



**PERFIL FERMENTATIVO DE UMA LINHAGEM DE *Dekkera*
bruxellensis van der Walt (1964) A PARTIR DE HIDROLISADOS
LIGNOCELULÓSICOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

ALEXANDRE LIBANIO SILVA REIS

**RECIFE
Março/2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PERFIL FERMENTATIVO DE UMA LINHAGEM DE *Dekkera
bruxellensis* van der Walt (1964) A PARTIR DE HIDROLISADOS
LIGNOCELULÓSICOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE
ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Micologia Aplicada
Alexandre Libanio Silva
Reis
Orientador: Marcos
Antônio de Moraes Júnior,
Dr.

RECIFE
Março/2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Reis, Alexandre Libanio Silva

Perfil fermentativo de uma linhagem de *Dekkera bruxellensis* van der Walt (1964) a partir de hidrolisados lignocelulósicos e suas implicações na produção de etanol de segunda geração/ Alexandre Libanio Silva Reis. – Recife: O Autor, 2014.

94 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Júnior

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Biologia de Fungos, 2014.

Inclui bibliografia

1. Leveduras (fungos) 2. Álcool 3. Fermentação I. Título.

579.562

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-07

PERFIL FERMENTATIVO DE UMA LINHAGEM DE *Dekkera bruxellensis* van der Walt (1964) A PARTIR DE HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS E SUAS IMPLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

ALEXANDRE LIBANIO SILVA REIS

Data da defesa: 14 de Março de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior – (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Genética

Dra. Cristina Maria de Souza Motta – Examinadora Interna
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Micologia

Dr. George Jackson de Moraes Rocha – Examinador Externo
CNPEN – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica

Dr. Will de Barros Pita – Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos

Aos meus pais Bráulio e Marinalva, à minha esposa Cláudia e ao meu
filho Alexandre (que esta Tese sirva de inspiração).

Dedico

"Somente o conhecimento pode dizer ao coração o que é o bem"

Dom Bosco

Agradecimentos

São com as dificuldades e momentos difíceis que encontramos os verdadeiros amigos, aqueles que apoiam, acreditam e principalmente motivam para que de alguma forma busquemos nossos objetivos e tornem nossos sonhos possíveis. Agradeço.

Aos meus pais Braulio Ramos dos Reis e Marinalva de Araújo Silva que desde a graduação acreditaram que eu conseguiria chegar aonde cheguei e que foram os verdadeiros fomentadores dessa conquista, com muito amor, agradeço.

À minha grandiosa esposa Cláudia Gonçalves Ferreira Reis, meu porto seguro, minha incentivadora que com paciência e amor me fez conquistar mais essa etapa, cuidando de mim e do meu filho Alexandre Libanio Silva Reis Filho. Com muito amor, minha gratidão aos dois.

Ao meu pai acadêmico: Professor Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, que mais do que me orientou nessa Tese, me acolheu, me aconselhou, foi amigo e me ensinou mais que ser um cientista, me ensinou a ser uma pessoa de caráter e humilde, com sua inteligência, sabedoria e confiança para que eu pudesse desenvolver esse trabalho. Nunca aprendi tanto quanto nesses últimos quatro anos. Em especial, agradeço.

Aos meus familiares que sempre me incentivaram, em específico a minha irmã Maria Júlia Reis Vieira da Cunha que foi a principal incentivadora, durante a graduação, para que eu me profissionalizasse e me transformasse em um homem.

Aos meus amigos-irmãos Walberto Barbosa, Elton Gustavo e Emmanuel Dutra, que muito me apoiaram nesse desafio.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, pela concessão da sua infraestrutura, reagentes e capacitação. Foi um prazer permutar conhecimentos e gerar tecnologias e inovação nesses últimos seis anos como pesquisador.

Aos meus colegas dos Laboratórios de Bioprocessos e Engenharia Metabólica: Aldenise Miranda, Raquel Souza, Rafael Barros, André Ribas, João Assis, Fernanda Leite, Anna Carolina, Jeniffer Melício, Isabela Pio, Manoela Adelina, Ramón Rocha, Maria do Livramento, Maria do Carmo, Andrezza Soares e Joana Alves, que muito me ajudaram

durante a execução dos meus experimentos e em especial ao Técnico Isaac Martins, meu amigo e que seu apoio foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

Aos meus colegas do CETENE, Manuela Mota Lins, Odemar Júnior, Cláudia Crasto, Maria do Livramento e James Correia que com muito carinho agradeço os conselhos e a amizade cultivada nesse transcurso.

Aos meus colegas de curso do doutorado Ângelo Souto, João Ricardo, Carla Lira, Josiane Santana, Francineyde Alves, Susane Cavalcanti e em especial ao meu “irmão” Martival dos Santos Moraes, pelo companheirismo e compartilhamento dos conhecimentos adquiridos no nosso Programa de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo suporte financeiro concedido durante o meu ciclo como pesquisador do CETENE o que me proporcionou a conclusão desse doutorado.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, sob a coordenação das Professoras Elaine Malosso e Neiva Tinti, que souberam me orientar nos momentos em que mais estava perdido e não menos importante, à Secretária Anna Karolina, que muito me ajudou a manter minhas obrigações acadêmicas em dia.

RESUMO GERAL

Os maiores produtores de etanol no mundo são os Estados Unidos, a partir do amido de milho, e o Brasil, a partir da sacarose da cana-de-açúcar. Nos últimos anos, o Brasil não aumentou apreciavelmente a sua produção, enquanto que, por outro lado, a indústria de etanol nos Estados Unidos vem sofrendo uma grande expansão, em torno de 1 milhão m³/ano, com planejamento para produção de 40 milhões de m³ de etanol em 2025. Em atendimento a uma demanda que cresce significativamente em função do reconhecimento mundial dos benefícios do etanol como combustível, os Estados Unidos e o Brasil, assim como diversos outros países, entraram em uma corrida, que tende a se acirrar, para o desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. *Dekkera bruxellensis* é uma levedura que é usualmente reconhecida como um organismo contaminante. A espécie, como todas as leveduras consideradas não-*Saccharomyces*, apresenta graus variados de mecanismos catalíticos de suas glicosidades e poucos estudos têm investigado o desempenho das enzimas produzidas por esses microrganismos. A presente Tese teve como objetivo principal observar e interpretar os parâmetros cinéticos e as características bioquímicas de β -glicosidase(s) e produzida(s) por *D. bruxellensis*, linhagem GDB 248 e relacionar esses parâmetros com o perfil fermentativo da mesma frente à conversão da celobiose, proveniente de meios sintéticos e de hidrolisados de bagaços de cana-de-açúcar e sorgo sacarino, em bioetanol, incluindo a ultra análise morfológica dessas biomassas lignocelulósicas, avaliando a eficiência do pré-tratamento utilizando peróxido de hidrogênio em meio alcalino e seus respectivos rendimentos em produtividade volumétrica e eficiência de fermentação da glicose e xilose em etanol. Para o primeiro trabalho “Fermentação da celobiose em condições de aerobiose restrita e a caracterização de uma celobiase a partir de uma linhagem industrial de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*” foi confirmada a atividade celobiásica (β -glicosidase) em extratos semi-purificados caracterizando-a como uma enzima candidato. Foi demonstrado que a linhagem GDB 248 apresentou capacidade de produzir uma concentração de ácido acético maior que o etanol e glicerol, o que confirma a ausência de efeito Custer com esta estirpe em condições de aerobiose restrita. E no segundo trabalho “Produção de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino por uma linhagem industrial de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*” foi possível obter altas eficiências de hidrólise enzimática utilizando apenas preparações comerciais de celulases, sem complementação com β -glicosidades, o que pode diminuir os custos de processo de hidrólise.

Palavras-chave: Lignocelulose, Bagaço hidrolisado, Fermentação da celobiose, β -glicosidase e Bioetanol.

ABSTRACT

The major ethanol producer in the world is the United States, from corn starch, and Brazil, from sucrose of sugarcane. In recent years, Brazil has not appreciably increased its production, while, on the other hand, the ethanol industry in the United States is undergoing a bigger expansion, around one million m³ per year, with planning to produce 40 million m³ of ethanol in 2025. Responding to a growing demand significantly due to the global recognition of the benefits of ethanol as fuel, the United States and Brazil, as well as many other countries, entered a race that tends to agitate for the development of production technologies of ethanol from lignocellulosic materials. *Dekkera bruxellensis* is a yeast which is usually recognized as a contaminant organism. The species, like all considered non-*Saccharomyces* yeasts, has varying degrees of their catalytic mechanisms and glycosidases and few studies have investigated the performance of the enzymes produced by these microorganisms. This Thesis aimed to observe and interpret the kinetic parameters and biochemical characteristics of β - glucosidase and their yield by *D. bruxellensis* GDB 248 strain and correlate these parameters with the same fermentation profile of the front of the conversion of cellobiose from synthetic media and hydrolyzed sugarcane bagasse and sweet sorghum for bioethanol, including a ultra-morphological analysis of these lignocellulosic biomass, evaluating the efficiency of pretreatment using hydrogen peroxide in alkaline medium and their yields in volumetric productivity and efficiency of fermentation of glucose and xylose to ethanol. For the first work "Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain" was confirmed cellobiase activity (β - glucosidase) in semipurified extracts characterizing it as an enzyme candidate. It has been shown that the GDB 248 strain was able to produce a higher concentration of the ethanol and glycerol, which confirms the lack of effect Custer with this strain in aerobic conditions restricted acetic acid. And the second work "Production of second generation ethanol from sugarcane bagasse, sugar cane and sweet sorghum by an industrial strain of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* " was possible to obtain high efficiencies of enzymatic hydrolysis using only commercial cellulases preparations without supplementation with β - glycosidases, which can reduce the cost of the hydrolysis process.

Key-words: Lignocellulose, Hydrolyzed bagasse, Cellobiose fermentation, β -glucosidase and Bioethanol.

Lista de abreviaturas

GDB: Genetech *Dekkera bruxellensis*;

YPD: Extrato de Levedura-Batata-Dextrose-Ágar (em inglês: Yeast Potato Dextrose Agar);

YNB: Meio Básico de Suplementação em Nitrogênio para Leveduras (em inglês: Yeast Nitrogen Base);

D.O.: Densidade Óptica;

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance (em inglês: High-performance liquid chromatography as vezes: high-pressure liquid chromatography);

CM-Celulose ou CMC: Carboximetilcelulose;

SDS-PAGE: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida que utiliza Dodecil-Sulfato de Sódio (em inglês: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis);

EB2: Extrato Bruto 2, recromatografado;

pNP: 4-Nitrofenil (em inglês: 4-Nitrophenyl);

DTT: Ditioneitol;

IAA: Iodoacetamida;

DNSA: 3,5-ácido dinitrossalicílico;

GLC: Glicose;

BGL: β -Glicosidase;

EBT: Extrato Bruto Total;

K_m : Constante Michaeliana;

$V_{m\acute{a}x}$: Velocidade Máxima;

K_{cat} : Constante catalítica;

CBH I e II: Cellobiohidrolases;

EGL ou EG: Endoglucanases;

NR: Extremidade não redutora;

R: Extremidade redutora;

ADN: Ácido Desoxirribonucléico;

TIR: Taxa Interna de Retorno;

AFEX: Expansão da Fibra com Amônia (Ammonia Fiber Explosion);

FTIR: Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy);

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (forma reduzida);

FPU: Unidade em Papel de Filtro (Filter Paper Unit);

pNPG: 4-Nitrofenil β -D-Glicopiranosídeo (4-Nitrophenyl β -D-Glycopyranoside);

pNPGal: 4-Nitrofenil β -D-Galactopiranosídeo (4-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside);

ORF: Fase de Leitura Aberta (Open Reading Frame);

NCBI: Centro Nacional de informações em Biotecnologia dos EUA (em inglês: National Center for Biotechnology Information).

Lista de figuras

Fundamentação Teórica

Pág.

- Figura 1.** Estimativa dos custos de produção de etanol em dólares americanos/litro a partir de diferentes matérias-primas e países comparando com a produção de etanol celulósico 17
- Figura 2.** Mecanismo putativo da rota de formação de furfural a partir de desidratação catalisada por ácidos de açúcares, como hexoses e pentoses em que o deslocamento do grupo hidroxila C-2 protonada, conduz a um intermediário de anidrido 2,5 furfural 23
- Figura 3.** Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose. As duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II) atacam as regiões cristalinas nas extremidades opostas das cadeias e as endoglucanases no meio das regiões mais desordenadas da celulose. As extremidades das fibras com círculos preenchidos representam glicoses terminais redutoras e as não preenchidas, não redutoras. “C” representa região da celulose que apresenta um alto grau de cristalização 29
- Figura 4.** Modelo de indução de celulases em *H. jecorina*. 1) contato dos esporos com a celulose, os celooligossacarídeos são hidrolisados a glicose e transglicosilados a sofrose por uma β -glicosilase constitutiva; 2) germinação dos esporos. Glicose como fonte de carbono e sofrose como indutor (interior da célula), BGL ligada à membrana converte oligossacarídeos a sofrose e glicose; 3) sofrose induz a síntese de celulases que é secretada pela célula; 4) as celulases secretadas degradam a celulose causando acúmulo de oligossacarídeos e glicose; 5) a glicose é assimilada. Celooligossacarídeos são hidrolisados a glicose e transglicosilados a sofrose por uma β -glicosilase constitutiva. O ciclo continua até a exaustão da celulose disponível. Abreviações: BGL, β -glicosilase; CBH, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolase; EGL, endo-1,4- β -D-glucanase. 31
- Figura 5.** Mecanismo proposto por Wang e Withers (1995) para a hidrólise das ligações β -glicosídicas pelo estado transitório de “retenção” pelas glicosidases. 1 = Glicosilação; 2 = Deglicosilação. 33
- Figura 6.** Ascos de *Dekkera bruxellensis*, meio YM com vitaminas, 37
- Figura 7.** Células de *Brettanomyces bruxellensis*, Meio de extrato de malte. 37
- Figura 8.** Mecanismos fisiológicos de *Brettanomyces*: F+, fermentação positiva; F-, fermentação negativa; A+, assimilação positiva; A-, assimilação negativa. 38
- Figura 9.** Características culturais de *Dekkera* segundo Van der WALT (1964). C+, crescimento; C-, não-Crescimento 38
- Figura 10.** Identificação de espécies do gênero *Dekkera*. F+, fermentação positiva; F-, fermentação negativa; C+, crescimento; C-, não crescimento 39
- Figura 11.** A expressão dos genes envolvidos no metabolismo do carbono central. RPKM é uma medida do nível da expressão de genes expressos como um número de leituras por 1-K pares de bases. 40

Capítulo 1

Pág.

- Figura 1.** Determinação da atividade da β -glicosidase parcialmente purificada de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em função do pH ótimo (A) e temperatura ótima (B) usando pNPG a 100mM como substrato a 37°C 51
- Figura 2.** Parâmetros cinéticos da fermentação em frascos de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meios sintéticos contendo sacarose (A) ou celobiose (B) por 24 horas a 32°C em condições de aerobiose restrita 54
- Figura 3.** Parâmetros cinéticos da fermentação em frascos de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meios sintéticos contendo celobiose/glicose (A) ou bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (B) por 24 horas a 32°C em condições de aerobiose restrita 55

Capítulo 2

Pág.

