no modo batelada apresenta algumas limitações que impedem o seu uso para obtenção de alta eficiência na produção de etanol. Isto ocorre porque geralmente todos os substratos e nutrientes disponibilizados para produção de etanol

estão presentes em excesso no início dos cultivos em batelada, e nesta situação normalmente são evidenciados efeitos tóxicos para o metabolismo da levedura. Na prática, o crescimento microbiano em ambientes naturais é geralmente limitado pela disponibilidade de nutrientes e a velocidade específica de crescimento é susceptível de ser definida por um ou mais nutrientes limitantes do crescimento no meio, resultando em taxas específicas de crescimento muito abaixo de  $\mu_{max}$  (Brock, 1971; Koch, 1997).

Cultivos em quimiostato de *S. stipitis* demonstraram um forte efeito da velocidade específica de crescimento sobre o acúmulo de células e formação de produto (Farias *et al.*, 2014). Os autores avaliaram a velocidade específica de crescimento no estado estacionário na faixa de 0.008-0.150 h<sup>-1</sup>. Embora esta faixa já seja relevante para a produção industrial de etanol combustível, ainda existe algum interesse em estudar o crescimento desta levedura em velocidades específicas de crescimento ainda menores. Além disso, durante cultivos em que a velocidade específica de crescimento é praticamente nula, a idade individual de cada célula de levedura torna-se muito maior do que a que pode ser obtida durante os cultivos convencionais operados no modo batelada e/ou quimiostato e, nesta situação (crescimento limitante em baixas velocidades específicas de crescimento) uma fração relativamente grande de energia, proveniente do substrato, tende a ser dissipada para processos associados à manutenção celular (Pirt, 1965; Boender, 2009).

Os cultivos operados no modo retentostato foram inicialmente desenvolvidos por Hebert (1961) para estudar a fisiologia microbiana a uma velocidade específica de crescimento próxima de zero. Um retentostato nada mais é do que um quimiostato modificado: a energia limitante de crescimento é alimentada a uma velocidade constante e as células são mantidas no reator através de um filtro externo conectado à linha de efluente. Desta forma, durante cultivos em retentostato prolongados a velocidade específica de crescimento deve, em teoria, se tornar nula e a velocidade específica de consumo de substrato deverá ser igual à energia de manutenção requerida. De acordo com Boender *et al.* (2011), em um típico experimento em retentostato, a taxa de fornecimento do nutriente limitante ao crescimento (no caso deste estudo a concentração de xilose) é mantida constante ao longo do tempo. Assim, a concentração celular irá aumentar devido à retenção de células no interior do reator. Consequentemente, a disponibilidade de xilose para cada

célula individual diminui ao longo do tempo. Neste processo, o consumo de xilose é utilizado por dois processos essenciais à levedura: manutenção e crescimento. Teoricamente, durante a cultura em crescimento nulo (na qual nenhum crescimento ocorre) a levedura cataboliza o nutriente limitante exclusivamente para fornecer a energia necessária para o processo de manutenção, sendo que o micro-organismo permanece metabolicamente ativo evitando ou ao menos retardando a deterioração de sua atividade metabólica.

É lógico que do ponto de vista industrial o interesse deve estar focado principalmente no rendimento e produtividade. A relação de equilíbrio entre o crescimento celular e a produção de etanol por *S. stipitis* é fortemente inibida na presença de elevadas concentrações de açúcar e etanol acumulado no meio, e este comportamento apresenta uma limitação na obtenção de elevados rendimentos e produtividades. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi desenvolver um processo de fermentação denominado retentostato extrativo para investigar o comportamento cinético da levedura *S. stipitis* em condições de crescimento próximas de zero. A estratégia de fermentação no modo retentostato permite o controle da velocidade específica de crescimento através do controle da taxa de alimentação de substrato no sistema e pode ser aplicada para evitar a inibição pelo substrato e acúmulo de sub-produtos indesejáveis. Somando-se a isso, no sistema aqui proposto o etanol é continuamente extraído pelo vácuo promovido no tanque *flash*, evitando assim que elevadas concentrações de etanol se acumulem no meio fermentativo. Estas estratégias em conjunto são essenciais para maximizar o desempenho da produção de etanol por *S. stipitis*, possibilitando obter altos rendimentos e produtividades. Por fim, o principal objetivo deste trabalho foi investigar como a composição do meio (especialmente em relação à concentração de xilose) e a velocidade específica de crescimento (em valores próximos de zero) podem influenciar na eficiência da produção de etanol. Os resultados obtidos aqui poderão ser úteis para incentivar futuros estudos em larga escala com o micro-organismo *S. stipitis* aplicados na conversão de hidrolisados lignocelulósicos para produção de etanol 2G pelas destilarias brasileiras.

## 8.2. Material e Métodos

### 8.2.1. Micro-organismo e meio de cultivo

A linhagem laboratorial *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 utilizada neste estudo é proveniente da coleção de levedura *ARS Culture Collection* (*National Center of Agricultural Utilization Research*, Peoria, IL). *S. stipitis* NRRL-Y7124 era anteriormente denominada *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, antes da recente reclassificação para o gênero de *Scheffersomyces* (Kurtzman and Suzuki, 2010). As culturas foram mantidas regularmente em tubos inclinados contendo meio GYMP (composição em g.L<sup>-1</sup>): ágar nutriente, 20; glicose, 10; extrato de levedura, 5; extrato de malte, 20; e fosfato de sódio monobásico, 2. As cepas foram mantidas a 4° C no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos / Faculdade de Engenharia de Alimentos / Unicamp, Campinas, Brasil. A ativação foi realizada em dois passos. Inicialmente, a pré-cultura foi ativada por inoculação de uma cultura estoque em frascos agitados de 250 mL, com 100 mL de meio GYMP (sem ágar) a pH 5,0 durante 24 h em agitador rotativo a 28 ° C e 150 rpm . No segundo passo, este inóculo foi aclimatizado em meio mineral com a mesma composição do biorreator durante um período de 24 h usando agitador rotativo nas mesmas condições utilizadas no primeiro passo. O extrato de levedura e o extrato de malte foram utilizados como um suplemento de aminoácidos e vitaminas necessários para suportar o crescimento das células. O meio mineral utilizado para a ativação e para os cultivos no modo retentostato está descrito em detalhes em Farias *et al.* (2014 ).