- Figura 1.** Espectros de FTIR para amostras de bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino pré-tratadas com H₂O₂ 7,5% m/v, pH 11,5, 10% sólido-líquido, 25 °C, 1h, 150 rpm 70
- Figura 2.** Imagens de MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar in natura (a) e após pré-tratamento (b) e sorgo sacarino in natura (c) e após pré-tratamento (d). Pré-tratamento com H₂O₂ 7,5% v/v, pH 11,5, 10% sólido-líquido, 25 °C, 1h, 150 rpm 71
- Figura 3.** Aspecto fermentativo de *D. bruxellensis* GDB 248 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sem suplementação com nitrogênio. CO₂ (●), Xilose (○), Celobiose (◇), Glicose (■) e Etanol (□). Os valores representam a média de duplicatas 72
- Figura 4.** Aspecto fermentativo de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino, sem suplementação com nitrogênio. CO₂ (●), Xilose (○), Celobiose (◇), Glicose (■) e Etanol (□). Os valores representam a média de duplicatas 73
- Figura 5.** Cinética de fermentação de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* GDB 248 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de bancada. Os valores representam a média de duplicatas 74

Lista de tabelas

Fundamentação Teórica

	Pág.
Tabela 1: Conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina comumente reportados para as principais biomassas lignocelulósicas.	21
Tabela 2: Eficiências de hidrólise enzimática reportados para diferentes tipos de biomassas pré-tratadas com H ₂ O ₂ alcalino.	23
Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.	27
Tabela 4. Assimilação de açúcares pelas espécies <i>Dekkera</i> (Van Der Walt, 1964) e <i>Brettanomyces</i> (Van Der Walt, 1964).	36

Capítulo 1

	Pág.
Tabela 1. Efeito de diferentes fontes de carbono em meios sobre a atividade enzimática dos extratos celulares de <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248. O extrato bruto (mg de proteína) foi testado a partir de culturas em frascos de 250mL. Uma unidade de atividade enzimática (U) é o equivalente à quantidade de glucose (μmol) liberada por minuto a partir de 1mg de proteína para um grama de massa úmida de levedura, a 37°C.	50
Tabela 2. Resumo de purificação parcial de celobiase de <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248 cultivado em meio contendo celobiose.	50
Tabela 3. Efeito de dissacarídeos sobre a atividade da celobiase parcialmente purificada de <i>Dekkera bruxellensis</i> GDB 248.	52
Tabela 4. Concentrações finais dos principais compostos de fermentação, produtividade máxima (P_{máx}) e eficiência de fermentação por <i>D. bruxellensis</i> GDB 248 Um inóculo de 10% m/v (A _{600nm}) foi cultivado durante 24 h a 30°C em condições semelhantes às industriais com meio mineral YNB contendo sacarose (SMSsuc), celobiose (SMScello), uma mistura de celobiose e glicose (SMScello/glu) e hidrolisados pré-tratados de bagaço de cana-de-açúcar (SMSbag). O açúcar consumido foi calculado através da conversão de quantidades de dissacarídeos ao equivalente em gramas de glicose e em seguida subtraindo o valor inicial da concentração de açúcar total final. A produtividade de etanol (P _{máx}) foi medida dividindo a concentração final de etanol por 24 h ou 48 h. O rendimento da fermentação foi expresso como uma percentagem do rendimento máximo teórico em 100 g de glicose produz 51,1 g de etanol. Todas as condições de fermentação foram realizados a partir de duas réplicas biológicas. A mesma letra indica que não há nenhuma diferença estatística	56

Capítulo 2

	Pág.
Tabela 1. Teores de celulose, hemicelulose e lignina em detergente ácido no bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sorgo sacarino in natura e após o pré-tratamento (base seca)	67
Tabela 2. Perda de massa durante o pré-tratamento com H ₂ O ₂ e teores de açúcares e perda de massa após a hidrólise enzimática (48h) da biomassa de BC e BS	68
Tabela 3. Parâmetros cinéticos para a fermentação dos hidrolisados da biomassa de BC e BS por <i>D. bruxellensis</i> com tempo de 7h	72

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. Visão geral da tecnologia de produção de etanol celulósico.	16
2.2. Processos hidrolíticos da biomassa lignocelulósica e seus produtos de hidrólise.....	20
2.2.1. Pré-tratamentos Químicos.....	21
2.2.2. Pré-tratamentos Físico-químicos.....	24
2.2.3. Pré-tratamento enzimático	27
2.3. β -glicosidases de <i>Dekkera bruxellensis</i>	28
2.3.1. Indução e Mecanismos de Síntese de Celobiasas	29
2.3.2. Mecanismo de catálise das β -glicosidases.	31
2.4. <i>Dekkera bruxellensis</i>	33
4. CAPÍTULO 1: Fermentação da celobiose em condições de aerobiose restrita e a caracterização de uma celobiase a partir de uma linhagem industrial de <i>Dekkera/Brettanomyces bruxellensis</i>	41
RESUMO.....	42
INTRODUÇÃO	43
MÉTODOS	44
Levedura.....	44
Hidrólise do bagaço	44
Ensaio de cultivo	44
Extrato protéico e atividade celobiásica (β -glucosidase).....	45
Purificação da Celobiase (β -glicosidase)	45
Ensaio de cinética enzimática.....	46
Análises de açúcares e principais produtos metabólicos	47
Identificação genética e análise <i>in silico</i>	47

Análise estatística	48
RESULTADOS	49
Produção e purificação de uma celobiase (β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21) de <i>D. bruxellensis</i>	49
Parâmetros cinéticos da celobiase de <i>D. bruxellensis</i>	50
Análise <i>in silico</i> do gene <i>BGL</i>	52
Fermentação em condições industriais.....	53
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	59
AGRADECIMENTOS.....	59
5. CAPÍTULO 2: Produção de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino por uma linhagem industrial de <i>Dekkera/Brettanomyces bruxellensis</i> . .	60
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
2.1. Biomassa.....	63
2.2. Pré-tratamento.....	63
2.3. Hidrólise enzimática	64
Ensaio de Fermentação em Bancada	65
2.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	65
2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67
2.6 Análises estatísticas	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4. Conclusões.....	78
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

Os maiores produtores de etanol no mundo são os Estados Unidos, a partir do amido de milho, e o Brasil, a partir da sacarose da cana-de-açúcar. Nos últimos anos, o Brasil tem apresentado um baixo incremento na produção anual de bioetanol, enquanto que, por outro lado, a indústria de etanol nos Estados Unidos vem sofrendo uma grande expansão, em torno de 1 milhão m³/ano, com planejamento para produção de 40 milhões de m³ de etanol em 2025 (Gray et al., 2006). Em atendimento a uma crescente demanda mundial desse combustível, em função do reconhecimento acerca dos benefícios ecológicos, existe uma corrida em diversos países para o desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (Lin e Tanaka, 2006). Para combustível de transporte, o etanol de biomassa lignocelulósica, também chamado de etanol de segunda geração (provindo de resíduos agroindustriais), se apresenta como a opção mais sustentável, pelas suas vantagens ambientais, econômica, estratégica e de infraestrutura (Wyman, 1999).

No Brasil, existe a perspectiva de aumento significativo do consumo do etanol indicada pelo aumento de consumo interno devido aos veículos “bicombustíveis”, pela expansão das exportações originadas do interesse mundial pela mistura do álcool à gasolina e pelos altos preços do petróleo; e pela opção brasileira de utilização de etanol na produção de biodiesel. Embora o país disponha de condições edafoclimáticas favoráveis para grandes expansões da cultura de cana-de-açúcar e recentemente para o cultivo de sorgo sacarino, a intensificação da produção de álcool com o uso da biomassa integral dessas culturas, em contraste com a simples expansão da lavoura, tem como vantagem o aumento de produção, reduzindo riscos econômicos e ambientais, além de minimizar a necessidade de enormes investimentos em infraestrutura e em logística.

O desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol a partir da biomassa, bagaço e palha da cana-de-açúcar e sorgo sacarino, representa um grande desafio tecnológico. Essa biomassa é, em geral, resistente à ação de enzimas celulolíticas, devido à sua cristalinidade e à presença de lignina e de hemicelulose. Para converter carboidratos

do material lignocelulósico em etanol por via enzimática, uma etapa de pré-tratamento é necessária para tornar a fração de celulose acessível às celulasas. Muitas técnicas vêm sendo estudadas há muitos anos e são agrupadas geralmente em quatro categorias: física, química, biológica e as combinações destas (Lin e Tanaka, 2006). Os diversos métodos solubilizam diferentes componentes da biomassa, gerando diferentes correntes de produtos, o que requer diferentes estratégias para a fermentação subsequente.

A produção de celulasas é uma etapa essencial no processo de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Essa etapa se apresenta como um gargalo para o desenvolvimento de tecnologias locais, tendo em vista que pouco se pesquisou no Brasil a respeito desses catalisadores. A utilização da biomassa da cana e sorgo como substrato e a produção “in plant” são alternativas para viabilizar economicamente a via enzimática de hidrólise, reduzindo a vulnerabilidade da dependência do insumo. A presença de inibidores do crescimento microbiano e consequentemente da atividade fermentativa das leveduras, formados durante a etapa de pré- tratamento químico e físico-químico, como o furfural e hidroximetilfurfural, é um dos problemas a ser enfrentado e pode ser bastante minimizado com o tratamento enzimático da biomassa. Como para a maioria das enzimas extracelulares, a utilização de operação descontínua alimentada será potencialmente a mais adequada para se obter altos rendimentos de produção proteica.

Dekkera bruxellensis van der Walt, 1964 (anamorfo *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath e van Laer, 1921) é uma levedura que é usualmente reconhecida como um organismo contaminante da produção de vinhos durante o armazenamento pela produção de substâncias que alteram o sabor da bebida, tais como 4-etil-fenol (De Souza Liberal et al, 2007). Os isolados desta espécie apresentam graus variados de mecanismos catalíticos de suas glicosidades e poucos estudos têm investigado o desempenho das enzimas produzidas por essas leveduras (Charoenchai et al., 1997). Segundo South (2010), além da *D. bruxellensis* fermentar glucan 1,4- β -glicosídeos a etanol, também estabelece uma relação ecológica com *Saccharomyces cerevisiae* ora competitiva, por resíduos glicídicos durante o processo fermentativo, ora harmônico não competitivo, partindo do pressuposto de que *D. bruxellensis* consome compostos inibidores de crescimento e da atividade fermentativa de *S. cerevisiae*. A viabilidade da utilização desta levedura para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica concomitante à

fermentação de seus oligômeros é reforçada pelo aproveitamento da fração do bagaço não utilizada na produção de etanol. O presente estudo, portanto, pretende elucidar e interpretar os parâmetros cinéticos e as características bioquímicas de β -glicosidase(s) e produzida(s) por *D. bruxellensis* van der Walt (1964) linhagem GDB 248 com finalidade de aplicações tecnológicas, por exemplo, na imobilização dessas enzimas em suportes inorgânicos para o desenvolvimento de biorreatores de fluxo contínuo e consequentes estudos fermentativos da celobiose e outros oligossacarídeos no que diz respeito à produção de etanol combustível.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Visão geral da tecnologia de produção de etanol celulósico.

Apesar de o Brasil deter a melhor tecnologia de produção de etanol combustível, levando-se em consideração o balanço energético altamente positivo do processo desde o cultivo da cana-de-açúcar à fermentação da sacarose, é imperativa a necessidade de investimentos na área tecnológica no que diz respeito aos procedimentos industriais para a fermentação de fontes alternativas de açúcares fermentescíveis. O país ainda não apresenta autossuficiência devido a uma inapetência acentuada pela demanda de exportação de bioetanol. A solução para suprir as demandas internas está no reforço do conceito de biorrefinaria, de onde podem ser aproveitados vários tipos de açúcares com aplicações tecnológicas e consumos diferentes, associadas à indústria sucroalcooleira, gerando novos produtos e aumentando a produção de etanol.

A utilização de fontes renováveis provenientes do próprio processo industrial, como o bagaço de cana-de-açúcar, está em expansão e sinaliza tanto para a utilização de leveduras com capacidade de fermentar oligômeros da celulose, tais como a celobiose, quanto para a modificação e clonagem de genes codificadores de proteínas celulolíticas, e que essa tecnologia seja posteriormente transferida para o setor industrial com vistas ao incremento de produção de etanol combustível em plantas industriais.

Burnquist em 2007 destaca a importância das vantagens dos custos de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil (Figura 1) diante das características edafoclimáticas somadas ao domínio da tecnologia de produção, disponibilidade de matéria-prima, baixo custo de obtenção, sustentável e com agressividade ambiental praticamente nula. Mesmo se apresentando vantajoso nos custos de produção, o etanol de cana-de-açúcar vive uma crise devido, principalmente, a não expansão dos processos fermentativos que terminam por depender de apenas uma fonte e que ainda apresenta o agravante de ter que ser segregado à produção de açúcar.

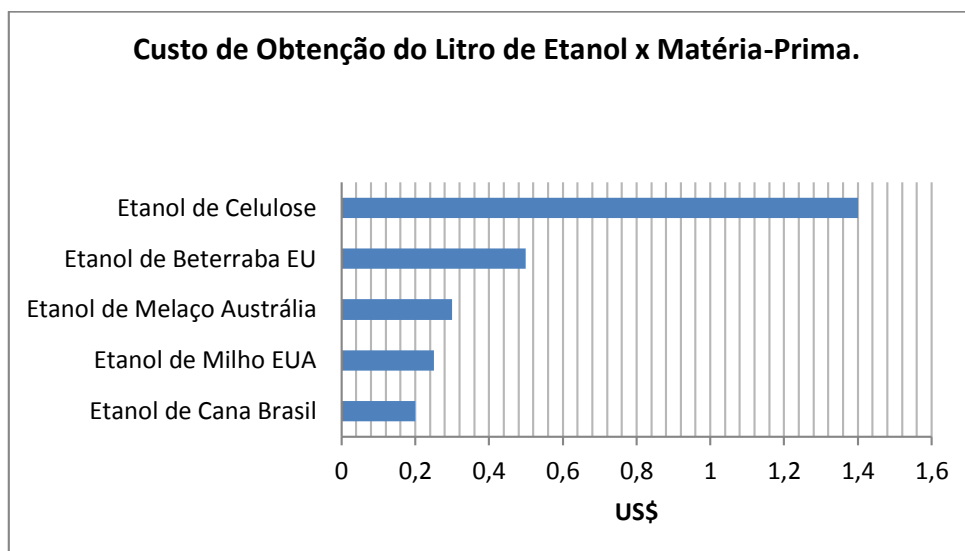


Figura 1. Estimativa dos custos de produção de etanol em dólares americanos/litro a partir de diferentes matérias-primas e países comparando com a produção de etanol celulósico (Burnquist, 2007).

Em expansão, o sorgo sacarino é uma cultura amplamente divulgada quanto ao seu potencial para produção de etanol e vários trabalhos evidenciam, também, o seu potencial como fonte de biomassa com menor exigência de água que a cana (Almodares e Hadi, 2009; Vasilekoglou et al., 2011). Trata-se de uma gramínea com ciclo fotossintético C4, cultivada em vários países (Zegada-Lizarazu e Monti, 2012) é nativa da África, sendo domesticada na Etiópia a cerca de 5.000 anos atrás. É o quinto cereal mais cultivado no mundo (40 milhões de hectares em 2009, Kumar et al., 2011). Seu principal uso é como forragem, mas também vem apresentando utilizações como grande fonte de carbono para produção de energia (Reddy et al., 2005) ração e fibras (Murray et al., 2008). Como principais características para aplicação industrial e produção de bioenergia destacam-se a eficiência no uso da água (1/3 da cana-de-açúcar e 1/2 do milho) e bom desenvolvimento em diferentes condições edafoclimáticas. Em geral o sorgo sacarino produz 2 t.ha⁻¹ de grãos ricos em amido e 50 t.ha⁻¹ de colmos ricos em açúcares solúveis como sacarose, glicose e frutose (Wu et al., 2010) no caldo e carboidratos insolúveis (celulose e hemicelulose) no bagaço gerado após a extração do caldo. Portanto, a produção de etanol a partir das diferentes frações da planta de sorgo sacarino varia em função das cultivares, das condições edafoclimáticas e dos tipos de tecnologias utilizadas nos processos de conversão. De forma geral, a produção de etanol a partir do caldo situa-se em aproximadamente 3.450 L.ha⁻¹ (Prasad et al., 2007) do amido em 800 L.ha⁻¹ e da fração celulósica e hemicelulósica do bagaço em 5.400 L.ha⁻¹ (Zhao et al., 2009).

Gnansounou e Dauriat (2010) fizeram uma análise técnico-econômica sobre a produção de bioetanol celulósico tomando como base, casos de plantas piloto para produção de etanol nos Estados Unidos desde os anos 80, precisamente em 1987, em função das demandas de estudos sobre a hidrólise da biomassa lignocelulósica utilizando ácidos diluídos para produção de hexoses e consequente produção de etanol, visando a uma possível substituição da gasolina, causada pela crise do petróleo que abalou a economia internacional entre os anos 1970 e 1980. Nessa avaliação os autores levaram em consideração, principalmente, as variantes biotecnológicas que vão desde a manipulação da matéria-prima, incluindo o melhoramento genético vegetal no que concerne à diminuição nos custos de produção, o que implica numa maior resistência às pragas, até os tratamentos dos resíduos (sua utilização como coproduto), passando pelos processos de fermentação, recuperação de furfurais e purificação do etanol e a partir de uma estimativa de taxa, denominada de Taxa Interna de Retorno (TIR), na qual o preço do bioetanol celulósico poderia chegar aos US\$ 0,32/L para TIR de 15% a ser alcançada dentro dos ajustes técnicos industriais.

A capacidade produtiva de uma planta industrial de produção de etanol de segunda geração que utiliza ácido sulfúrico diluído é alta, entretanto a sua produtividade é reduzida, devido à alta presença de furfural (forte inibidor fermentativo) e a não utilização por parte da levedura do processo de outras fontes fermentescíveis como as pentoses. Em comparação, as plantas industriais que utilizam processos enzimáticos permitem um incremento de 50% na produção de etanol reduzindo a TIR para 10% (ajustes técnicos, incluindo utilização de linhagens de microrganismos em bioprocessos de sacarificação e co-fermentação), chegando a uma viabilidade econômica de US\$ 0,54/L (Gnansounou e Dauriat, 2010; NREL, 2011). Acredita-se, portanto, que o impulso que deve ser dado para a consolidação e enraizamento da produção de etanol celulósico em escala industrial estaria a cargo da estabilização do conceito e concepção de biorrefinarias à indústria sucroalcooleira, onde, além do interesse de conversão da biomassa celulósica em biocombustível líquido, também a conversão em outros tipos de álcoois, ácidos orgânicos (produção de biopolímeros), vitaminas, tetra-hidro-furano (para síntese de nylon) e outros produtos químicos viriam a agregar valor a esse conceito, fomentando os projetos de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (Pereira Jr et al, 2008).

Enfim, além da tarefa comunal de se produzir um biocombustível que apresente vantagens econômicas e ambientais, isto pode ser valorado pela produção de novos compostos que possam também reduzir o uso do petróleo, como é o caso dos polímeros. Os desafios para essa possível produção de etanol celulósico estão diante das seguintes premissas, segundo Pereira Jr et al. (2008):

1. Desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica que além de eficiente, não deve gerar substâncias tóxicas que prejudiquem a fermentação e nem exijam onerosos equipamentos de alta pressão;
2. Combinação da conversão enzimática da celulose com a fermentação alcoólica, a fim de manter os níveis de açúcares fermentescíveis baixos, melhorando o rendimento enzimático por conter uma menor concentração de inibidores (produtos) como a celobiose e glicose;
3. Construção de microrganismos adequados aos processos fermentativos de hexoses e pentoses através da biologia molecular;
4. Desenvolvimento de processos de produção de celulasas por fermentações submersas e em estado sólido (utilizando linhagens recombinantes e não recombinantes), bem como adquirir um conhecimento profundo sobre suas estruturas, a fim de formular uma preparação enzimática (engenharia de produto) para uma eficiente hidrólise da celulose e consequente material lignocelulósico;
5. A produção industrial de celulasas deve ser “in plant”, com o objetivo de reduzir os custos inerentes com essas enzimas no processo;
6. Incorporação de temperaturas reduzidas para a purificação do etanol, a fim de permitir a reutilização da enzima evitando sua desnaturação;
7. Realização de um estudo detalhado do processo de integração (massa e energia), incluindo todos os fluxos, sejam eles de processos ou serviços públicos no sentido de favorecer ao melhor balanço energético;
8. Realização de uma avaliação técnica-econômica detalhada da viabilidade do processo para a utilização da agricultura e resíduos agroindustriais incluindo os parâmetros logísticos.

2.2.Processos hidrolíticos da biomassa lignocelulósica e seus produtos de hidrólise

O uso de materiais lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração e também outros compostos de alto valor agregado via fermentativa como o xilitol, álcoois superiores e blocos de construção de polímeros, solventes, dentre outras aplicações para a química fina como o but-1,3-dieno (principal componente da borracha sintética) e o metil-etil-cetona (solvente) e o butan-2,3-diol (anticongelantes), vem despertando um grande interesse para a indústria de bioconversão e possibilita o fomento de conhecimento para o desenvolvimento tecnológico, gerando produtos e processos com alto potencial de inovação.

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 1) e pequenas frações de extrativos e cinzas. A celulose é um polissacarídeo homogêneo de cadeia longa mais abundante na natureza e representa aproximadamente 40% do peso seco da biomassa, formada por unidades de D-glicose unidas com ligações glicosídicas do tipo β -1-4. Apresenta-se na forma cristalina com regiões amorfa, sendo a forma amorfa mais susceptível a hidrólise enzimática. A hidrólise da celulose acarreta a produção de glicose que é facilmente convertida pela maioria dos micro-organismos. A hemicelulose é um polímero heterogêneo complexo formado por unidades de açúcares de 5 e 6 carbonos. Em sua cadeia principal é formada por xilose e suas ramificações podem conter L-arabinose, galactose, manose além de ácidos urônicos e grupos acetilas. A hidrólise da hemicelulose produz principalmente xilose, um carboidrato de 5 carbonos que é eficientemente metabolizado por um grupo restrito de micro-organismos. A lignina é uma estrutura complexa e heterogênea formada principalmente por compostos fenólicos e seus derivados. Depois da celulose, é o principal componente da parede celular de plantas e atua na estruturação da celulose e da hemicelulose. Apresenta baixa biodegradabilidade e apenas alguns micro-organismos especializados são capazes de degradá-la (Rezende, De Lima et al., 2011). Existem vários processos de pré-tratamento dos diversos tipos de biomassa disponíveis no Brasil que, conseqüentemente, gerariam produtos de hidrólises em teores e rendimentos distintos para cada aplicação biotecnológica. Para produção de bioetanol de segunda geração deve-se, portanto, levar em consideração que o pré-tratamento produza um hidrolisado solúvel, que evite a formação de inibidores fermentativos e também da degradação de açúcares fermentescíveis.

Tabela 1: Conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina comumente reportados para as principais biomassas lignocelulósicas.

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
<i>Miscanthus</i>	46	27,8	10,7
Palha de milho	35-40	17-35	7-18
Palha de trigo	30	50	15
Palha de arroz	36-47	19-25	10-24
Casca de arroz	35,6	12	15,4
Bagaço de cana-de-açúcar	39,6	19,7	25,8
Bagaço de sorgo-sacarino	34	25	18
Palha de centeio	37,9	36,9	17,6
Palha de colza	44,6	20	20
Palha de cevada	34,4	23	13,3

Fonte: Sun et al. (2000); Sun e Cheng, 2002; Saha e Cotta, 2007; Rabelo et al. (2008); Sipos et al (2009); Saha e Cotta, 2010; Wang et al. (2012).

2.2.1. Pré-tratamentos Químicos

Algumas substâncias químicas como ácidos, bases, solventes orgânicos e líquidos iônicos são bastante eficientes para a desestruturação da matriz lignocelulósica, apresentando reações rápidas e economicamente mais módicas que as demais (Chandra et al, 2007). Um pré-tratamento com um composto alcalino, como por exemplo, o NaOH, KOH, Ca(OH)₂, provoca um aumento volumétrico da biomassa, o que aumenta a área de superfície interna da mesma e diminui o grau de polimerização e cristalinidade da celulose. Os pré-tratamentos alcalinos rompem a estrutura da lignina e desestrutura a ligação entre a lignina e as outras frações de carboidratos em biomassa celulósica, tornando assim os carboidratos da matriz heterogênea (celulose, hemicelulose e lignina) mais acessíveis às enzimas. Também são removidos pelos tratamentos alcalinos grupos químicos de acetil e ácido urônico, substituintes em frações hemicelulósicas que provocam a diminuição da acessibilidade das enzimas celulolíticas à superfície de celulose (Chang et al, 1997; Chandra et al, 2007). A grande desvantagem para esses tipos de tratamento é que praticamente todo o álcali é consumido durante o processo e se mostram eficazes apenas com biomassas que apresentam baixo teor de lignina como os resíduos agrícolas. Tratamentos ácidos utilizando soluções diluídas de ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico a <4%(m/v) também têm sido usados para o tratamento

da biomassa (Mosier et al, 2005; NREL, 2011). Ácidos concentrados são recuperáveis e reutilizados ao final do processo, entretanto apresentam a grande desvantagem de serem altamente corrosivos, aumentando os custos de recuperação e manutenção dos equipamentos envolvidos nas plantas de conversão de biomassa (NREL, 2011). Definitivamente, os tratamentos químicos utilizando ácidos diluídos são mais viáveis economicamente tanto para a possibilidade da sua aplicação como um substituto para a hidrólise enzimática de celulose e como uma etapa de pré-tratamento para melhorar a digestibilidade da biomassa (Lee et al, 1999).

Nos processos industriais uma solução aquosa do substrato é aquecida até à temperatura desejada, usando o ácido sulfúrico também pré-aquecido (concentrações de <4 m/v %) em um reator de aço inoxidável (NREL, 2011). Essas temperaturas variam entre 140 e 215 °C e o tempo de residência em intervalos que varia de alguns segundos a minutos, dependendo da temperatura do pré-tratamento.

A grande desvantagem dos tratamentos químicos utilizando ácidos diluídos está pautada na necessidade do aquecimento da biomassa e isso leva a formação de compostos inibitórios dos processos fermentativos em leveduras, principalmente o furfural e o hidroxi metilfurfural (HMF) (Figura 2).

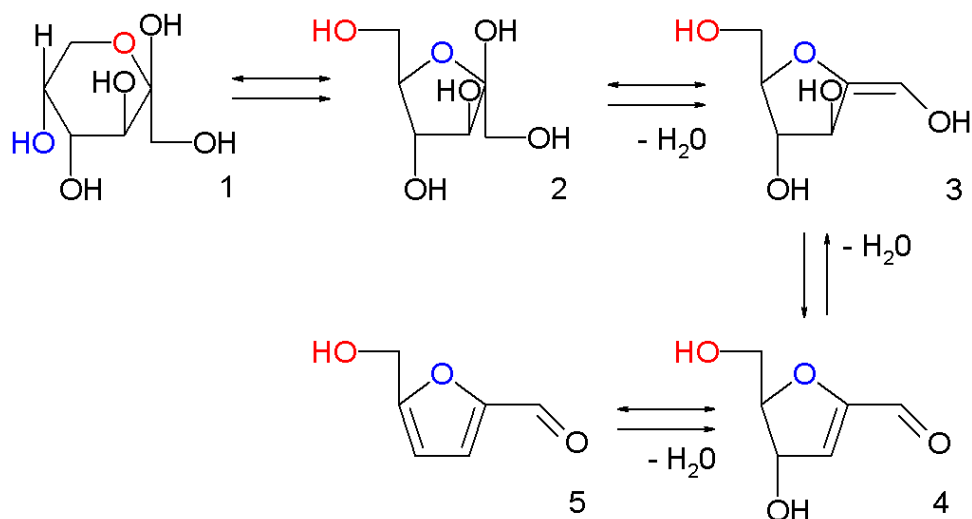


Figura 2. Mecanismo putativo da rota de formação de furfural a partir de desidratação catalisada por ácidos de açúcares, como hexoses e pentoses em que o deslocamento do grupo hidroxila C-2 protonada, conduz a um intermediário de anidrido 2,5 furfural (Binder, Blank et al., 2010).

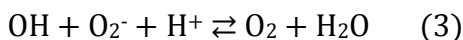
Contudo, o pré-tratamento do bagaço com peróxido de hidrogênio em meio alcalino químico vem chamando a atenção pela sua eficácia em deslignificação para uma posterior hidrólise enzimática (tabela 2) e pela baixa formação de inibidores fermentativos ao final do processo é, que consiste nas reações químicas que este agente oxidante sofre em meio líquido alcalino. A sua dissociação gera o ânion hidroperóxido (HOO^-), através da equação (1).



Em meio alcalino, o ânion hidroperóxido pode reagir com H_2O_2 que acarreta a formação do radical hidroxila e superóxido, conforme a equação (2).



Na ausência de outros reagentes os radicais hidroxila e superóxido podem combinar-se gerando oxigênio e água, equação 3.



Logo, a equação geral de decomposição de H_2O_2 em meio alcalino pode ser resumida na equação 4 (Sun e Cheng, 2002).

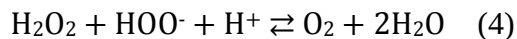


Tabela 2: Eficiências de hidrólise enzimática reportados para diferentes tipos de biomassas pré-tratadas com H₂O₂ alcalino

Referência	Biomassa lignocelulósica	Composição química (%)	Enzimas utilizadas	Conversão de celulose (%)	Conversão da hemicelulose (%)
Gould (1985)	Palha de trigo	35,9 celulose 44,8 hemicelulose	Celulase <i>T. ressei</i>	95	NR
Saha e Cotta (2010)	Palha de trigo	44,24 celulose 25,23 hemicelulose	Celluclast Novozyme 188 Viscostar 150L	NR	NR
Saha e Cotta (2010)	Casca de arroz	35,62 celulose 11,96 hemicelulose	Celluclast Novozyme 188 Viscostar 150L	67,38	81,10
Rabelo et al. (2011)	Bagaço de cana-de-açúcar	39,6 celulose 21,4 hemicelulose	Celulase <i>T. ressei</i> e β-glicosidase de <i>A. niger</i>	69,4	NR
Qi et al. (2009)	Palha de trigo	40,98 celulose 36,96 hemicelulose	Celulases não especificadas.	NR	NR
Yamashita et al. (2010)	Bambu	45,5 celulose 22,8 hemicelulose	Celulases Micelase	78,92	NR
Banerjee et al. (2011)	Palha de milho	34,4 celulose 22,4 hemicelulose	Accellerase 1000 Multifect xylanase Multifect pectinase	95	75,1
Karagös et al. (2012)	Palha de colza	44,6 celulose 20 hemicelulose	Novozyme 188 Hemicelulase (NS 22002) β-glicosidase (NS 50013)	94	83

2.2.2. Pré-tratamentos Físico-químicos

Esta categoria inclui a maioria das tecnologias de tratamento usados até o momento e as principais são as seguintes: vapor (ou explosão a vapor), hidrotermia, oxidação úmida, percolação amoníaca por reciclo ou explosão fibra/congelamento (AFEX) e o uso de Solventes Orgânicos (Organosolv). Recentemente, têm-se pesquisado bastante sobre os tratamentos com líquidos iônicos. Na tabela 3, estão descritas as vantagens e desvantagens dos principais tipos de pré-tratamentos químicos e físico-químicos de biomassa lignocelulósica que são aplicados na indústria, tanto de polpação da celulose quanto na produção de etanol de segunda geração. O tratamento a vapor é o método mais estudado e o mais aplicado método físico-químico de pré-tratamento da biomassa. Inicialmente esse método era chamado de “explosão a vapor”, pois se acreditava que ocorria uma ação “explosiva” nas fibras para se tornarem hidrolisáveis. O termo “autohidrólise” também tem sido utilizado como um sinônimo de tratamento a vapor (Chandra et al, 2007), pois a partir dessa reação ocorre a geração de ácido acético e outros ácidos orgânicos que ajudam na hidrólise da hemicelulose, liberando unidades

de glicose e xilose que acabam sendo desperdiçadas ao final quando ocorre a liberação da fração líquida do reator. Para esse processo se faz necessário o tratamento físico por moagem da matéria-prima lignocelulósica que antecede à submissão dessa biomassa a uma injeção de vapor saturado a alta pressão (0,7 a 4,8Mpa) e altas temperaturas (160 a 240°C), durante alguns minutos. Esse tipo de método promove, principalmente, a remoção e hidrólise da hemicelulose, enquanto que a lignina se mantém quase que inalterada na biomassa. Apesar da presença de lignina, a fração celulósica se torna mais acessível aos tratamentos enzimáticos e tornando o processo economicamente viável (Mcmillan, 1994).

Outro pré-tratamento que utiliza a água como reagente para hidrolisar frações da biomassa é o hidrotérmico (ou solvólise ou aquasolv). Este é semelhante ao tratamento a vapor, mas não utiliza o vapor em altas pressões, resultando na hidrólise de hemicelulose e de remoção da lignina, tornando celulose na biomassa mais acessível e evitando a formação de inibidores de fermentação que ocorrem em maiores temperaturas (Wyman et al, 1999). A principal vantagem do tratamento hidrotérmico é a utilização de baixas temperaturas, minimizando a formação de produtos de degradação e baixando o custo, levando em consideração que a etapa de neutralização dos ácidos no final do processo é eliminada, pois o solvente utilizado a água, que ao mesmo tempo caracteriza-se como a principal desvantagem do processo. Caracterizado pela formação de ácidos, que promove uma autohidrólise da biomassa, principalmente da fração hemicelulósica, embora em menor grau do que o tratamento a vapor. Também se caracteriza como um tratamento que ocorre em temperaturas mais brandas (180 a 190°C para palha de milho) (Mosier et al, 2005; Wyman et al., 2005), este tem como limitação o uso de baixas cargas de sólido (1 a 8% matéria seca). O consumo de água nesse método é muito alto, para uma baixa quantidade de açúcares dissolvidos (Mosier et al 2005, Wyman et al., 2005).

A Percolação Amoníaca por Reciclo e a Explosão Fibra/Congelamento (AFEX) é definida como processo de tratamento da biomassa que usa amônia líquida. Como um processo físico-químico, a AFEX opera a alta pressão, mas é conduzida à temperatura ambiente (<90°C) e a reação é catalisada para ocorrer entre 10 a 60 minutos (Holtzapple, Jun et al., 1991). Isso acontece porque a biomassa quando exposta à amônia (1:1 ou 1:2 na relação amônia/biomassa), a uma dada temperatura e pressão (geralmente 3Mpa) sofre expansão volumétrica e aumento da cristalinidade da celulose devido à remoção da

lignina, aumentando a acessibilidade das enzimas celulolíticas e viabilizando o processo (Holtzaple et al, 1991; Mosier, Wyman et al., 2005).

Por fim, outro método de tratamento de biomassa lignocelulósica bastante empregado na indústria, principalmente na de polpação de fibras celulósicas, é o Organosolv, que se caracteriza por ser um processo aquoso-orgânico que pode utilizar ou não ácidos fracos como ácido oxálico, ácido acetilsalicílico na presença de etanol ou metanol, aos seus pontos de ebulição, para a solubilização de hemicelulose e extração da lignina, via dissociação parcial de íons de hidrogênio no sentido de acelerar a deslignificação/hidrólise da celulose (Sun e Cheng, 2002). Além disso, altas temperaturas não são necessárias, pois se acredita que os próprios ácidos orgânicos presentes na reação catalisam a ruptura do complexo lignina/carboidrato e que os mesmos, assim como os solventes, podem ser recuperados via destilação e reutilizados, promovendo um alto rendimento de separação seletiva das frações: lignina seca, hemicelulose aquosa e uma fração pastosa relativamente pura de celulose (Sun e Cheng, 2002).

Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Alcalino	(i) Eficiente na remoção da lignina (ii) Baixa formação de inibidores	(i) Alto custo do catalisador alcalino (ii) Promove alteração na estrutura da lignina
Ácido	(i) Altos rendimentos em glicose (ii) Solubiliza Hemicelulose	(i) Altos custos com os ácidos e necessidade de recuperação/neutralização (ii) altos custos com manutenção dos equipamentos por conta da corrosão (iii) Formação de inibidores
Organosolv	(i) Maior rendimento na separação das frações (ii) Produz lignina na fração sólida (iii) Condições de processo com baixo custo energético (baixas temperaturas)	(i) Alto custo com os solventes (ii) Necessidade de recuperação/neutralização dos ácidos
Vapor	(i) Viável economicamente (ii) Transformação da lignin e solubilização da hemicelulose (iii) Alto rendimento na produção de glucose e hemicelulose em apenas duas etapas	(i) Degradação parcial da hemicelulose (ii) Catálise ácida necessária para tornar o processo eficiente, mesmo apresentando um alto teor de lignina (iii) Geração de compostos tóxicos
Hidrotérmico	(i) Separação com alto grau de pureza da hemicelulose (ii) Não necessita de catalisador (iii) Autohidrólise da hemicelulose	(i) Consumo alto de energia e água (ii) Produz um composto sólido de celulose/lignina

2.2.3. Pré-tratamento enzimático

Também conhecido como tratamento biológico, essa categoria de hidrólise da biomassa lignocelulósica está fundamentada na utilização de enzimas lignocelulolíticas (ligninases e celulasas) produzidas por fungos filamentosos, como *Sclerotinia sclerotiorum* que causa podridão branca em muitas plantas cultivadas, relatados como os produtores mais eficientes de enzimas capazes de degradar, não somente a celulose e lignina, como também a hemicelulose (Lynd, Weimer et al., 2002; Sun e Cheng, 2002). Enzimas lignocelulolíticas provenientes de fungos da podridão parda degradam

preferencialmente as fibras de celulose, quando estas estão disponíveis e esta hidrólise ocorre no sentido perpendicular à disposição das fibras, enquanto que as enzimas provenientes dos fungos de podridão branca degradam preferencialmente a lignina (produção expressiva de lacases, manganês peroxidases e polifenol oxidases) e hemicelulases (Messner, Kubicek-Pranz et al., 1991; Seiboth, Hakola et al., 1997). Esse processo tem como desvantagem o longo tempo de residência da biomassa durante o pré-tratamento e isto inviabiliza sua aplicação industrial. Além disso, o custo de produção dessas enzimas ainda é bastante alto (Seiboth, Hakola et al., 1997)

2.3.β-glicosidases

As enzimas envolvidas na degradação da celulose são hidrolases e são chamadas de celulasas por clivarem ligações *O*-glicosídicas, sendo classificadas de acordo com o local de atuação no substrato celulósico em três grupos: 1) Endoglucanases, responsáveis pela hidrólise das ligações internas (não redutoras) da estrutura amorfa da fibra celulósica de forma randômica, liberando oligossacarídeos com vários graus de polimerização (GP); 2) Exoglucanases (celobiohidrolases e glucano-hidrolases), que hidrolisam as regiões redutoras da fibra celulósica liberando diretamente glicose diretamente do polímero; e 3) β-glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (Lynd, Weimer *et al.*, 2002). As β-glicosidases, como objeto de estudo desse trabalho, catalisam a quebra das ligações β-1,4 *O*-glicosil de sacarídeos (GP<7), preferencialmente dissacarídeos, envolvendo duas glicoses terminais, como por exemplo, a celobiose, um dissacarídeo D-Glicosil-β-(1→4)-D-glicose, direcionada ao sítio de hidrólise através do seu centro anomérico e sua respectiva liberação para o meio (Henrissat, 1991; Borges De Melo, Da Silveira Gomes et al., 2006). Para os microrganismos essa enzima é imprescindível para a conversão de materiais celulósicos em energia, uma vez que compõem o complexo celulósico, que também possui pelo menos mais três grupos de enzimas que, sinergicamente, atuam sobre a hidrólise coordenada da celulose em glicose pela qual se apresenta grande interesse industrial na produção de etanol combustível (Figura 3).

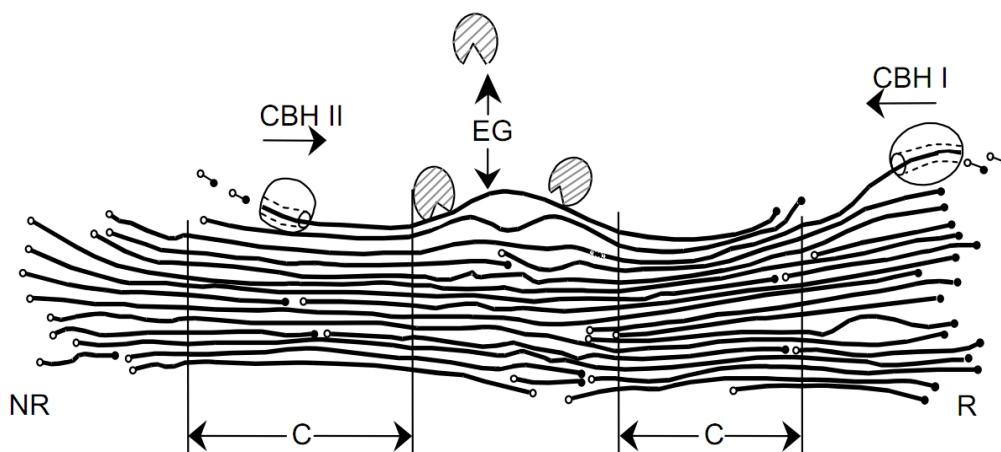


Figura 3. Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose. As duas celobiohidrolases (CBH I e CBH II) atacam as regiões cristalinas nas extremidades opostas das cadeias e as endoglucanases (Pereira, Bassi *et al.*) no meio das regiões mais desordenadas da celulose. As extremidades das fibras com círculos preenchidos representam glicoses terminais redutoras e as não preenchidas, não redutoras. “C” representa região da celulose que apresenta um alto grau de cristalização (Fonte: MIETTINEN-OINONEN, 2007).

Na classificação de Henrissat, as β -glicosidases estão categorizadas na Família 1 das glicosidases baseado na similaridade da sequência de aminoácidos e especificidade quanto ao substrato. Uma característica notável dessas enzimas é sua ampla afinidade por vários substratos apesar da sequência aminoacídica ser altamente homóloga na região aglicona que se liga ao substrato (Henrissat, 1991).

2.3.1. Indução e Mecanismos de Síntese de Celobiasas

As β -glicosidases celulolíticas fúngicas (celobiasas) estão sendo bastante estudadas por diversos grupos de pesquisa para produção de alimentos ricos em carboidratos, flavorizantes, biocombustíveis e outros produtos comerciais derivados da celulose. Os fungos mais estudados sob o ponto de vista de produção de celulases são os pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Para esses fungos já existe uma quantidade expressiva de informações na literatura científica dos mecanismos indutivos e repressivos da expressão do gene correspondente, assim como sobre os mecanismos de conversão por transglicosilação para ativação enzimática. A gentiobiose e a sofrorose, por exemplo, são oligossacarídeos conhecidos como excelentes indutores da expressão de celobiasas em fungos filamentosos, podendo aumentar a indução em 2.500 e 50 vezes, respectivamente

(Suto e Tomita, 2001). Tanto a soforose quanto a gentiobiose são açúcares raros na natureza e não são constituintes da celulose. A atividade indutora desses açúcares foi inicialmente detectada por Gong e Tsao, 1979 *apud* (Suto e Tomita, 2001) em *Hypocrea jecorina* Persson; Fries, 1829 (anamorfo de *Trichoderma reesei*) e em *Penicillium purpurogenum* Stoll, 1923. Messner et al (1991) estudou celulasas constitutivas presentes na superfície de conídios (celobiohidrolases – CBH I e CBH II), responsáveis por converter a celulose cristalina em celooligossacarídeos.

Estudando a iniciação da indução da expressão de celulasas em linhagens mutantes de *T. reesei* para os genes CBH I e EGL II, Seiboth et al (1997) identificou e descreveu a conversão da celulose em oligossacarídeos solúveis seguida de uma transglicosilação de celooligossacarídeos em soforose por uma β -glicosidase extracelular, restando agora saber qual o destino da soforose no disparo indutivo da produção de celulasas no meio intracelular. Inglin et al (1980), também trabalhando com *T. reesei* especulou ao respeito de uma β -glicosidase intracelular, que trabalhando em pH baixo, é responsável pela hidrólise da soforose, controlando assim o quantitativo de indutores secretados (Figura 4).

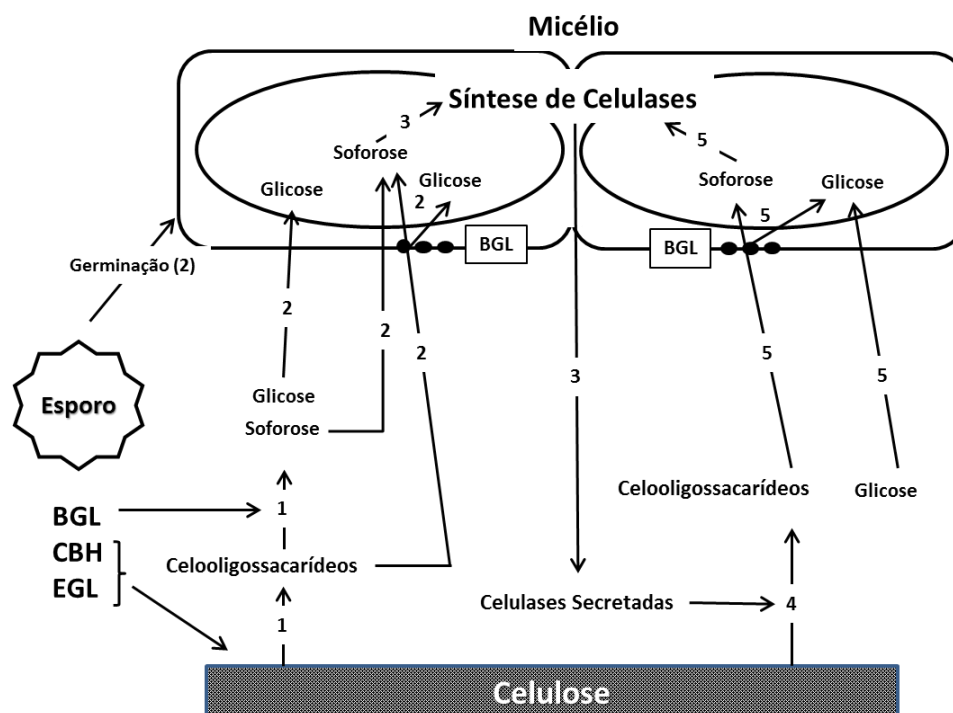


Figura 4. Modelo de indução de celulases em *H. jecorina*. 1) contato dos esporos com a celulose, os celooligossacarídeos são hidrolisados a glicose e transglicosilados a sofrorose por uma β -glicosilase constitutiva; 2) germinação dos esporos. Glicose como fonte de carbono e sofrorose como indutor (interior da célula), BGL ligada à membrana converte oligossacarídeos a sofrorose e glicose; 3) sofrorose induz a síntese de celulases que é secretada pela célula; 4) as celulases secretadas degradam a celulose causando acúmulo de oligossacarídeos e glicose; 5) a glicose é assimilada. Celooligossacarídeos são hidrolisados a glicose e transglicosilados a sofrorose por uma β -glicosilase constitutiva. O ciclo continua até a exaustão da celulose disponível. Abreviações: BGL, β -glicosilase; CBH, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolase; EGL, endo-1,4- β -D-glucanase. (Fonte: SUTO e TOMITA, 2001).

Todas as enzimas envolvidas na formação do complexo celulase parecem sofrer inibição pelos seus produtos, mais comumente a celobiose (EG e CBH's) e glicose (β -glicosidase). Zhao et al (2004) utilizaram técnicas biofísicas de espectros de FT-IR, fluorescência e dicroísmo circular para analisar a interação entre a molécula da celobiose e o sítio ativo das celulases. Os resultados mostraram forte inibição desses sítios ocasionados por impedimentos estéricos pela celobiose, dificultando a difusão da fibra celulósica para o centro catalítico das celulases.

2.3.2. Mecanismo de catálise das β -glicosídeses.

Toda a família 1 das β -glicosídeses apresentam um comportamento geral para a hidrólise de ligações β -glicosídicas entre um carbono anomérico de um monossacarídeo e o oxigênio glicosídico do outro monossacarídeo. Existem dois mecanismos propostos estereoquimicamente diferentes para a clivagem da ligação beta entre as porções glicona

e aglicona de um β -glicosídeo. Estes diferem no que diz respeito à retenção e inversão no centro anomérico do resíduo glicídico redutor. As β -glicosidases em conjunto e de forma sinérgica com outras celulasas e xilanasas são conhecidas por hidrolisar o substrato enquanto retém a configuração anomérica da metade dos açúcares formados (Ramos et al, 2003; Maeda et al 2011, Serpa et al., 2011). O mecanismo de retenção envolve a catálise ácida, protonando o substrato e coordenando um estado de transição chamado íon oxocarbono. A orientação do grupo catalítico é teoricamente definida como sendo complementar à metade da configuração anomérica do açúcar. Ao final da clivagem, o carbono anomérico do monossacarídeo reage com água para gerar β -D-glicopiranosídeo (Figura 5). O mecanismo de inversão está baseado no deslocamento da configuração anomérica pela própria molécula da água, portanto a diferença entre a retenção e inversão da configuração anomérica está apenas no papel do estado de transição das β -glicosidases no que se refere à etapa de inversão ou o simples mecanismo de deslocamento (Maeda et al, 2011, Serpa et al., 2011).

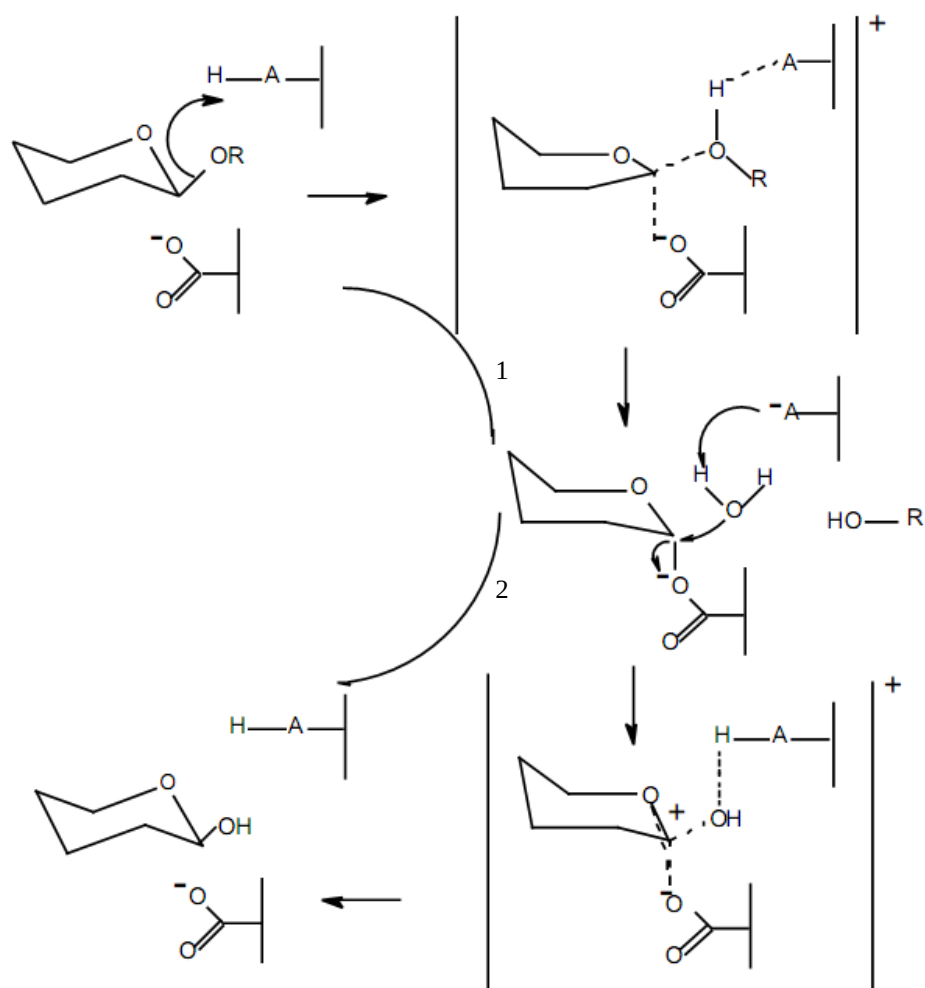


Figura 5. Mecanismo proposto por Wang e Withers (1995) para a hidrólise das ligações β -glicosídicas pelo estado transitório de “retenção” pelas glicosidases. 1 = Glicosilação; 2 = Deglicosilação. (Fonte: Clarke, et al 1993).

2.4. *Dekkera bruxellensis*

A levedura *Dekkera bruxellensis* (Reino Fungi, sub-Reino Dikarya, Filo Ascomycota, sub-Filo Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae, gênero *Dekkera*) agrupa leveduras que apresentam estruturas unicelulares, reproduzem assexuadamente predominantemente por brotamento multilateral e produzem ascopoporos em ascos livres que se originam a partir de um zigoto ou por partenogênese de uma célula somática (Van der Walt, 1964). É considerada a fase teleomorfa da espécie *Brettanomyces bruxellensis*.