### 8.2.2. Esterilização

A esterilização do meio de cultivo foi realizada em autoclave a 121° C durante 15 min. O meio de alimentação e o aparato experimental foram esterilizados a 121° C durante 30 min. Para minimizar a variação na composição do meio (mais especificamente na concentração de xilose) as soluções de xilose foram esterilizadas separadamente a frio usando um sistema de membrana estéril de éster-celulose com 0,2 µm de diâmetro de poro (modelo do filtro Minikap HF MK2M-512-V6S, *Sprectrum Laboratories*, Inc., FL, EUA) e

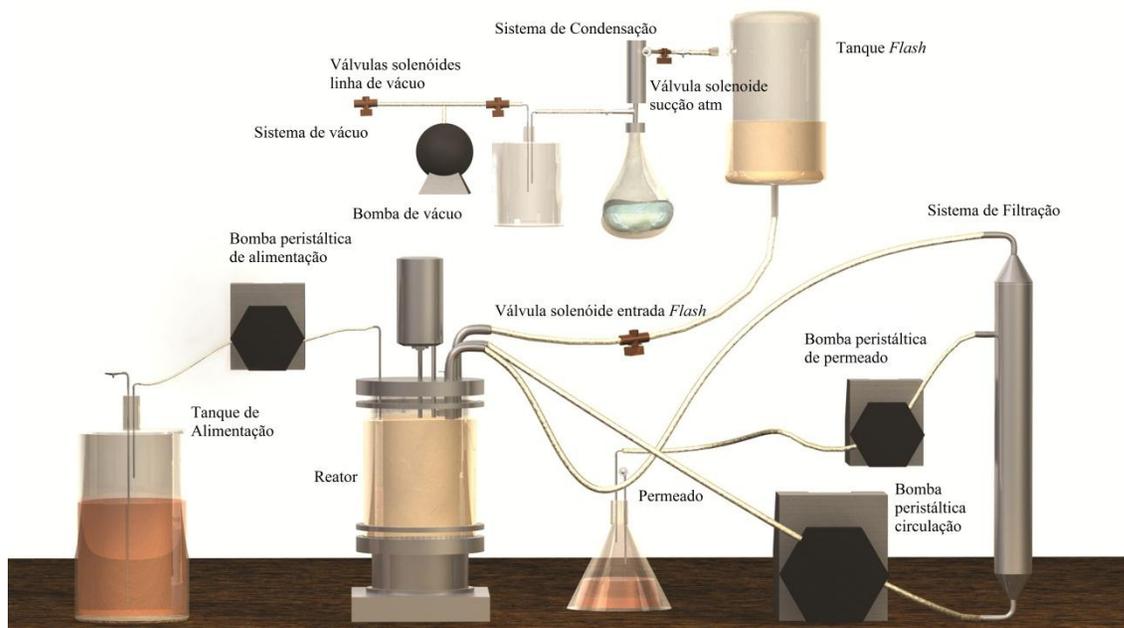
asépticamente adicionado ao sistema de acordo com cada uma das concentrações definidas.

### 8.2.3. Protótipo experimental

A tecnologia proposta neste estudo foi denominada ‘retentostato extrativo a vácuo’ (REV). O esquema do protótipo piloto utilizado para realização dos ensaios experimentais em escala laboratorial, é mostrado na Figura 8.1.

A construção deste protótipo experimental teve como objetivo investigar quantitativa e qualitativamente o comportamento cinético do micro-organismo *S. stipitis* em condições de crescimento próximas de zero permitindo, assim, o uso eficiente das xiloses, a fim de otimizar a produção de etanol por este micro-organismo. Crescimento nulo é aqui definido como uma situação na qual não ocorre nenhum crescimento; por outro lado, o micro-organismo permanece metabolicamente ativo, minimizando o consumo de substrato para crescimento celular e maximizando conseqüentemente a conversão em etanol. Para atingir este objetivo, foi proposto um protótipo de fermentação extrativa com reciclo total de células (retentostato). Para atingir esse objetivo, um sistema de microfiltração tangencial foi acoplado à linha de saída de um quimiostato padrão, possibilitando assim a retenção completa das células no sistema. Finalmente, para permitir a extração contínua de etanol, o sistema foi equipado com um tanque de vaporização instantânea sob vácuo, denominado tanque *flash*. Assim, em períodos de tempo pré-determinados pelo operador do sistema (de acordo com o etanol produzido), o meio de fermentação foi enviado para este tanque e a extração de etanol foi então promovida.

O sistema de fermentação extrativa usado para os testes consistiu dos seguintes equipamentos: i) fermentador; ii) o sistema de filtração; iii) tanque *flash*; iv) bombas peristálticas; v) sistema de vácuo; vi) do sistema de condensação. O protótipo foi completamente automatizado e controlado *online* através da aplicação de um sistema supervisor de controle construído utilizando o *software* LabVIEW, o qual permitiu o controle, monitoramento e tomada decisões em tempo real de acordo com os parâmetros do sistema.



**Figura 8.1.** Protótipo experimental retentostato extrativo a vácuo com retenção de células.

## 8.2.4. Etapas fermentativas

### 8.2.4.1. Cultivos em batelada simples

Ensaio no modo batelada simples foram realizados em um fermentador tipo Bioflo III (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) com 3,0 L de volume máximo. A temperatura foi mantida a 28 °C, pH 5,0 com a adição de soluções previamente esterilizadas de NaOH 2 N e HCl 2 N, aeração a 0,05 vvm e velocidade de agitação de 200 rpm. A taxa de aeração e velocidade de agitação foram definidas com base nas condições operacionais adotadas em nosso trabalho anterior (Farias *et al.*, 2014). A concentração inicial da xilose na etapa batelada foi de 50 g.L<sup>-1</sup> e as células foram inoculadas no reator a fim de proporcionar uma DO<sub>600</sub> inicial de cerca de 0,1-0,2. Amostras foram coletadas periodicamente para a medição da concentração de células, açúcar e etanol. A cultura foi inicialmente operada em modo batelada até à completa exaustão do açúcar, em seguida, o modo de fermentação em batelada alimentada foi iniciado.

#### 8.2.4.2. Cultivos em batelada alimentada

Cultivos em batelada alimentada foram realizados nas mesmas condições descritas para as culturas em batelada simples. Meio de cultivo previamente esterilizado e com composição mineral idêntica aos cultivos em batelada, contendo diferentes concentrações de xilose (variando de acordo com a faixa estudada) foi periodicamente alimentado para o reator. A solução de alimentação foi bombeada através de mangueiras de silicone estéreis ligadas com auxílio de uma bomba peristáltica *Masterflex* (Cole - Parmer International, EUA) a uma taxa de alimentação otimizada (de acordo com a concentração de xilose no meio de alimentação, a qual variou entre 100-200 g.L<sup>-1</sup>), levando também em consideração a taxa de consumo de substrato investigada em nosso trabalho prévio (Farias *et al.*, 2014). A alimentação foi realizada até que o volume de trabalho máximo do reator fosse alcançado, o qual era de aproximadamente 2,5 L.

O nível de líquido no reator foi controlado e monitorado pelo sistema supervisorio desenvolvido no *software LabVIEW* 10.1. Este controle era feito por um chaveador de tipo bóia produzido por Madison Co. modelo M5000. No início da batelada alimentada, quando o nível do reator estava baixo, o contato permanecia aberto. Em seguida, o sistema de controle enviava um comando que promovia a alimentação do meio de cultura para o reator através do acionamento da bomba peristáltica de alimentação. Neste caso, a variável manipulada era vazão de alimentação do sistema. Dessa forma, quando o nível estava baixo, a bomba peristáltica de alimentação era então acionada para promover a adição de um volume pré-determinado, a uma taxa de alimentação específica. A taxa de alimentação de substrato para cada caso foi baseada na concentração de xilose no meio de alimentação e na velocidade específica de consumo de substrato (obtida com base em estudos anteriores), levando em conta as características cinéticas e fisiológicas da levedura.

Quando o reator atingiu o nível máximo, o contato da boia de nível era então fechado, fornecendo uma corrente de cerca de 1 mA observado pelo sistema supervisorio de controle. Em seguida, a alimentação pela bomba peristáltica era interrompida, mantendo assim o nível do reator máximo e constante.