Esse grupo de leveduras *Brettanomyces/Dekkera* foi inicialmente descoberto por Claussen em 1904 a partir de isolados de leveduras de cerveja inglesa (daí o nome *Brettanomyces*, que derivou do termo “british”) de sabor e aroma encorpado ao final da fermentação (Basso, et al. 2008) Em 1940, Custer definiu as primeiras características fisiológicas dessa levedura em sua capacidade fermentativa de síntese de ácido acético, crescimento lento em meios contendo extrato de malte e seu curto período de sobrevivência. Morfologicamente apresentam células ogivais (estrutura semelhante à chama de uma vela nas extremidades) com possibilidade de formação de pseudo-hifas, que depende do estado nutricional do meio e presença ou ausência de ascósporos (Figuras 6 e 7). Durante sua reprodução sexuada, os ascos são evanescentes e possuem de um a quatro ascósporos, que apresentam um formato de chapéu ou esféricos com uma borda tangencial que quando liberados tendem a se agrupar (Figura 5). A diferença entre esses gêneros se dá simplesmente pelo fato de *Brettanomyces* (Figura 6) não apresentar ascósporos (fase imperfeita da levedura – anamórfica) (Van Der Walt, 1964). Como aspecto macroscópico, *Dekkera/Brettanomyces* possui características culturais em meios líquido e sólido bem particulares. Em meio líquido, formam um anel delgado que finaliza pela presença de uma película fina com existência de sedimento floculoso e mucoso após dez dias de cultivo. Em meio sólido (ágar malte), as colônias apresentam colorações que variam de creme a marrom clara e salmão, com aspecto liso ou crespo com margens onduladas ou lobulosas. Na presença de carbonato de cálcio, as colônias formam crateras

e o odor ácido é bem característico e percebido facilmente (De Souza Liberal, et al., 2005).

A taxionomia do gênero *Brettanomyces* (atualmente atribuída à forma anamórfica das espécies pertencentes de *Dekkera*) tem sido debatida desde a sua descoberta e foram realizadas várias reclassificações ao longo dos últimos anos. A classificação inicial foi baseada em algumas espécies que reproduzem assexuadamente (forma anamórfica) através de brotamento multipolar). Pouco tempo depois, na formação de ascósporos foi observado que o gênero *Dekkera* que se reproduz sexualmente (fase teleomórfica), e o gênero *Dekkera* foi aceito (van der Walt 1964). A taxionomia atual inclui algumas espécies dentro do gênero *Dekkera/Brettanomyces*. Esses são os anamorfos *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* e *B. nanus*, e os teleomorfos *D. bruxellensis* e *D. anomala* (Van Der Walt, 1964) A distinção entre *Dekkera* e *Brettanomyces* foi discutida por Oelofse et al. (2009) citando Loureiro e Malfeito-Ferreira a partir de 2006, quando afirmou que as técnicas atuais de detecção molecular de ADN não revelaram variação entre os estados anamórficos e teleomórficos. Como existe uma grande importância industrial, no que se refere às suas características fermentativas, existe a utilização de pelo menos duas espécies de *Brettanomyces* disponíveis no mercado. As duas espécies são *B. bruxellensis* e *B. anomalus* sendo a *B. bruxellensis* a estirpe mais usada, justamente devido à sua capacidade de sintetizar β -glicosidases capazes de liberar agliconas com características organolépticas bastante apreciadas em bebidas alcoólicas. As principais características bioquímicas de *D. bruxellensis* estão apresentadas na Tabela 1. Além disso, as células desta espécie são mais resistentes do que a maioria das leveduras aos compostos cicloeximida (actidiona) em até $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e ácido ascórbico em até $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o que facilita seu isolamento de amostras industriais e ambientais.

Tabela 4. Assimilação de açúcares pelas espécies *Dekkera* (Van Der Walt, 1964) e *Brettanomyces* (Van Der Walt, 1964).

Leveduras	Gal	Sac	Mal	Cel	Tre	Lac	Raf	Amisol	Dxilo	Larab	Dribo	Rama	Eritr	Ribi	Dmani	Succ	Citr	Inos
<i>D. bruxellensis</i>	-	+	+	-	+	-	+F	-	-	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>D. intermedia</i>	+	+L	+L	+	+	-	V	-	-	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>B. abstinens</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. anomalus</i>	+	+	+	+	+	+	+L	-	-	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>B. bruxellensis</i>	-	+	+	-	+	-	+F	-	-	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>B. clausenii</i>	-	+	+	+	+	+	+F	-	-	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>B. custersianus</i>	+/- F	+F	+/- F	-	+	-	-	-	-	-	V	-	-	V	-	+	-	-
<i>B. custersii</i>	+	+	+	+	+	+L	+L	-	-	-	+L	-	-	V	-	+L	-	-
<i>B. intermedius</i>	+	+	+	+	+	-	V	-	-	-	V	-	-	V	-	V	-	-
<i>B. lambicus</i>	+L	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+L	-	-	-	V	-	-
<i>B. naardenensis</i>	+L	-	+	+	+	-	-	+L	+	-	-	V	-	V	+	+	-	-

Gal= galactose; Sac= sacarose; Mal= maltose; Cel= celobiose; Tre= trealose; Lac= lactose; Raf=rafinose; Amisol= Amido solúvel; Dxilo= D-xilose; Larab= L-arabinose; Dribo= D-ribose;. Rama=ramanose; Eritr= eritritol; Ribi= Ribitol; Dmani= D-manitol; Succ= ácido succínico; Citr= ácido cítrico;Inosi= inositol; (-) = negativo; (+)= positivo rápido; (+F)= positivo fraco; (V)= variado; (+L)= positivo lento;(-/+F)= negativo ou positivo fraco

Apesar das dificuldades de interpretação dos testes bioquímicos, ocasionadas pelos inconvenientes de interpretação de fracos positivos (+F), de negativo a fraco positivo (+/-F) e ainda as variáveis (V), existe uma chave para identificação baseada em testes fisiológicos de crescimento em placa para espécies do gênero *Dekkera* e *Brettanomyces* que pode auxiliar na triagem, entretanto deve-se levar em consideração que as análises macroscópicas e, principalmente, microscópicas são essenciais no reconhecimento da espécie. As figuras 7, 8 e 9 ilustram, respectivamente, a caracterização fisiológica em placas de cultivo para espécies de *Brettanomyces/Dekkera* (Van der Walt, 1964).

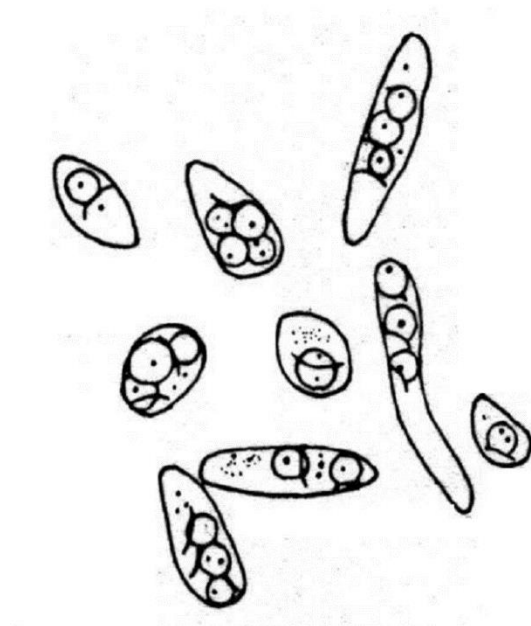


Figura 6. Ascospores of *Dekkera bruxellensis*, YM medium with vitamins, (Source Van der WALT, 1964)

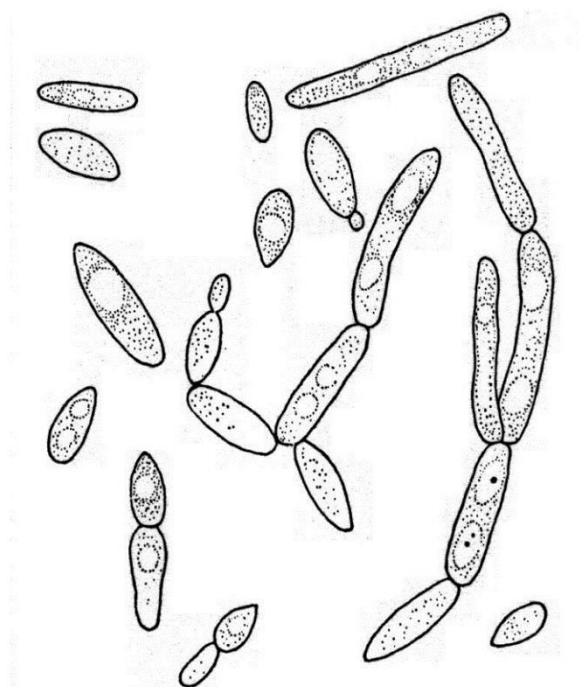


Figura 7. Cells of *Brettanomyces bruxellensis*, Malt extract medium. (Source Van der WALT, 1964).

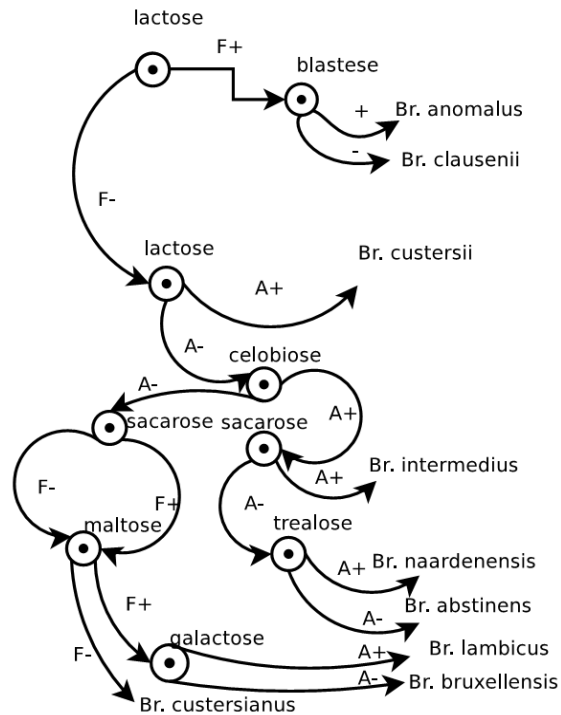


Figura 8. Mecanismos fisiológicos de *Brettanomyces*: F+, fermentação positiva; F-, fermentação negativa; A+, assimilação positiva; A-, assimilação negativa (Fonte: Van der WALT, 1964).

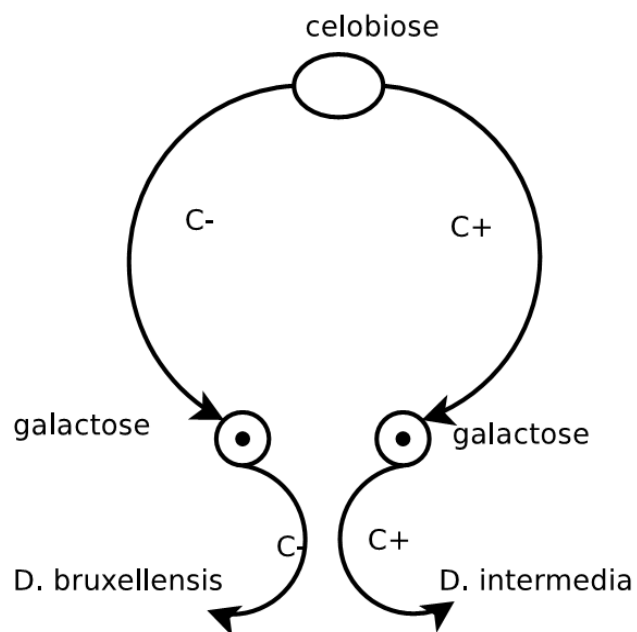


Figura 9. Características fisiológicas/culturais de *Dekkera* segundo Van der WALT (1964).
C+, crescimento; C-, não-Crescimento.

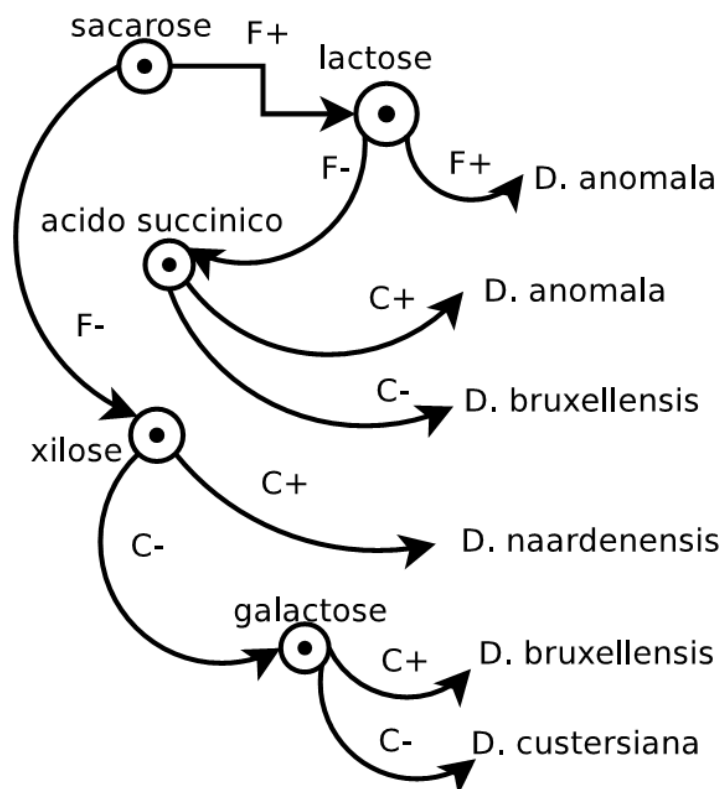


Figura 10. Identificação de espécies do gênero *Dekkera*. F+, fermentação positiva; F-, fermentação negativa; C+, crescimento; C-, não crescimento (Fonte: Van der WALT, 1964).

Ainda como uma abordagem sobre as características metabólicas, em trabalho recente Tiukova et al (2013) analisaram a expressão gênica global de um isolado industrial *D. bruxellensis* CBS 11270 sob aerobiose restrita e limitação de demanda de glicose, por sequenciamento de todo o transcriptoma (figura 11) usando a tecnologia AB SOLiD e observaram a expressão do complexo I NADH-Ubiquinona redutase, embora *D. bruxellensis* seja uma levedura Crabtree positiva. Também observaram maior expressão de enzimas de geração de NADH em comparação com enzimas NAD^+ pode ser a razão para o desequilíbrio NADH anteriormente observado e resultando em efeito Custer em *D. bruxellensis*. Baixa expressão de genes envolvidos na produção de glicerol é provavelmente a base molecular para a alta eficiência de *D. bruxellensis* sob condições de limitação de nutrientes. E o elevado número de genes transportadores de açúcar expressos é consistente com a hipótese de que a competitividade da *D. bruxellensis* é devido a uma maior afinidade para a limitação de nutrientes.

A indústria sucro-alcooleira tem uma grande necessidade de encontrar uma levedura com essas características fisiológicas de conversão de hidrolisados

lignocelulósicos em etanol. Isto é possível a partir de um pré-tratamento da biomassa que apresente um excelente rendimento em produção de celulose e pentoses, nesta Tese sugere-se o pré-tratamento utilizando peróxido de hidrogênio em meio alcalino brando seguido de uma hidrólise enzimática mediada por uma preparação protéica comercial e uma linhagem de levedura adaptada às condições fermentativas industriais como *D. bruxellensis* GDB 248, inclusive sob condições limítrofes de suplementação com nitrogênio como descrito por (de Barros Pita, 2011; Leite, 2013) e relacionando essas características fermentativas com o seu papel ecológico nas dornas de fermentação com *S. cerevisiae*. Por isso justificam-se os estudos desenvolvidos até o momento que elucidam o desempenho metabólico os como será visto nos próximos capítulos.

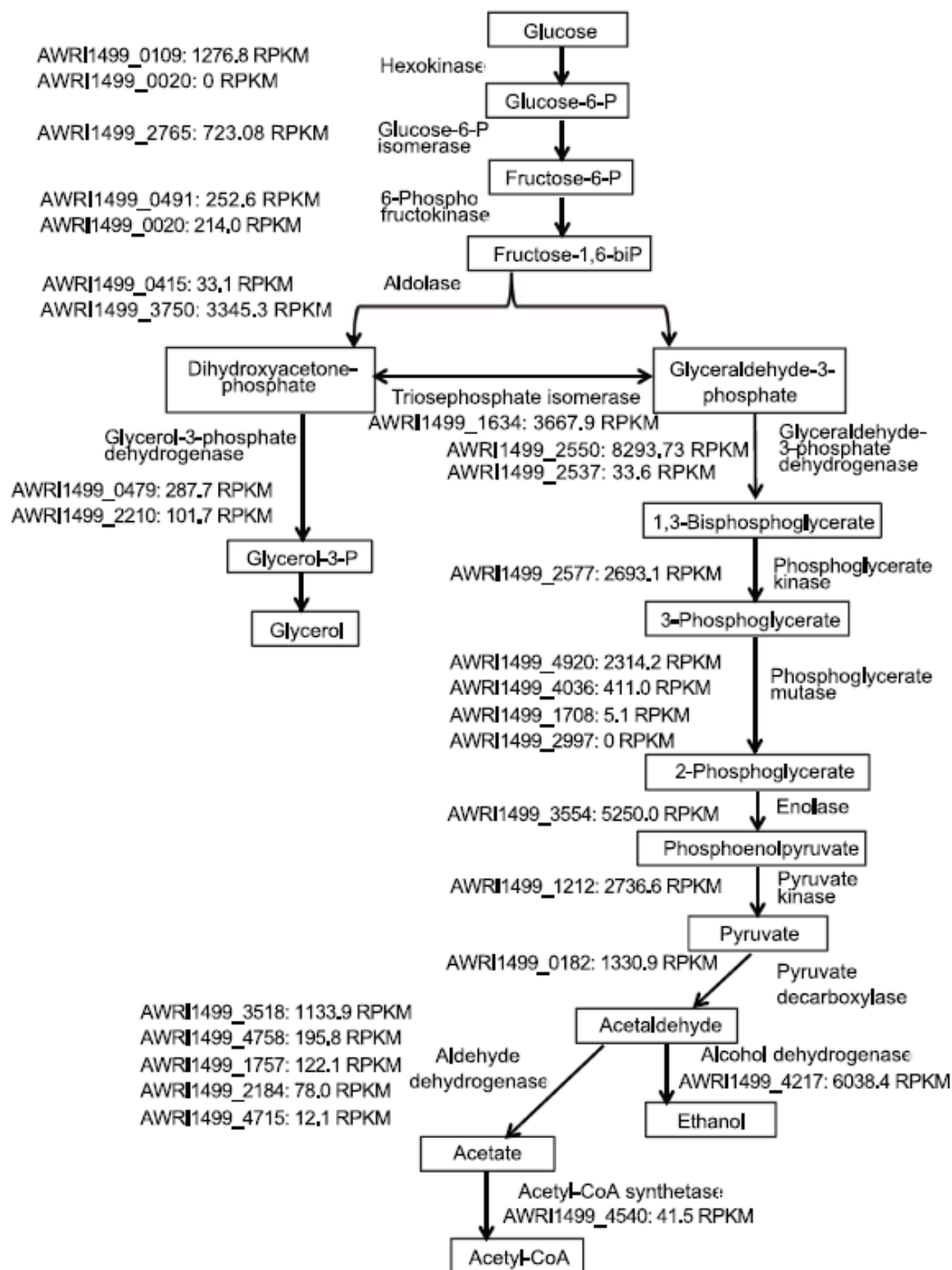


Figura 11. A expressão dos genes envolvidos no metabolismo do carbono central. RPKM é uma medida do nível da expressão de genes expressos como um número de leituras por 1-K pares de bases (Tiukova et al.,2013)

4. CAPÍTULO 1: Fermentação da celobiose em condições de aerobiose restrita e a caracterização de uma celobiase a partir de uma linhagem industrial de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*

Alexandre Libanio Silva Reis^{1*}, Raquel de Fátima Rodrigues de Souza², Rochane Regina Neves Baptista Torres², Fernanda Cristina Bezerra Leite², Patrícia Maria Guedes Paiva³, Esteban Espinosa Vidal¹ e Marcos Antonio de Moraes Jr^{1,2,3,4}

¹ Laboratório de Bioprocessos, CETENE. 50740-540 Recife, PE, Brazil.

²Núcleo Interdepartamental de Engenharia Metabólica, ³Departamento de Genética e

⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. 50670-901 Recife, PE, Brasil.

*Autor para correspondência:

Alexandre Libanio Silva Reis

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Av. Prof. Luiz Freire, 01 - Cidade Universitária 50740-540, Recife PE Brasil

E-mail: libanio.reis@gmail.com

Fone: 55-81-3334-7262

Fax: 55-81-3334-7200

Trabalho aceito para publicação como “Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain”. *SpringerPlus Open Access*, em 14 de janeiro de 2014

RESUMO

A descoberta de uma nova linhagem de levedura, isolada dos processos de fermentação industriais, com uma capacidade natural para produzir etanol a partir de substratos lignocelulósicos (etanol de segunda geração) é de grande importância para a tecnologia de produção de bioetanol. Embora existam algumas leveduras capazes de assimilar celobiose em condições aeróbicas de laboratório, o açúcar predominante no tratamento de material lignocelulósico, pouco se sabe sobre esta capacidade em condições industriais reais. As fermentações foram realizadas simulando as condições industriais, utilizando meios sintéticos suplementados com glicose, sacarose, celobiose e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor como únicas fontes de carbono, com o objetivo de testar a capacidade de fermentação de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* como uma linhagem industrial de levedura promissora. Como resultado, verificou-se (pela primeira vez em condições de aerobiose restrita) que a linhagem de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* GDB 248 poderia produzir etanol a partir de celobiose. Além disso, foi confirmada a atividade celobiásica (β -glicosidase) em extratos semi-purificados caracterizando-a como uma enzima candidato. Foi demonstrado que a linhagem GDB 248 apresentou capacidade de produzir uma concentração de ácido acético maior que o etanol e glicerol, o que confirma a ausência de efeito Custer com esta estirpe em condições de aerobiose restrita. Por outro lado, também se sugere que *D. bruxellensis*, apesar de se apresentar como competidora no ambiente industrial com *Saccharomyces cerevisiae* pode-se apresentar como benéfica para a fermentação. Contudo, confirmou-se que *D. bruxellensis* GDB 248 tem o potencial para produzir etanol a partir de celobiose e se caracteriza como uma linhagem promissora para a fermentação de substratos lenhocelulósicos.

Palavras-chave: gene BGL, β -glicosidase, bagaço hidrolisado, lignocelulose.

INTRODUÇÃO

Recentemente, tem sido demonstrado que a levedura *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* tem o potencial para fermentar a sacarose a partir do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) (Pereira, Bassi et al., 2012; Leite, Basso et al., 2013). Bem adaptada aos processos de produção industrial (De Souza Liberal, Basilio et al., 2007), essa levedura pode ser utilizada para a produção de etanol combustível. Além disso, outra característica importante é a capacidade de assimilar celobiose, um dissacarídeo produzido pela hidrólise parcial de celulose. Esta capacidade é de grande importância na produção de etanol a partir de hidrolisados de bagaço, haja visto que esses resíduos, que podem ser metabolizados, são inacessíveis à fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* (Blomqvist, South et al., 2011). A fermentação celobiose já foi evidenciada em *D. bruxellensis*, no entanto, esta capacidade não é característica em todas as cepas da espécie (Blondin et al., 1982; Spindler et al. 1992; Blomqvist et al. 2010; Galafassi et al. 2011).

Duas características metabólicas bastante citadas da levedura *D. bruxellensis* são: a sua capacidade para produzir o ácido acético a partir de glicose, apesar de isso só ser evidenciado apenas sob condições aeróbias (Leite, Basso et al., 2013) e o efeito Custer, caracterizado pela inibição temporária da fermentação sob condições anaeróbicas (Scheffers, 1979; Wijsman, Van Dijken et al., 1984). Em alguns trabalhos, sugere-se que *D. bruxellensis* não é capaz de produzir glicerol (Wijsman, Van Dijken et al., 1984; Gerós, Azevedo et al., 2000). No entanto, o grupo do Núcleo Interdepartamental de Engenharia Metabólica da Universidade Federal de Pernambuco associados a outros trabalhos que demonstraram que pequenas quantidades de glicerol são produzidas por esta levedura (Pereira et al., 2012; Leite et al. 2013). Em geral, as leveduras produzem glicerol para corrigir o desequilíbrio no potencial redox, em condições de crescimento anaeróbio ou em condição restrita de demanda de oxigênio (Van Dijken e Scheffers, 1986).

Também foi demonstrado que a linhagem *D. bruxellensis* GDB 248 é capaz de assimilar celobiose quando o oxigênio é fornecido por agitação (Leite et al. 2013). Em uma continuação deste trabalho, demonstra-se agora que esta *D. bruxellensis* GDB 248 também pode fermentar celobiose em condições de aerobiose restrita, além da identificação e caracterização parcial da atividade celobiásica (β -glicosidase, EC

3.2.1.21) e o gene que a codifica. Há também uma discussão sobre as vantagens e limitações do uso biotecnológico desta levedura para produção de etanol de segunda geração.

MÉTODOS

Levedura

A linhagem de *Dekkera bruxellensis* GDB 248, que é utilizada no presente estudo, é uma estirpe selvagem isolada a partir do processo industrial de produção de bioetanol de primeira geração (de Souza Liberal et al. 2005). As colônias da cepa foram mantidas por repiques consecutivos em placas de YPD-ágar.

Hidrólise do bagaço

Bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado por explosão à vapor e suspenso em tampão Tris-Acetato 100 mM pH 4.5 para 20 g/L e hidrolisado enzimaticamente com uma preparação comercial Fibrenzyme™ LWT (Dyadic International Inc., Jupiter, USA), com 40 FPU/g de enzima para cada 2 % m/v de bagaço, à 50°C por 72 h sob agitação baixa. O hidrolisado foi centrifugado a 1,200 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de fermentação. A composição dos açúcares totais presentes nas amostras foi avaliada por HPLC (como descrito a diante).

Ensaio de cultivo

As células de levedura foram desenvolvidas em caldo de YPD a 30°C e 150 rpm por 24 h. Depois, as células foram centrifugadas a 4,500 x g por 10 min e então usadas para inoculação em uma etapa seguinte. Fermentações que simularam condições industriais foram conduzidas com 10% (m/v) de biomassa celular, em meio sintético YNB completo (1.7 g/L) contendo sacarose (25 g/L) (SMsuc), celobiose (SMcello) (20.5 g/L) ou uma mistura de celobiose e glicose (SMcello/glu) (10 g/L cada), bem como em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (SMbag) (4.45 g/L celobiose, 9.43 g/L glicose, 8.15 g/L xilose) a 30°C por diferentes períodos. Foi mantida uma baixa agitação a 120 rpm, apenas para evitar a sedimentação das células.

Extrato proteico e atividade celobiásica (β -glicosidase)

Células de leveduras foram cultivadas em meio sintético (1.7 g/L YNB) completo contendo celobiose a 1 g/L até atingir uma densidade óptica de 0.6 A_{600nm} e depois diluiu-se 1:1000 para um volume de 250 mL em meios sintéticos contendo glicose, celobiose ou sacarose a 1.0 g/L. Os frascos foram incubados por 24 h a 33°C e 130 rpm numa incubadora com agitação orbital do tipo “shaker”. Em seguida, as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em 250 mL do meio de cultivo correspondente (como descrito acima). Este processo foi repetido quatro vezes e após o último ciclo a densidade celular foi determinada (Leite, Basso et al., 2013).

Todas as células foram coletadas por centrifugação a 3,800 x g e 4°C por 30 min. O precipitado foi ressuspendido com dois volumes de tampão acetato 10mM pH 4 contendo 1 mM β -mercaptoetanol e as células foram lisadas por maceração em nitrogênio líquido. O extrato obtido foi centrifugado a 21,000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para os experimentos seguintes. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método Comassie® Blue. A reação enzimática foi realizada misturando-se 100 μ g de proteínas do extrato bruto e a solução de açúcar foi diluída em tampão acetato de sódio 100mM pH 4.8 para o volume final de 1 mL. A reação foi incubada por 10 minutos a 37°C e foi parada transferindo os tubos para um banho de gelo. A concentração de glicose liberada foi medida com o auxílio de um kit de glicose-oxidase (LabLabor, Brasil). A atividade específica foi expressa como a quantidade de glicose liberada em μ mol por minuto a partir um miligrama de proteína obtida de um grama de biomassa celular úmida. Para testar a presença de enzimas extracelulares, foram utilizados os sobrenadantes de culturas de sacarose ou celobiose em reações enzimáticas.

Purificação da Celobiase (β -glicosidase)

Para obter os extratos proteicos, as células de levedura foram cultivadas em meio sintético completo com celobiose como única fonte de carbono, logo depois foram lisadas e submetidas a um fracionamento com sulfato de amônio a partir de 0% a 60% de saturação. O precipitado foi ressuspendido em tampão citrato de sódio 100 mM pH 5 e posteriormente dialisado contra água deionizada com objetivo de dessalinizar as frações proteicas (Bollag, Edelstein et al., 1996). As frações proteicas foram testadas para atividade β -glicosidase usando o substrato cromogênico p-nitrofenil- β -D-

glicopiranosídeo (pNPG). As frações que apresentavam atividade enzimática foram reunidas (fração EF1) e então submetidas à cromatografia de exclusão molecular em colunas contendo matriz Sephadex® G75 (26 mm de diâmetro, 10 cm de altura, equilibradas com tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5 a um fluxo de 6 mL/h). As frações eluídas contendo atividade β -glicosidase foram reunidas e submetidas à cromatografia de troca iônica em CM-celulose (15 mm de diâmetro, 10 cm de altura, equilibrada com tampão citrato-fosfato 10 mM pH 3.8 a um fluxo 10 mL/h). As proteínas ligadas à matriz foram eluídas com uma solução de NaCl a 0.5 M a fluxo de 10 mL/h e as frações contendo atividade β -glicosidase foram novamente reunidas (fração EF2). A pureza das proteínas foi verificada por eletroforese em SDS-PAGE em 12% de gel de acrilamida. Uma isoeletrofocalização foi realizada para determinar o ponto isoelétrico da proteína isolada. Uma eletroforese 2D utilizando fitas de gradiente de pH imobilizados (Immobiline™ DryStrip Gels, GE Healthcare) com amplitudes de pH que variaram entre 3 a 10 foi equilibrada por 30 min com solução contendo DTT 6.5 mM e IAA 134 mM e então o extrato proteico foi submetido a uma pré-corrida eletroforética a 200 V (2 mA) por duas horas, seguida pela corrida a 3,500 V (2mA) por 1.25 h. As fitas, depois, foram usadas para uma separação por eletroforese de segunda dimensão em gel de poliacrilamida 12% e revelada por coloração com Comassie® Blue.

Ensaio de cinética enzimática

O ensaio de especificidade do substrato para dissacarídeos foi determinada (como descrito acima). O perfil cinético da fração EF2 foi avaliada utilizando pNPG como substrato. As reações foram padronizadas usando um volume de enzima contendo 100 μ g de proteína, de um volume igual de solução de pNPG 100mM e tampão citrato de sódio 100 mM pH 4,8 para um volume final de 1 mL. As reações foram incubadas a 37°C durante 10 minutos e interrompida pela adição de 100 mL de solução de bicarbonato de sódio 1M e a cor amarela, indicativa de libertação pNP foi quantificada a 410 nm. Uma curva padrão foi preparada com pNP correlacionar -se a absorvância com a quantidade de produto vaporizado e a atividade específica foi calculada como a quantidade de enzima que produziu um μ mol de pNP por minuto por miligrama de proteína da amostra. O pH ótimo foi avaliado usando tampão de citrato-fosfato ajustado para diferentes valores de pH e as reações foram incubadas a 30°C durante 10 minutos. Ao testar a temperatura ótima de atividade celobiásica, o pH foi ajustado para 4,0 e as reações foram incubadas a

diferentes temperaturas durante 10 minutos. A estabilidade térmica da enzima foi analisada por incubação com fração EF2 durante 10 minutos a temperaturas que variam de 20°C a 60°C. Posteriormente, a preparação de enzima foi deixada à temperatura ambiente (25°C) durante 10 minutos e em seguida, utilizada para avaliar a atividade da enzima utilizando pNPG a pH e temperatura ótimos. A taxa de conversão máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e constante de afinidade (k_m) foram calculados a partir de da projeção do duplo recíproco no gráfico de Lineweaver-Burk variando a concentração de pNPG nas reações, que também foi utilizada para calcular a constante catalítica (k_{cat}) da enzima parcialmente purificada. A inibição da atividade foi medida pela adição de dissacarídeos ou pNPGal a 10 mM em reações contendo pNPG e expressa como a percentagem de pNP produzido. Todas estas medições foram realizadas ao pH e temperatura ideais.

Análises de açúcares e principais produtos metabólicos

As concentrações de etanol, acetato, sacarose, glicose e celobiose nas amostras coletadas de fermentação foram determinadas por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) composto por um sistema Agilent 120039, um injetor automático, um detector nas faixas de comprimento de onda no infravermelho e ultravioleta e uma coluna de troca catiônica AMINEX HPX-87H (Bio-Rad, USA), precedida de uma pré-coluna micro-Guard (Bio-Rad). A fase móvel usada foi de ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0.6 mL/min. A temperatura do forno foi de 70°C. O volume de amostra injetado foi de 20 µL. Os compostos foram identificados a partir dos seus tempos de retenção relativos e quantificados diretamente a partir de uma curva padrão com diluição seriada. Os valores representam, pelo menos, a média de duas réplicas biológicas.

Identificação genética e análise *in silico*

Pesquisas por meio de palavras-chave como hidrolase, amilase, amiloglicosidase e glicosidase foram realizadas na base de dados genômicos de *D. bruxellensis* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/>) e as sequências de nucleotídeos dos contigs recuperados foram usados para análise no BLASTx do GenBank. O contig de *D. bruxellensis* que apresentou maior semelhança com os genes de codificação da β - glicosidase foi recuperado e a ORF foi determinada pela ferramenta ORF Finder, NCBI.

A sequência parcial da proteína β -glicosidase foi utilizada para a análise em BLASTp na base de dados do genoma de *D. bruxellensis* do “Joint Genome Initiative”-JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/Dekbr1/Dekbr1.home.html>) no objetivo de recuperar a sequência da proteína completa. A análise filogenética de sequências de aminoácidos codificadas pelos genes β - glicosidase de *D. bruxellensis* e outros fungos, foi realizada como previamente relatado (De Souza Liberal, Carazzolle *et al.*, 2012). Uma sequência bacteriana da β - glicosidase de *Thermotoga neapolitana* foi usada como “out-group”. Domínios funcionais da β -glicosidase putativa de *D. bruxellensis* foram identificados usando as ferramentas de análise estrutural disponíveis on-line no Instituto Europeu de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/>) e SIB Bioinformatic Resource Portal (<http://www.expasy.org/>).

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o Software ASSISTAT® (7.6 beta Version) (Silva e Azevedo, 2006). Uma série de sete testes foram realizados para analisar a distribuição normal das variáveis ($P > 10$). Os dados com distribuição normal foram analisados com os testes paramétricos. As diferenças entre os principais metabolitos e álcoois medidos nas amostras de fermentação, foram determinados através da realização de uma análise de variância (ANOVA), em um delineamento experimental inteiramente casualizado ($p < 0,05$). O teste de Tukey foi aplicado a um nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), para determinar a diferença significativa entre as variáveis.