### 8.2.4.3. Cultivos em retentostato

O conceito de retentostato não é novo. Este tipo de processo é muito semelhante ao modo de quimiostato (taxa de crescimento entre  $\mu = D$ ; nenhuma linha de filtrado na saída), onde o meio de cultura é continuamente fornecido ao fermentador e o efluente é removido, mantendo o volume constante. Em contraste com um quimiostato, no retentostato ( $\mu \rightarrow 0$ ) a vazão de efluente na saída do filtro é equivalente à vazão de entrada do meio de alimentação e as células são então completamente retidas no sistema. O retentostato proposto neste estudo foi equipado com um módulo de filtração externo ligado à linha de efluente, resultando assim na total retenção celular dentro do tanque de fermentação.

Para promover este propósito, a fermentação foi iniciada no modo batelada alimentada, até que o reator houvesse atingido seu nível máximo e, após a completa utilização do substrato, o processo no modo retentostato foi então iniciado, através da retirada de efluente na saída do filtro. A técnica de microfiltração é aplicada quando se deseja separar partículas em suspensão do meio de cultivo (nesse caso, a massa celular) com base no tamanho do poro da unidade filtrante. Assim, a característica de retenção de uma membrana é uma função direta do seu diâmetro de poros. O elemento filtrante é constituído por um filtro inorgânico tubular feito de alumina de elevada pureza com diâmetro de poros de  $0,22 \mu\text{m}$ , área de filtração de  $0,0372 \text{ m}^2$  e comprimento de  $22,8 \text{ cm}$ , montados no interior de uma carcaça de aço inoxidável.

O reciclo de células foi promovido com intuito de obter alta densidade celular, com o objetivo de promover maiores produtividades. Para isso, o efluente líquido (sem massa celular) foi constantemente removido com auxílio de uma bomba peristáltica Masterflex acoplada na saída do sistema de filtração (ver Fig. 1). A bomba de retirada de efluente opera intermitentemente em sincronia com a bomba de alimentação, sendo responsável por manter a taxa de diluição do sistema. Os cultivos em retentostato foram operados a uma velocidade específica de crescimento em condições otimizadas. Como a retirada de amostras poderia perturbar o acúmulo de células no interior do sistema, o volume de amostras e a frequência de amostragem foram controladas e minimizadas.

#### 8.2.4.4. Extração a vácuo

Com o intuito de promover a extração do etanol do meio fermentativo, um tanque *flash*, operado a vácuo foi acoplado ao sistema. A extração foi promovida em períodos de tempo pré-determinados pelo operador do sistema, a fim de manter uma concentração constante e suficientemente baixa (na faixa de aproximadamente 30 g.L<sup>-1</sup>). No momento da extração, uma bomba de vácuo era acionada e o meio de fermentação era então transferido por sucção para o tanque *flash*, após a abertura de uma válvula solenóide (normalmente fechada) posicionada na entrada do reservatório. A fração de vapor com alta concentração de etanol era então condensada e coletada em um *trap*, que consiste em um condensador à baixa temperatura e um reservatório coletor.

#### 8.2.5. Avaliação do desempenho da etapa fermentativa

Para determinar o desempenho da cada etapa fermentativa, calcularam-se os fatores de conversão de substrato em etanol ( $Y_{p/s}$  – g.g<sup>-1</sup>) e conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$  – g.g<sup>-1</sup>). A produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$  – g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) também foi avaliada para cada etapa fermentativa. As equações utilizadas para estes cálculos são apresentados a seguir:

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)}; Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}; Q_p = \frac{(P_f - P_i)}{t_f} \quad (1); \text{ batelada simples}$$

$$Y_{p/s} = \frac{(P_f - P_i)}{\Delta S}; Y_{x/s} = \frac{(X_f - X_i)}{\Delta S}; Q_p = \frac{(P_f - P_i)}{V_R(t_2 - t_1)} \quad (2); \text{ batelada alimentada}$$

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S}; Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}; Q_p = \frac{\Delta P}{V_R(t_2 - t_1)} \quad (3); \text{ retentostato extrativo}$$

Sendo

$$\Delta P = (P_1 - P_2)V_R + P_{ext}V_{cond} \quad (4)$$

$$\Delta X = (X_2 - X_1)V_R; \quad (5)$$

$$\Delta S = (S_2 - S_1)V_R + F_a S_a(t_2 - t_1); \quad (6)$$

### 8.3. Resultados

#### 8.3.1. Implementação de cultivos no modo retentostato extrativo

Para estimar o comportamento cinético de *S. stipitis* em cultivos micro-aeróbicos limitados em xilose, um conjunto de experimentos no modo retentostato extrativo foi executado com diferentes concentrações iniciais de xilose no meio de alimentação (100, 150 e 200 g.L<sup>-1</sup>). A vazão de alimentação do sistema (correspondente a velocidade específica de crescimento na faixa de 0,002 a 0,025 h<sup>-1</sup>) variou de acordo com a concentração de xilose no meio e de acordo com o comportamento cinético observado em nosso trabalho anterior desenvolvido por Farias *et al.* (2014).

Inicialmente, *S. stipitis* foi submetida a um processo em batelada alimentada, com intuito de promover acúmulo de células. Após a completa exaustão do açúcar e o volume máximo de trabalho do sistema ter sido atingido deu-se início ao retentostato extrativo. A concentração de xilose no meio de alimentação variou de acordo com as condições de estudo.

As concentrações de substrato, células e etanol acumulado para cada concentração de xilose avaliada são apresentadas na Figura 8.2. Num retentostato ideal, o aumento da concentração de biomassa deve estabilizar após o cultivo prolongado. Este comportamento foi aproximadamente observado em toda a faixa de açúcares testada. Durante o cultivo com 100 g.L<sup>-1</sup> de xilose no meio de alimentação, o aumento de velocidade específica de crescimento variou de 0,025 a 0,005 h<sup>-1</sup>, e, em seguida, o acúmulo de células atingiu uma condição de estado semi-estacionário. A concentração máxima de células obtida nesta condição foi de 22,1 g.L<sup>-1</sup>. Por outro lado, observou-se uma diminuição da velocidade específica de crescimento de 0,007 para 0,003 h<sup>-1</sup> (a 150 g.L<sup>-1</sup>) e de 0,005 para 0,002 h<sup>-1</sup> (a 200 g.L<sup>-1</sup>). A concentração máxima celular obtida no interior do reator variou segundo as concentrações de xilose na alimentação, sendo respectivamente 22,1 g.L<sup>-1</sup>, 15,4 g.L<sup>-1</sup> e 14,0 g.L<sup>-1</sup> para as condições de 100 g.L<sup>-1</sup>, 150 g.L<sup>-1</sup> e 200 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, em todas as concentrações de xilose avaliadas no modo retentostato extrativo ficou claramente evidenciado o aumento do acúmulo de células até atingir um máximo, com tendência a se estabilizar, fator observado apenas durante cultivos prolongados (em torno de 20 dias de cultivo).

Uma das características peculiares dos cultivos em retentostato em comparação a um quimiostato sem retenção de células é que altas densidades celulares com baixas velocidades específicas de crescimento podem ser atingidas. Estudos prévios investigaram o consumo de xilose por *S. stipitis* durante cultivos operados no modo quimiostato, com taxa de diluição variando de 0,01 a 0,150 h<sup>-1</sup> (Farias *et al.*, 2014). Os resultados mostraram que a partir de um meio de alimentação com concentração de xilose de 95 g.L<sup>-1</sup> e D = 0,01 h<sup>-1</sup> foi possível atingir uma concentração máxima de células de 5 g.L<sup>-1</sup>. Quando D aumentou de 0,01-0,02, o acúmulo de células diminuiu consideravelmente (X = 1,4 g.L<sup>-1</sup> para D = 0,02 h<sup>-1</sup>). Quando a taxa de diluição foi avaliada em valores acima de 0,02 h<sup>-1</sup> o acúmulo de células reduziu drasticamente. O fenômeno *washout* foi observado em cultivos em quimiostato operados com valores para taxa de diluição (D) superiores a 0,15 h<sup>-1</sup>. Ao comparar os dados obtidos no quimiostato com os resultados obtidos para os cultivos em retentostato, é possível notar que nas velocidades específicas de crescimento inferiores (aplicadas no modo retentostato) obteve-se uma melhoria no acúmulo de células, cerca de 4.4 vezes superior ao modo quimiostato.

O perfil de consumo de substrato variou de acordo com a vazão de alimentação bem como com a concentração de xilose avaliada no meio de alimentação. O melhor comportamento foi observado para a condição de 100 g.L<sup>-1</sup> de xilose na alimentação, experimento no qual foi possível manter uma baixa concentração de substrato no meio fermentativo em torno de 10 g.L<sup>-1</sup> no decorrer de todo o processo. Maiores oscilações na concentração de substrato foram observadas quando a vazão de alimentação aumentou para 1 mL.min<sup>-1</sup>, correspondente a uma velocidade específica de crescimento de 0,025 h<sup>-1</sup>. Nesta nova vazão avaliada o micro-organismo necessitou de aproximadamente 150 h (Fig 8.2a) para se readaptar à nova condição, sendo capaz então de manter novamente baixas concentrações de substrato no meio. Para maiores concentrações de substrato no meio de alimentação, de 150 g.L<sup>-1</sup> e 200 g.L<sup>-1</sup>, a manutenção de baixas concentrações de substrato só foi possível quando foram aplicadas baixas vazões de alimentação, na ordem de 0,10 mL.min<sup>-1</sup> (Fig. 8.2b e Fig. 8.2c). Isso ocorreu provavelmente em virtude da inibição do metabolismo celular pelas elevadas concentrações de xilose administradas no meio de alimentação, concomitantemente com a operação de condições para a vazão de alimentação não otimizadas.

A presença de glicerol não foi detectada em nenhuma etapa fermentativa. Ácido acético e xilitol foram detectados apenas durante os cultivos em retentostato prolongados, e foi observado um aumento na concentração de xilitol de acordo com a concentração de xilose no meio de alimentação ( $X_y = 12,73 \text{ g.L}^{-1}$  a  $200 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose; 4,6 a  $150 \text{ g.L}^{-1}$  e 2,3 a  $100 \text{ g.L}^{-1}$ ). Como consequência, ocorreu uma diminuição no rendimento em etanol durante prolongados períodos de fermentação (após aproximadamente 20 dias na etapa retentostato). Este comportamento está de acordo com nossas observações prévias (Farias *et al.*, 2014), na qual foi evidenciado que altas concentrações de xilose resultam em maiores quantidades de xilitol acumulado no meio, promovendo simultaneamente uma redução na produção de etanol, o que não é interessante do ponto de vista industrial. Apesar disto, a concentração de xilitol atingida para o retentostato avaliado a  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose no meio de alimentação foi muito baixa. Mais uma vez ficou comprovado que o desempenho do sistema de produção do etanol em baixas concentrações de açúcar operado em condições ótimas é crucial para a obtenção de elevados rendimentos e produtividades.

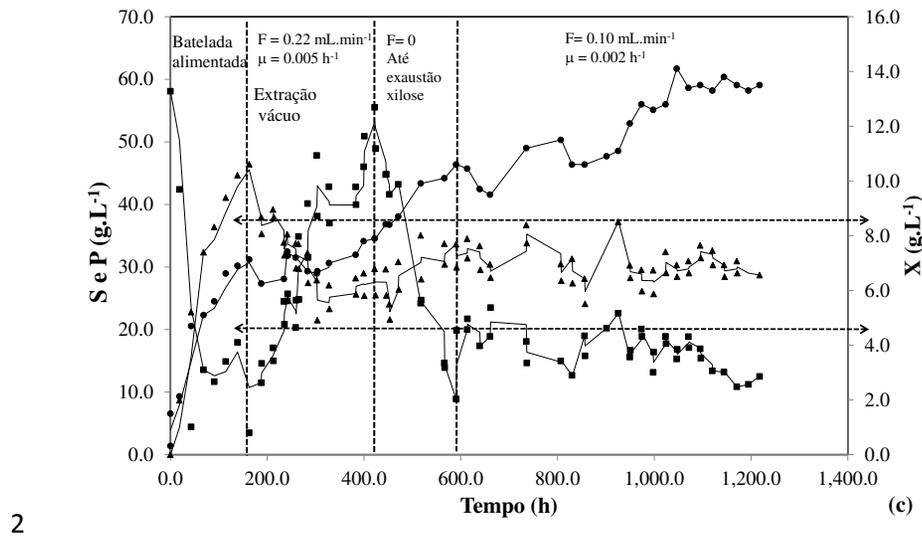
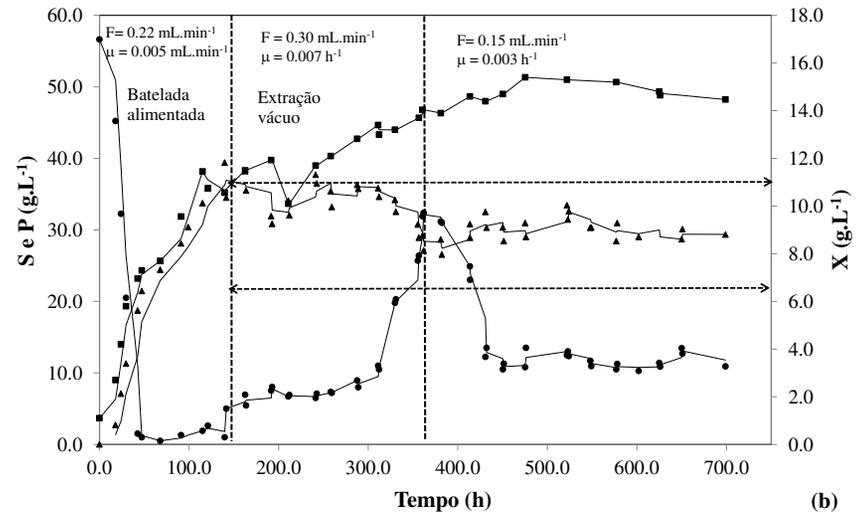
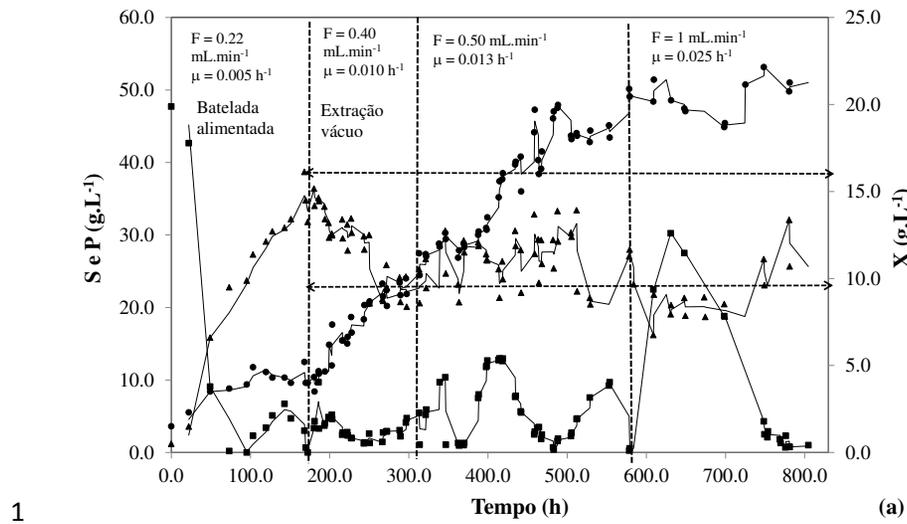
### 8.3.2. Extração a vácuo