RESULTADOS

Produção e purificação de uma celobiase (β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21) de *D. bruxellensis*

Com o objetivo de determinar as melhores condições para a expressão da atividade celobiásica, células da levedura GDB 248 foram cultivadas em meio sintético contendo glicose, sacarose, maltose e celobiose com o objetivo de testar as atividades dos extratos celulares para as principais glico-hidrolases: invertase (EC 3.2.1.26, β -frutofuranosidase), celobiase (β -glucosidase, EC 3.2.1.21) e maltase (α -glucosidase, EC 3.2.1.20). Nenhuma atividade hidrolítica foi detectada no sobrenadante das culturas celulares. Os resultados das análises mostraram que a atividade de invertase intracelular foi de 1,6 e 3,3 vezes mais elevadas quando cultivadas em glicose, enquanto que a atividade celobiásica intracelular era de 3,4 e 1,8 vezes mais elevadas do que a sacarose em condições de celobiose (Tabela 1). Não foi detectada atividade da maltase intracelular nas condições testadas. No entanto, foi somente nas condições de crescimento em celobiose que a atividade celobiásica foi encontrada com cerca de 1,6 vezes maior do que com a atividade de invertase. Para confirmar a expressão da celobiase, o extrato celular, preparado a partir do cultivo de células de levedura em celobiose, foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio e as frações com atividade foram reunidas e a celobiase foi parcialmente purificada (Tabela 2).

Tabela 1. Efeito de diferentes fontes de carbono em meios sobre a atividade enzimática dos extratos celulares de *Dekkera bruxellensis* GDB 248. O extrato bruto (mg de proteína) foi testado a partir de culturas em frascos de 250mL. Uma unidade de atividade enzimática (U) é o equivalente à quantidade de glicose (μmol) liberada por minuto a partir de 1mg de proteína para um grama de massa úmida de levedura, a 37°C.

Açúcar no meio	Substrato da reação enzimática	Enzima testada	Atividade Específica (U/g Cel)
Glicose	Sacarose	Invertase	$0.998 \pm 0,01$
	Celobiose	β -glicosidase	$0.835 \pm 0,02$
	Maltose	α -glicosidase	0.000
Sacarose	Sacarose	Invertase	$0.598 \pm 0,01$
	Celobiose	β -glicosidase	$0.024 \pm 0,03$
	Maltose	α -glicosidase	0.000
Celobiose	Sacarose	Invertase	$0.295 \pm 0,01$
	Celobiose	β -glicosidase	$0.460 \pm 0,02$
	Maltose	α -glicosidase	0.000

Tabela 2. Resumo de purificação parcial de celobiase de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 cultivado em meio contendo celobiose.

Etapas de purificação ^a	Concentração proteica (mg/mL)	Atividade específica (μmol EqGlicose/min.mg Proteína) ^b	Fator de purificação
Extrato celular	0.95	0.104	1.0
EF1 ^c	1.19	0.113	1.09
EF2^d	0.11	0.848	8.16

^a5g de massa úmida de levedura foi utilizada para a purificação.

^batividade β -Glicosidase foi avaliada com p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) 100mM a 37°C.

^c fração ativa separada a partir de cromatografia de exclusão molecular.

^d fração ativa separada a partir de cromatografia de troca iônica.

Parâmetros cinéticos da celobiase de *D. bruxellensis*

Uma fração purificada da celobiase (referindo-se à fração candidata EF2 na Tabela 2) a partir de *D. bruxellensis*, exibiu uma pequena amplitude de pH para a sua atividade ótima em tampão citrato de sódio 100 mM a pH 3.8 quando celobiose foi utilizada como substrato (Fig. 1A). Por outro lado, EF2 mostrou uma amplitude maior de temperaturas ótimas (Fig. 1B). Sob estas condições (tampão citrato de sódio 100 mM pH 3.8 e 30°C), a celobiase de *D. bruxellensis* apresentou um amplo espectro de atividade

para dissacarídeos (Tabela 3). No entanto, quando o dissacarídeo sintético cromogênico pNP- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) foi usado, as condições ótimas para a atividade da enzima foram estabelecidas como 30°C e 5 mM de tampão de acetato de sódio pH 4.8 e a partir deste momento em diante, todas os ensaios foram realizados nestas condições. Não foi detectada atividade para o dissacarídeo sintético pNP- β -D-galactopiranosídeo (pNPGal) (Tabela 3). A inibição competitiva da hidrólise do pNPG foi observada na presença da celobiose, sacarose e até dissacarídeos como maltose, enquanto que a presença de pNPGal não impediu uma interação de pNPG com o sítio ativo da enzima (Tabela 3). Os seguintes parâmetros cinéticos foram determinados utilizando pNPG: $k_m=0,58$ mM; $V_{máx} = 154$ $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína⁻¹; $k_{cat} = 12,84.\text{min}^{-1}$.

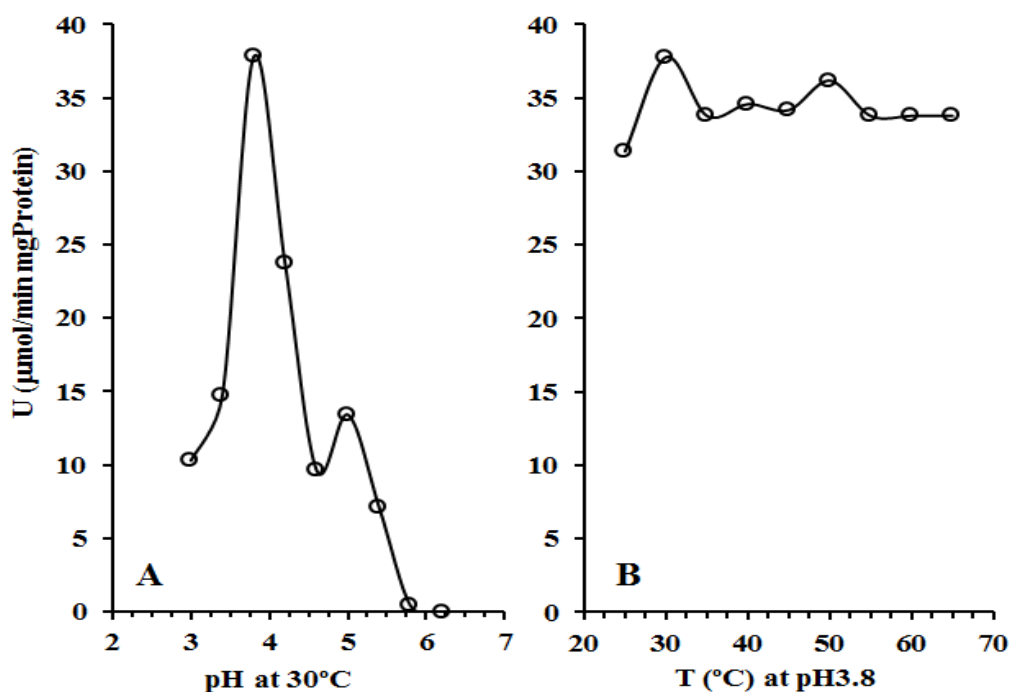


Figura 1. Determinação da atividade da β -glicosidase parcialmente purificada de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em função do pH ótimo (A) e temperatura ótima (B) usando pNPG a 100mM como substrato a 37°C.

Tabela 3. Efeito de dissacarídeos sobre a atividade da celobiase parcialmente purificada de *Dekkera bruxellensis* GDB 248.

Substrato	Ligação glicosil	Atividade relativa (%)	Atividade inibitória (%) ^a
Celobiose	Glicose-β(1→4) β-Glicose	100.0	100.0
Maltose	Glicose-α(1→4)α-Glicose	27.7 ± 0,01	94.9
Sacarose	Glicose-α(1→2)β-Fructose	90.0 ± 0,03	95.2
pNPG	Glicose-β(1→4)β-phenyl	100.0	n.a ^b
pNPGAL	Galactose-β(1→4)β-fenil	0.0	0.0

^a Dissacarídeos foram adicionados às reações com o substrato cromogênico pNPG.

^b não aplicável.

Análise *in silico* do gene *BGL*

A sequência de nucleotídeos do gene *BGL* codificado da celobiase de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* foi identificada a partir de *Dekkera bruxellensis* Genomic Database. A análise da estrutura proteica foi predita em sequência de aminoácidos de três domínios principais, semelhantes à enzima em *Kluyveromyces marxianus*. O N-terminal apresentou uma família glicosil 3-hidrolase seguido pela β-barril PA14, que está envolvida na ligação com carboidratos em *K. marxianus* (Yoshida, Hidaka et al., 2010). No C terminal, existe um tipo fibronectina III do tipo de domínio que também está presente na estrutura de *K. marxianus* celobiase (Yoshida, Hidaka et al., 2010). É possível que este domínio esteja envolvido na interação proteína-proteína para formar uma estrutura homodimérica da enzima. Os resultados obtidos *in silico* confirmou a identificação do gene que codifica a BGL putativa (β-glicosidase) de *D. bruxellensis*.

Fermentação em condições industriais

Um ensaio de fermentação comparativo foi conduzido utilizando celobiose como a única fonte de carbono a fim de analisar a eficiência da fermentação da linhagem GDB 248 de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* no que diz respeito ao modelo aplicado na fermentação industrial local, que utiliza a sacarose. A Figura 2 mostra o perfil cinético da GDB 248 em meio sintético YNB com sacarose (SMsuc) (gráfico A) e celobiose (SMcello) (gráfico B). Calcula-se que a taxa de consumo de sacarose foi de 3,8 vezes maior do que a celobiose (Tabela 4). Apesar de toda a sacarose ter sido consumida nas primeiras 6 horas de fermentação, na condição SMcello a celobiose ainda manteve-se acima de 50 % em 8 horas de fermentação (Fig. 2B). Isso resultou em uma produção de etanol 1,56 vezes maior na condição SMsuc. Em contraste, a produção de ácido acético foi 1,64 vezes maior no meio contendo celobiose do que em meio suplementado com sacarose. Não foi detectada a presença de glicerol no decurso da fermentação em qualquer uma das fontes de carbono de dissacarídeo. Ao mesmo tempo, apenas em condições SMsuc que foi observado o aumento da concentração de frutose e glicose (a 1g/L durante quatro horas de fermentação, declinando para zero em 8 horas). Nenhuma variação numérica em biomassa celular foi observada (dados não mostrados) em qualquer uma das condições aplicadas.

Os parâmetros dos ensaios de fermentação em frascos contendo uma mistura de quantidades equivalentes de glicose e celobiose, foram avaliados a fim de que em uma análise adicional pudessem ser realizados ensaios com bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado avaliando a capacidade de assimilação de diversos açúcares e produção de etanol por GDB 248. Na Figura 3 o perfil cinético de GDB 248 está representada com uma mistura de glucose e celobiose (SMcello/glu) (A) e no bagaço de cana de açúcar (B). As curvas de glucose e celobiose mostrou que GDB 248 elevou 17 vezes e 10,5 vezes a taxa de consumo na condição SMcello/glu do que na SMbag (Tabela 1). De todas as condições avaliadas, a produção de glicerol foi mais elevada na condição SMbag, com uma alteração, que foi 2,8 vezes mais do que no meio SMcello/glu. No que diz respeito ao ácido acético e etanol, a produção foi semelhante para ambas as condições ($p < 0,01$), enquanto que a produtividade máxima em SMcello/glu foi 2,4 vezes mais elevada do que na condição SMbag, que, em conjunto com a condição SMsuc, apresentou uma das maiores taxas de produção detectada ($0,24 \text{ g} / \text{L.h}^{-1}$) (Tabela 4). Assim, aparentemente a

fermentação de celobiose foi estimulada pela presença de glicose no meio, enquanto que a produção de ácido acético é reduzida aumentando a eficiência de fermentação (Tabela 4). Isto pode ser parcialmente explicado pelo fato de que a atividade da celobiase foi induzida pela presença da glicose nos extratos celulares mais do que as outras fontes de carbono avaliadas neste estudo (Tabela 1).

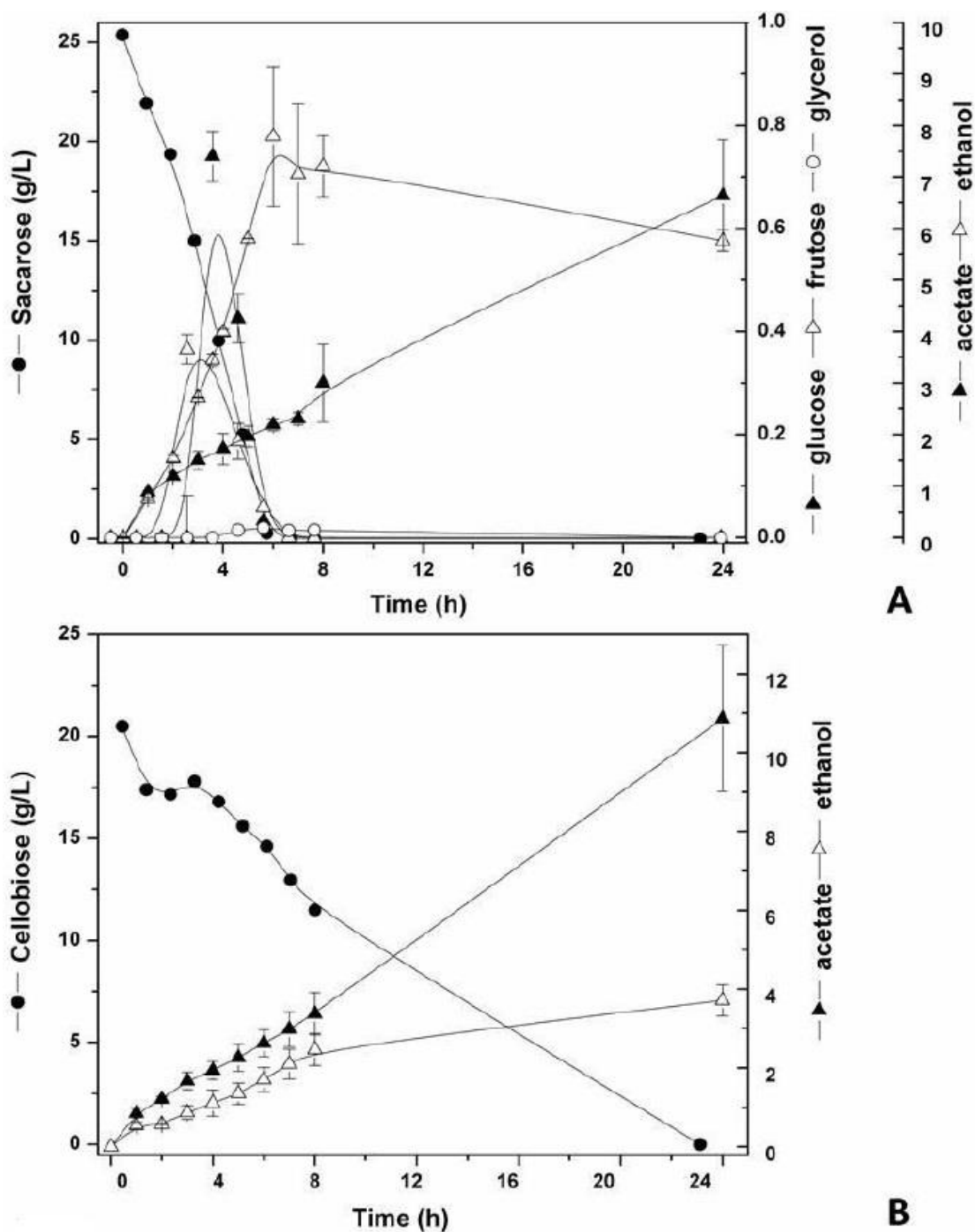


Figura 2. Parâmetros cinéticos da fermentação em frascos de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meios sintéticos contendo sacarose (A) ou celobiose (B) por 24 horas a 32°C em condições de aerobiose restrita.