A concentração de etanol aumentou continuamente durante a fase batelada alimentada para todas as concentrações de xilose analisadas (ver Fig. 8.2). Após o início do modo de operação retentostato extrativo a vácuo (REV), o etanol produzido foi então extraído intermitentemente pela aplicação de vácuo no tanque *flash*. A etapa extrativa foi realizada com o intuito de manter a concentração de etanol dentro do reator em níveis suficientemente baixos para minimizar a inibição (abaixo de  $30 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Os perfis de concentração de etanol para cada concentração de xilose individual analisada estão apresentados na Figura 8.2. De acordo com essa figura, verifica-se que através da aplicação da etapa extrativa no tanque *flash* foi possível manter a concentração de etanol no reator entre 20 e  $35 \text{ g.L}^{-1}$ , faixa de concentração de etanol que não causa efeitos tóxicos ao metabolismo das leveduras.

### 8.3.3. Determinação dos parâmetros cinéticos de cultivo

A Tabela 8.1 resume os dados de conversão e produção do processo, possibilitando comparar o comportamento de *S. stipitis* durante o crescimento e acúmulo de etanol durante diferentes fases do processo de fermentativo (batelada simples, batelada alimentada e retentostato extrativo a vácuo). Estes resultados sugerem a eficiência na produção de etanol durante o processo REV desenvolvido neste estudo. A concentração de etanol recolhido no condensador oscilou entre 167 e 240 g.L<sup>-1</sup>, de acordo com a concentração de açúcar no meio de alimentação, ou seja, quanto maior a concentração de xilose aplicada maior foi a concentração de etanol no condensado. Quando a concentração de xilose em meio de alimentação aumentou de 100 g.L<sup>-1</sup> a 200 g.L<sup>-1</sup> houve um aumento considerável na concentração de etanol no condensador (ver Tabela 8.1). Por outro lado, houve uma diminuição na concentração de etanol no condensador durante cultivos prolongados operados no modo retentostato. Esta redução na concentração de etanol no condensado ocorreu provavelmente em virtude da diminuição da conversão de açúcar no fermentador, no final dos cultivos retentostato (ver Figura 8.2).



**Figura 8.2.** Perfis de concentrações de célula, substrato e etanol em função do tempo de fermentação durante cultivos com *S. stipitis* operados no modo retentostato extrativo a vácuo, realizados com diferentes concentrações de substrato no meio de alimentação a)  $S_a = 100 \text{ g.L}^{-1}$ ; b)  $S_a = 150 \text{ g.L}^{-1}$ ; c)  $S_a = 200 \text{ g.L}^{-1}$ . Símbolos: X (●); S (■) and P (▲).

No entanto, foi possível notar que com o aumento da concentração de xilose em meio de alimentação, a concentração de etanol no condensado também aumentou; embora ainda permaneça açúcar residual no meio de fermentação. Isto indica que o processo é auto-ajustável, mantendo a concentração de etanol no reator substancialmente constante, mesmo com distúrbios causados pela alimentação de meio no sistema.

O rendimento em células no modo retentostato extrativo apresentou valores superiores em relação às etapas batelada e batelada alimentada, sendo que este comportamento foi observado para todas as concentrações iniciais de xilose avaliadas no meio de alimentação. O desempenho do rendimento em células durante os cultivos no modo retentostato extrativo foi consistente com o acúmulo celular, ou seja, o maior rendimento de células ( $Y_{x/s} = 0,06 \text{ g.g}^{-1}$ ) foi obtido na condição de  $S_a = 100 \text{ g.L}^{-1}$ , concentração de xilose na qual também foi atingida a máxima concentração de células ( $X = 22 \text{ g.L}^{-1}$ ).

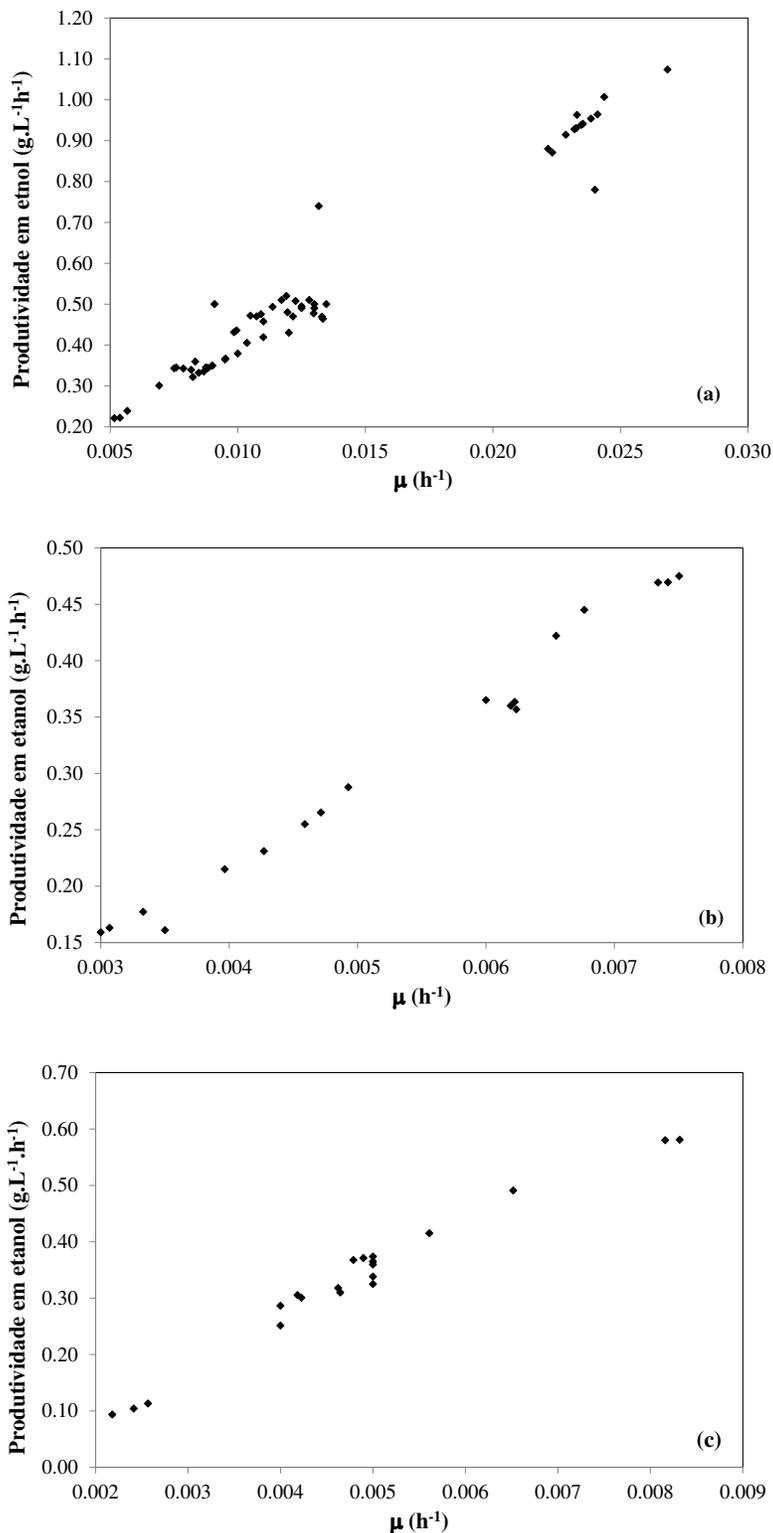
**Tabela 8.1.** Comparação dos parâmetros cinéticos para *S. stipitis* NRRL-Y7124 durante fermentações no modo batelada, batelada alimentada e retentostato extrativo a vácuo\*.

Parâmetros cinéticos	50 g.L <sup>-1</sup>	100 g.L <sup>-1</sup>	150 g.L <sup>-1</sup>	200 g.L <sup>-1</sup>
	Batelada	Batelada alimentada/ Retentostato	Batelada alimentada/ Retentostato	Batelada alimentada/ Retentostato
X (g.L <sup>-1</sup> )	4.70	11.45/22.15	11.80/15.40	7.13/14.00
P (g.L <sup>-1</sup> )	21.00	38.70/20-35	39.40/20-35	46.50/20-35
$Q_p$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	0.26	0.30/1.00	0.47/0.45	0.58/0.37
$Y_{p/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0.39	0.43/0.47	0.44/0.43	0.43/0.42
$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0.07	0.12/0.06	0.11/0.04	0.06/0.03
$P_{max}$ no Cond. (g.L <sup>-1</sup> )	--	---/167	---/195	---/240

\*As células foram inicialmente crescidas em cultivos em batelada simples com 50 g.L<sup>-1</sup> de xilose pura antes de transferir para o modo de operação batelada alimentada, com suplementação de xilose no meio de alimentação com concentração variando na faixa de estudo de 100 g.L<sup>-1</sup> a 200 g.L<sup>-1</sup>.

A variação na produtividade é mostrada na Figura 8.3, para cada perfil de concentração de xilose avaliada durante os cultivos com a tecnologia REV. Verifica-se que a produtividade volumétrica em etanol aumentou de forma linear com o aumento da velocidade específica de crescimento. No entanto, no sistema retentostato desenvolvido

aqui, muito açúcar foi perdido quando foram aplicadas altas taxas de alimentação de substrato no sistema, especialmente quando as altas concentrações de xilose foram administradas no meio de alimentação, resultando conseqüentemente em uma baixa produtividade, o que não é economicamente interessante. Os resultados revelaram que a velocidade específica de crescimento ótima foi de  $0.025 \text{ h}^{-1}$  obtidos com  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de xilose no meio de alimentação, sendo nesta condição capaz de promover a maximização da produção de etanol. Nesta condição, foi obtido o melhor desempenho para os parâmetros cinéticos de processo, o que resultou em um rendimento em etanol de  $0,43 \text{ g.g}^{-1}$  e a produtividade em etanol de  $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Estes valores foram 0,9 e 4,35 vezes superior ao rendimento e produtividade em etanol, respectivamente, em comparação com os cultivos operados na etapa batelada. Quando a concentração de xilose em meio de alimentação aumentou de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  para  $150 \text{ g.L}^{-1}$  e  $200 \text{ g.L}^{-1}$ , houve uma ligeira diminuição na produtividade em etanol em comparação com os cultivos em batelada alimentada (ver Tabela 8.1). Mais uma vez, isso ocorreu devido à conversão ineficiente de substrato. Por outro lado, a produtividade em etanol observada no modo retentostato a  $100 \text{ g.L}^{-1}$  foi muito superior à produtividade observada durante os cultivos em batelada e batelada alimentada, o que sugere que o controle da vazão de alimentação em condições otimizadas foi capaz de promover uma produção eficiente de etanol.



**Figura 8.3.** Influência da velocidade específica de crescimento em relação à produtividade em etanol para *S. stipitis* em diferentes concentrações de xilose no meio de alimentação. a)  $S_a = 100 \text{ g.L}^{-1}$ ; b)  $S_a = 150 \text{ g.L}^{-1}$ ; c)  $S_a = 200 \text{ g.L}^{-1}$ . Os experimentos foram realizados utilizando a tecnologia REV.

Ficou evidenciado através deste estudo que a levedura *S. stipitis* é fortemente inibida por altas concentrações de etanol e de substrato, não promovendo altas conversões e altos rendimentos simultaneamente em processos em batelada simples e batelada alimentada. Em vista das elevadas concentrações de etanol no final de cada ciclo de fermentação (nas etapas batelada simples e batelada alimentada), este álcool é um dos principais fatores de estresse que atuam sobre o metabolismo da levedura (Basso *et al.*, 2011). Devido a isso, a manutenção de concentrações baixas de etanol no meio de fermentação é extremamente importante, a fim de minimizar estes fatores inibitórios. O papel inibitório de etanol sobre o metabolismo de *S. stipitis* ainda não foi completamente compreendido. Somando-se a isso, concentrações elevadas de etanol atacam a membrana citoplasmática das células de levedura (Thomas *et al.*, 1978; Alexandre *et al.*, 2001). Como resultado, a fluidez da membrana é profundamente alterada na presença de elevadas concentrações de etanol e, conseqüentemente, a permeabilidade da membrana para alguns íons (especialmente os íons  $H^+$ ) é significativamente afetada. Nesta condição, como os íons podem entrar no interior das células, ocorre uma dissipação do gradiente electroquímico através da membrana citoplasmática, afetando assim a formação e a manutenção da força próton motriz, que por sua vez diminui o pH intracelular até provocar a morte celular. Além de afetar a composição da membrana celular, existem vários outros efeitos tóxicos do etanol sobre a fisiologia da levedura durante o processo fermentativo, incluindo a inibição do crescimento, e inativação enzimática, o que leva a uma diminuição da viabilidade celular (Basso *et al.*, 2011).

Apesar destes problemas, altas concentrações de etanol são desejáveis a fim de reduzir o consumo de água e os custos de energia durante a etapa de destilação. Uma grande quantidade de pesquisas está sendo conduzida para promover a extração do etanol do caldo fermentativo, a fim de operar processos fermentativos com obtenção de elevadas concentrações de etanol, especialmente para o caso de reciclo de células. Atala (2006) propôs um sistema extrativo a vácuo para produzir etanol 1G durante o consumo de glicose por *Saccharomyces cerevisiae*. Através da tecnologia extrativa para produção de etanol 1G foi possível alcançar uma produtividade de  $10 \text{ g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}$  (com  $230 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares provenientes do melaço de cana de açúcar no meio de alimentação). Através desta tecnologia, aplicada à produção de etanol 2G, foi possível suprir os inconvenientes

fisiológicos encontrados pela levedura *S. stipitis* durante o consumo de açúcares C5, principalmente em relação à detecção de forte inibição do crescimento do micro-organismo frente a altas concentrações de açúcar e etanol.

Por fim, o sistema REV desenvolvido neste trabalho foi capaz de manter uma baixa concentração de etanol no interior do meio de fermentação e com isso evitar os efeitos do estresse ao metabolismo da levedura. Uma vez eliminados os fatores que inibem o crescimento celular, é possível operar um sistema no qual as condições fisiológicas da levedura não são afetadas, a saber, a viabilidade das células (sem inibição do crescimento), e com isso maiores rendimentos e produtividades podem ser facilmente alcançados.

#### 8.4. Conclusão

Durante os cultivos operados no modo retentostato extrativo a vácuo, a máxima concentração celular atingida foi  $22 \text{ g.L}^{-1}$ , quando a concentração de xilose em meio de alimentação foi de  $100 \text{ g.L}^{-1}$ . O valor de concentração celular diminuiu quando a concentração de xilose no meio de alimentação de xilose aumentou para 150 e  $200 \text{ g.L}^{-1}$ , afetando assim o rendimento do processo. A concentração de açúcar no reator foi convertida em quase sua totalidade para a concentração de xilose no meio de alimentação de  $100 \text{ g.L}^{-1}$ . Para as concentrações de 150 e  $200 \text{ g.L}^{-1}$  a conversão de açúcar não foi completa, apresentando concentração de açúcar residual no fermentador. Em parte, esta diminuição na conversão de substrato foi agravada pela diminuição na concentração e viabilidade celular, assim como a taxa de alimentação de substrato a uma vazão inadequada. A concentração de etanol no interior do reator oscilou entre  $20\text{-}35 \text{ g.L}^{-1}$  durante a etapa extrativa, mesmo com as perturbações causadas pelas mudanças na concentração de substrato no meio de alimentação. O tanque *flash* operou corretamente, possibilitando a obtenção de uma solução alcoólica no condensador com uma concentração variando  $167\text{-}240 \text{ g.L}^{-1}$ , variação esta promovida em detrimento da variação do nível de xilose no meio de alimentação. A máxima produtividade em etanol foi de  $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  obtida para a condição de  $100 \text{ g.L}^{-1}$  no meio de alimentação, valor 4,3 vezes superior ao valor de  $0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  encontrado no processo tradicional batelada simples. Os dados aqui apresentados podem estimular as pesquisas de uso do sistema REV para produção de etanol

2G, chegando-se a processos apropriados às destilarias brasileiras, proporcionando uma estratégia alternativa que possibilita trabalhar com leveduras que exigem alta tolerância a diferentes fatores de estresse (especialmente alto teor de açúcar e altas concentrações de etanol).

## Referências

Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K., & Jeffries, T. W. The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007, 137:653–662.

Alexandre, H.; Ansanay-Galote, V., Dequin, S.; Blondin, B. Global gene expression. During short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 2001, 498(1):98-103.

Andersson, L., Stranberg, L., Haggstrom, L., & Enfors, S. O. Modeling of high cell density fed-batch cultivation. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994, 14:39–44.

Atala, D. Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo Fermentativo Extrativo de Produção de Etanol. PhD thesis, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, Brazil, 2006.

Basso, L. C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: Bernardes MAS (ed) *Biofuel production-recent developments and prospects*. Intech, Rijeka. 2011, pp 85-100.

Boender, L.G.M.; Hulster, E.A.F.; Maris, A.J.A.; Daran-Lapujade, P.; Pronk, J.T. Quantitative physiology of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero specific growth rates: a retentostat study. *Applied and Environ. Microbiol.* 2009, 75(17): 5607-5614.

Boender, L.G.M. Physiology and Robustness of *Saccharomyces cerevisiae* at near-zero growth specific growth rate. PhD thesis. TU Delft: Delft University of Technology, Delft, Holland, 2011.

Brock, T.D. Microbial growth rates in nature. *Bacteriol. Rev.* 1971, 35: 39-57.

Della-Bianca, B. E.; Basso, T. O.; Stambuk, B. U.; Basso, L.C.; Gombert, A.K. What do we know about the yeast stains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013a, 97(3):979-991.

Della-Bianca, B.E.; A.K., Gombert. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013b, 104:1083-1095.

Farias, D.; Andrade, R.R.; Maugeri, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 172(1):361-79.

Hebert, D.; Elsworth, R.; Telling, R.C. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 1956, 14:601-622.

Hebert, D. A Theoretical Analysis of Continuous Culture System. In: *Continuous Culture of micro-organism* London: Society of Chemical Industry. 1961, 21-53.

Koch, A.L. Microbial physiology and ecology of slow growth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997, 61:305-318.

Kurtzman CP, and Suzuki M: Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Bajejiella*, *Meyeroozyma*, *Milleroozyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 2010, (51):2-14.

Lin, Y.; Tanaka, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 69:627-642.

Lynd, L.R.; Laser, M.S.; Bransby, D.; Dale, B.E., Davison, B.; Hamilton, R. How biotech can transform biofuels. *Nat. Biotechnol.* 2008, 26:169-172.

Monod, J. La technique de culture continue theorie et applications. *Ann. Inst. Pauster.* 1950, 79:390-410.

Novick, A.; Szilard, L. Description of the chemostat. *Science.* 1950, 112:715-716.

Pirt, S.J. Maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. R. Soc. Lond., B. Biol. Sci.* 1965, 163:224-231.

Slininger, P. J., Dien, B. S., Gorsich, S.W., & Liu, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRLY-7124. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006, 72:1285–1296.

Thomas, D.S.; Hossack, J.A.; Rose, A.H. Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology.* 1978, 117(3):239-245.

Unrean, P., & Nguyen, N. H. Rational optimization of culture conditions for the most efficient ethanol production in *Scheffersomyces stipitis* using design of experiments. *Biotech Prog.* 2012, 28:1119–1125.

Urean P, Nguyen NHA: Optimized Fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013, (169):1895-1909.



## **CAPÍTULO 9**

### **9. Considerações Finais**



## 9.1. Conclusões Gerais

Esta tese de doutorado teve como objetivo principal desenvolver uma estratégia eficiente de produção de etanol 2G a partir de pentoses por *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124, através de uma tecnologia alternativa, denominada ‘retentostato extativo a vácuo’ com intuito de aumentar a produtividade do processo, e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção deste combustível.

Para tal, investigou-se o comportamento cinético de *S. stipitis* durante o consumo de uma ampla faixa de concentrações iniciais de xilose, avaliando-se os perfis de acúmulo de biomassa, consumo de substrato e acúmulo de produto. Com os resultados obtidos e tendo em vista a influência do comportamento cinético para obtenção de altos rendimentos e produtividades, desenvolveu-se um modelo matemático para descrever a cinética de fermentação de xilose pela linhagem *S. stipitis* NRRL-Y7124, através de fermentações realizadas no modo batelada e contínuo. Altas concentrações de etanol foram atingidas tanto no modo batelada (54.9 g.L<sup>-1</sup>) quanto no modo contínuo (41.9 g.L<sup>-1</sup>) e o micro-organismo apresentou duplo efeito inibitório tanto pela concentração inicial de xilose com pelo etanol acumulado.

Os dados experimentais obtidos foram utilizados para ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo matemático, sendo acrescentado um termo para cada tipo de inibição constatada. A adição destes termos de inibição (substrato e etanol) melhorou a acurácia do ajuste e os resultados preditos pelo modelo apresentaram boa concordância com as observações experimentais. Os resultados obtidos permitiram concluir que o parâmetro  $Y_x$  tende a decrescer enquanto que o parâmetro  $Y_{p/x}$  tende a aumentar com o aumento da concentração inicial de xilose no meio, provavelmente devido ao forte efeito inibitório causado por altas concentrações de xilose, e conseqüentemente pelas altas concentrações de etanol acumuladas. O modelo matemático proposto pode ser útil para processos de predição e controle, bem como para simulação e otimização de processos fermentativos, além de permitir a aquisição de importantes gargalos que poderão ser aplicados for promover uma utilização eficiente de xilose gerando conseqüentemente redução nos custos de produção em escala industrial.

No entanto, a modelagem matemática de processos cinéticos é uma tarefa difícil e demorada devido ao grande número de parâmetros a serem estimados pelo modelo. O modelo matemático proposto é composto por 8 parâmetros cinéticos. Dessa maneira, com o intuito de selecionar os parâmetros cinéticos mais significativos do modelo proposto aplicou-se a metodologia de Plackett-Burman para análise de sensibilidade paramétrica. A redução do número de parâmetros cinéticos a serem estimados pelo modelo através da análise de sensibilidade paramétrica reduziu a complexidade da estimação, permitindo a realização de uma técnica muito mais rápida com uma performance do modelo muito mais precisa. Os parâmetros que se mostraram mais relevantes para todos os perfis (acúmulo de biomassa, consumo de substrato e acúmulo de etanol) foram  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ,  $Y_x$ ,  $n$  and  $Y_{p/x}$ , os quais deverão ser obrigatoriamente ajustados no caso de mudanças nas condições operacionais.

Uma vez que foi identificada inibição da linhagem *S. stipitis* por elevadas concentrações de substrato, o modo de cultivo batelada alimentada foi investigado para evitar a repressão metabólica devido ao excesso de alimentação de substrato. Como resultado ficou evidenciado que a manutenção de baixas concentrações de xilose no biorreator é um dos fatores chave para obtenção eficiente de etanol 2G por *S. stipitis* a partir de xilose. A combinação de operação do sistema com concentrações de xilose no meio de alimentação na faixa ótima (100 g.L<sup>-1</sup>), somadas à uma otimizada velocidade de alimentação de meio para o biorreator (correspondente a uma velocidade específica de crescimento da ordem de 0.01 h<sup>-1</sup>) permitiu atingir uma eficiente produção de etanol 2G.

Os resultados mostraram que a estratégia de batelada alimentada proposta possibilitou a obtenção de rendimentos, concentração e produtividade em etanol mais elevadas do que quando comparadas com os resultados obtidos para o modo batelada simples. Através dos resultados obtidos para os experimentos operados no modo batelada alimentada, desenvolveu-se um modelo cinético, também considerando o duplo efeito inibitório da concentração de substrato e etanol. O modelo proposto descreveu satisfatoriamente o perfil cinético do consumo de xilose por *S. stipitis* durante a estratégia de batelada alimentada, sendo que a estratégia proposta permitiu reduzir o tempo de

fermentação, aumentar os rendimentos e produtividades, e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção, tornando o processo mais atrativo e economicamente viável.

Para montagem e instrumentação do protótipo experimental foram realizadas algumas alterações a partir do protótipo inicialmente proposto por Atala (2006), que possibilitaram o desenvolvimento dos ensaios experimentais. O protótipo desenvolvido em escala de bancada laboratorial é robusto satisfazendo a condição de fermentação ‘retentostato extrativa a vácuo’. A configuração proposta ainda necessita de alguns ajustes finos para melhoria da sua operacionalidade e desempenho, mas com os recursos materiais e tempo disponível foi a melhor configuração conseguida. As rotinas e sub-rotinas e as Interfaces Homem Máquinas desenvolvidas para o controle do processo fermentativo extrativo foi fundamental para a sua operacionalidade sendo que apresentaram um bom desempenho e robustez.

O sistema *flash* funcionou corretamente, do qual foi obtida uma solução alcoólica no condensado por volta de 40 °GL. A fermentação no biorreator operou com concentrações de etanol de 4 °GL, valor este pouco inibitório para a levedura do processo, mesmo com alimentações concentradas de xilose, contendo até 200 g.L<sup>-1</sup> de açúcar. A máxima produtividade em etanol 2G foi obtida para a concentração de substrato na alimentação de 100 g/L e foi de 1 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, valor este 4.3 vezes superior ao encontrado no processo batelada simples. Este resultado vem de encontro ao objetivo inicial que era de viabilizar a operação do sistema, com baixo teor de etanol no meio fermentativo, para garantir altas produtividades, mesmo em condições de alta concentração de açúcares na alimentação. Embora os parâmetros operacionais do processo não estejam ainda otimizados, verificou-se que a produtividade do sistema foi superior ao do processo contínuo convencional.

## 9.2. Sugestões para trabalhos futuros

Devido aos problemas surgidos com a montagem do protótipo experimental e pelo prazo de execução do trabalho proposto ter findado, não foram executados todos os ensaios previstos inicialmente, portanto suger-se para trabalhos futuros as seguintes propostas:

- Realização de ensaios fermentativos com hidrolisado hemicelulósico, para investigar o comportamento cinético de consumo deste substrato e produção de etanol pela linhagem *S. stipitis*;
- Automatizar as válvulas de entrada e saída do tanque *flash*, com intuito de tornar o processo menos cansativo para o operador do sistema;
- Aplicar a metodologia de engenharia evolutiva com a linha *S. stipitis*, com intuito de aprimorar a adaptabilidade da linhagem à diferentes condições de estresse, como é o caso das elevadas concentrações de substrato e etanol, bem como para melhorar a performance fermentativa da mesma;
- Modelagem dos resultados obtidos durante o processo retentostato extrativo e ajuste dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos do modelo;
- Estudo dinâmico do processo através de simulação em computador;
- Otimização das condições operacionais utilizando a metodologia de superfície de resposta via simulação em computador buscando a maximização do rendimento, produtividade e da conversão em etanol;
- Estudar a etapa de destilação do etanol 2G obtido.