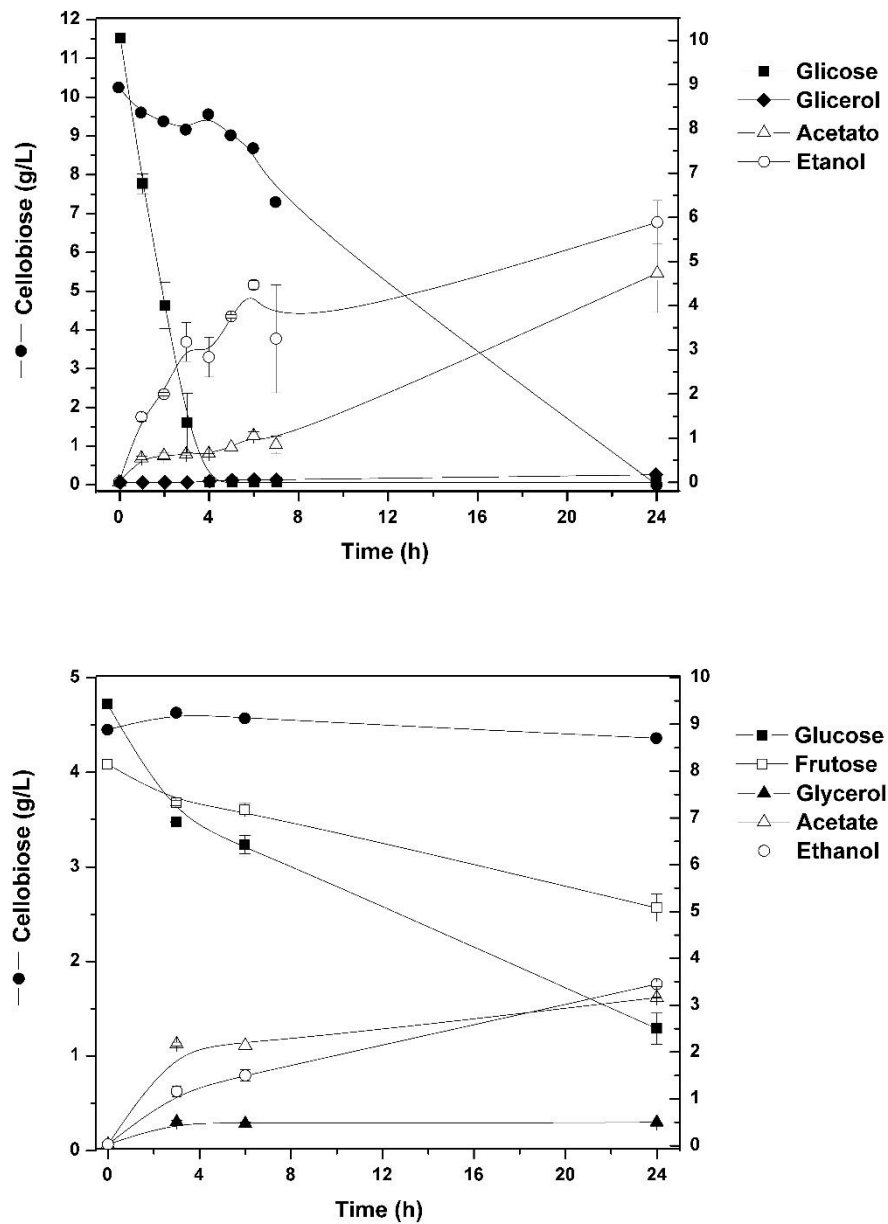


Figura 3. Parâmetros cinéticos da fermentação em frascos de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em meios sintéticos contendo celobiose/glicose (A) ou bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (B) por 24 horas a 32°C em condições de aerobiose restrita.

Tabela 4. Concentrações finais dos principais compostos de fermentação, produtividade máxima ($P_{máx}$) e eficiência de fermentação por *D. bruxellensis* GDB 248 Um inóculo de 10% m/v (A_{600nm}) foi cultivado durante 24 h a 30°C em condições semelhantes às industriais com meio mineral YNB contendo sacarose (SMSsuc), celobiose (SMScello), uma mistura de celobiose e glicose (SMScello/glu) e hidrolisados pré-tratados de bagaço de cana-de-açúcar (SMSbag). O açúcar consumido foi calculado através da conversão de quantidades de dissacarídeos ao equivalente em gramas de glicose e em seguida subtraindo o valor inicial da concentração de açúcar total final. A produtividade de etanol ($P_{máx}$) foi medida dividindo a concentração final de etanol por 24 h ou 48 h. O rendimento da fermentação foi expresso como uma percentagem do rendimento máximo teórico em 100 g de glicose produz 51,1 g de etanol. Todas as condições de fermentação foram realizadas a partir de duas réplicas biológicas. A mesma letra indica que não há nenhuma diferença estatística.

	Fonte de açúcar	Açúcar residual		Açúcar consumido		Taxa de açúcar consumido	Glicerol		Acetato		Etanol		P _{máx} etanol	Eficiência de fermentação
		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(-g/L.h)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L.h)	(%)
SMSsuc	Sacarose	25.00	0.00 ^b ± 0.00	25.00 ± 2.50	4.79	0.00 ^c ± 0.00	6.64 ^{ab} ± 1.08	5.76 ^a ± 0.21	0.24	42.85 ± 2.51				
SMScello	celobiose	20.50	0.00 ^b ± 0.00	20.50 ± 2.05	1.26	0.00 ^c ± 0.00	10.87 ^a ± 1.85	3.72 ^b ± 0.39	0.15	33.71 ± 2.09				
SMScelo/glu	celobiose	10.00	0.00 ^b ± 0.00	20.00 ± 2.00	0.43	0.18 ^b ± 0.04	4.73 ^b ± 0.89	5.88 ^a ± 0.49	0.25	56.06 ± 2.51				
	glicose	10.00	0.00 ± 0.00		2.89									
SMSbag	celobiose	4.45	3.41 ± 0.30	17.67 ± 1.77	0.04	0.49 ^a ± 0.04	5.38 ^b ± 0.24	4.87 ^{ab} ± 0.40	0.10	53.95 ± 2.51				
	glicose	9.43	0.00 ^a ± 0.00		0.21									
	frutose	8.15	0.95 ± 0.06		0.14									

DISCUSSÃO

A levedura *D. bruxellensis* ainda é considerada, pela literatura, como a principal forma microbiológica de provocar prejuízos na produção de bioetanol e a produção de vinho, sendo um fator importante nestes processos industriais (De Souza Liberal, Da Silva Filho *et al.*, 2005). No entanto, o seu interesse como uma candidata potencial para fermentação na produção de bioetanol de segunda geração a partir de substratos lignocelulósicos tem sido positivamente relatada (Blomqvist, South *et al.*, 2011). Além disso, essa linhagem industrial mostrou um desempenho relativamente alto na fermentação do caldo de cana de açúcar (Pereira, Bassi *et al.*, 2012) e de melaço de cana de açúcar (manuscrito em preparação), bem como sendo capaz de assimilar a celobiose usando como única fonte de carbono (Leite, Basso *et al.*, 2013).

Assimilação celobiose e sua hidrólise são as principais vantagens para uma levedura quando se considera a produção de etanol a partir de material celulósico hidrolisado. Neste estudo, os resultados demonstraram que em condições de aerobiose restrita a linhagem de GDB 248 é capaz de assimilar celobiose com 64,5% de eficiência relativa em comparação com a assimilação de sacarose. As condições de fermentação utilizadas neste trabalho incluíram uma quantidade elevada biomassa microbiana como inóculo (10 % w/v), baixa agitação, concentração elevada de carbono e a pressão de CO₂ gerada positiva. Isso garantiu um ambiente quase anaeróbio ou com oxigenação restrita, o que nos permitiu avaliar a capacidade potencial da levedura GDB 248 para produzir etanol em condições semelhantes às industriais. Isto difere consideravelmente a partir de estudos anteriores que relataram fermentação celobiose de outras linhagens de *D. bruxellensis* (Blomqvist, Eberhard *et al.*, 2010; Galafassi, Merico *et al.*, 2011). A linhagem GDB 248 apresentou preferência à glicose como fonte de carbono a celobiose e isto resultou numa maior taxa de produção de etanol e consequentemente a uma boa eficiência de fermentação. Esta preferência pode estar atribuída a repressão catabólica exercida pela glicose ou a sua capacidade limitada para assimilação celobiose, isto é, uma deficiência no transportador.

Uma purificação parcial de uma fração proteica foi realizada para confirmar a atividade celobiásica e isto resultou numa caracterização da atividade de β -glicosidase. As condições ideais para a atividade enzimática (30°C e pH 4,8) e seu perfil cinético se assemelham às descritas por *Kluyveromyces marxianus* (Yoshida, Hidaka *et al.*, 2010). Além disso, os resultados obtidos *in silico* identificou o gene que codifica para o BGL (β – glicosidase) no genoma de *D. bruxellensis*. A proteína

contém teoricamente 840 aminoácidos com um peso molecular previsto de 93 kDa, pertencente à uma família 3 do grupo das glicosil-hidrolases, apresenta um N-terminal seguido pela β barril PA14, o qual foi relacionado no seu envolvimento na ligação entre açúcares, a mesma estrutura é apresentada em *K. marxianus* (Yoshida, Hidaka et al., 2010). No C- terminal foi observado um tipo de domínio semelhante à fibronectina III do que também está presente na estrutura da celobiase de *K. marxianus* (Yoshida, Hidaka et al., 2010), a função da qual ainda é desconhecida. Este domínio pode estar envolvido na interação proteína-proteína para formar a estrutura homodimérica da enzima. Nem o domínio transmembrana, peptídeo sinal e nem os locais de glicosilação foram identificados, o que confirmam os resultados experimentais, que apresentam a localização intracelular da enzima.

Etanol e ácido acético foram produzidos nas condições de aerobiose restrita aplicadas neste trabalho, que por sua vez simularam as condições industriais. Além disso, foi observada uma baixa produção de glicerol, como relatado anteriormente em outros trabalhos (Pereira, Bassi et al., 2012; Leite, Basso et al., 2013). Também é bem sabido que em condições de aerobiose restrita em *D. bruxellensis*, ocorre uma inibição da fermentação ou o efeito Custer é evidenciado. Além disso, verificou-se que não foi produzido ácido acético, enquanto a glicose era consumida a uma taxa elevada (Fig. 3A). No entanto, quando a celobiose é consumida a uma taxa baixa, a produção de acetato é acelerada (Fig. 3A). Isto sugere que a glicose inibe a aldeído desidrogenase, que é a enzima responsável pela produção de acetato (Blomqvist, South et al., 2011). Neste estudo, os resultados obtidos demonstram a capacidade de *D. bruxellensis* em produzir ácido acético, mesmo em condições de aerobiose restrita e aponta para a importância do efeito Custer no rendimento final de etanol. Da mesma forma, no estudo de Blomqvist et al. (2010), o ácido acético foi visivelmente mais produzido quando *D. bruxellensis* foi cultivada em celobiose como única fonte de carbono, tanto quanto a glicose sob as mesmas condições. Outra característica interessante é que a levedura *Dekkera/Brettanomyces* é sensível a concentrações de ácido acético acima de 2 g/L (Yahara, Javier et al., 2007), enquanto que essa linhagem GDB 248 revelou-se muito resistente a ácido acético - no intervalo de 5,5 vezes maior do que outras cepas. Esta tolerância ao ácido acético foi recentemente observada (Pereira, Bassi et al., 2012). Parece que há grandes variações no genoma de diferentes linhagens *Dekkera/Brettanomyces* sp e isso leva a uma grande variedade de fenótipos.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho podem ajudar a explicar por que leveduras de *Dekkera/Brettanomyces* podem competir com *S. cerevisiae* em ambientes industriais, enquanto que as culturas isoladas de *D. bruxellensis* na mesma condição têm baixa eficiência de fermentação. É possível que este comportamento possa estar atribuído ao fato de que tanto a celobiase quanto a invertase sejam intracelulares em *D. bruxellensis*. No entanto, nas condições de aerobiose restrita industriais em que a sacarose é a fonte de carbono principal, a atividade de invertase extracelular de *S. cerevisiae* pode ser aproveitada por leveduras *Dekkera/Brettanomyces*.

Recentemente, foram publicados vários trabalhos que afirmam existir um número crescente de leveduras capazes de hidrolisar celobiose para a produção de etanol, por exemplo *Candida queiroziae*, *Clavispora sp*, e *Spathaspora passalidarum* (Santos, Cadete et al., 2011; Lewis Liu, Weber et al., 2012; Long, Su et al., 2012) e *D. bruxellensis* (Blomqvist, Eberhard et al., 2010; Galafassi, Merico et al., 2011; Leite, Basso et al., 2013). No entanto, apenas espécies *Dekkera/Brettanomyces* provaram ser capazes de metabolizar açúcares em etanol e sobreviver em ambientes industriais (De Souza Liberal, Basilio et al., 2007; Passoth, Blomqvist et al., 2007; Pereira, Bassi et al., 2012). Assim, o grande desafio para a sua utilização como uma levedura de fermentação é a forma de abordar os questionamentos sobre as baixas taxas de conversão, quando confrontados com condições de simulação industrial. Estudos estão sendo realizados em nosso laboratório para identificar os principais gargalos metabólicos que caracterizam esse recurso e avaliar a capacidade da espécie para converter hidrolisados de bagaço de cana de açúcar e sorgo sacarino em etanol e alcançar altos rendimentos industriais.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Rede de Pesquisas em Bioetanol do Estado de Pernambuco (programa CNPq-FACEPE/PRONEM, concessão n° APQ-1452-2.01/10), pelo programa CNPq-Universal (concessão n° 472106/2012-0) e pela Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil (número SIGTEC PRJ03.33).

5. CAPÍTULO 2: Produção de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino por uma linhagem industrial de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*.

Alexandre Libanio Silva Reis¹, Emmanuel Dutra Damilano², Rômulo Simões Cezar Menezes² e Marcos Antônio de Moraes Jr^{1,3,4*}

¹Laboratório de bioprocessos, CETENE. 50740-540 Recife, PE, Brasil.

²Grupo de Pesquisas em Energia de Biomassa, Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco.

³Núcleo Interdepartamental de Engenharia Metabólica

⁴Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. 50670-901 Recife, PE, Brasil.

*Autor para correspondência:

Alexandre Libanio Silva Reis

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE MCTI/NE

Av. Prof. Luiz Freire, 01 – Cidade Universitária – CEP: 50740-540, Recife, Pernambuco

E-mail: libanio.reis@gmail.com

Fone: 55-81-3334-7262

Fax: 55-81-3334-7200

Trabalho submetido para publicação como “Second Generation Ethanol production from Sugar Cane and Sweet Sorghum Bagasses by industrial yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*”, como artigo original para o jornal Biotechnology Letters, ELSEVIER.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino por *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, linhagem GDB 248, após pré-tratamento brando com H₂O₂ em meio alcalino e hidrólise enzimática com celulasas. Os ensaios foram conduzidos em duplicata delineados inteiramente ao acaso e os resultados indicaram que o uso do H₂O₂ em meio alcalino combinado com hidrólise enzimática dos bagaços produziu hidrolisados com teores de açúcares redutores $19,71 \pm 0,6$ e $14,87 \pm 0,1$ g.L⁻¹ e glicose $11,5 \pm 0,3$ e $9,57 \pm 0,2$ g.L⁻¹. Análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier combinadas com microscopia eletrônica de varredura e difração de raios x confirmaram modificações na estrutura dos bagaços após o pré-tratamento. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em duplicata utilizando uma linhagem GDB 248 de *D. bruxellensis*. Foi observado o consumo de celobiose presente nesses hidrolisados, além da glicose também presente. O rendimento de etanol no final da fermentação foi de $0,42 \pm 0,04$ g.g⁻¹ para cana e $0,44 \pm 0,03$ g.g⁻¹ para sorgo. *D. bruxellensis* tem sido reportada como uma levedura capaz de hidrolisar a celobiose para a produção de etanol, portanto se apresenta como um microrganismo promissor em meio industrial para produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: lignocelulose, caracterização de biomassa, bagaço hidrolisado e fermentação de hidrolisados

INTRODUÇÃO

Com o aumento na demanda de biocombustíveis ao nível mundial indicada por um aumento de consumo interno devido ao aumento na produção de veículos “bicombustíveis”, expansão das exportações, no interesse mundial pela mistura do álcool à gasolina e pelos altos preços do petróleo; e pela opção brasileira de utilização da rota etanólica na produção de biodiesel, também cresce a busca de novas fontes de matérias-primas para utilização na área da bioenergia. Dentre elas destacam-se as biomassas lignocelulósicas, compostos de celulose, hemicelulose e lignina que quando hidrolisadas liberam monômeros fermentescíveis e grande parte é considerada como resíduos dos processos agroindustriais. Na Região Nordeste do Brasil, uma importante produtora de etanol no cenário nacional, estima-se que sejam gerados 14 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar (CONAB, 2014) e 4 milhões toneladas de bagaço de sorgo granífero que é utilizado na alimentação animal (IBGE, 2014).

Desenvolver uma tecnologia para a produção de etanol a partir da biomassa, o bagaço e a palha, é um desafio maior do que produzir etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar, isso por que a evolução das plantas no ambiente possibilitou uma composição química da biomassa resistente à ação das enzimas celulolíticas, devido à presença da lignina e hemicelulose associada à fibra celulósica, fonte dos principais açúcares fermentescíveis, que termina por conferir sua cristalinidade e recalcitrância (Ramos, 2003). Muitas técnicas de pré-tratamento dessa biomassa, que terminaria por disponibilizar melhor as fibras celulósicas, têm sido estudadas por muitos anos (Lin e Tanaka, 2006) e geralmente estão agrupados em quatro categorias: físicas, químicas, biológicas ou suas combinações. Os vários métodos diferentes solubilizam componentes da biomassa, gerando vários produtos diferentes, que requerem diferentes estratégias para a hidrólise e fermentação subsequente (Maeda et al., 2011). A escolha do pré-tratamento adequado depende do tipo de biomassa a ser utilizada e também está relacionado com o baixo consumo de energia (temperatura e pressões ambiente) e baixa geração de inibidores de hidrólise e fermentação como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, neste cenário o uso do H₂O₂ em meio alcalino vem ganhando destaque (Saha e Cotta, 2010; Banerjee et al., 2011; Rabelo et al., 2011), pois se caracteriza por apresentar um excelente rendimento de deslignificação.

A hidrólise enzimática da biomassa se configura como o método mais eficaz para os processos fermentativos, pois não gera produtos que inibem o metabolismo das leveduras e produz eficientemente uma mistura de açúcares do tipo hexoses e pentoses e também dissacarídeos, tais como celobiose, quando a preparação enzimática não é suplementada com celobiase (β -glicosidases, EC

3.2.1.21) (Wang et al., 2012). Com isso, a fim de obter um processo viável, sob o ponto de vista de produção de etanol de segunda geração, estudos com microrganismos capazes de fermentar hexoses, além das frações dissacarídicas em condições limítrofes de oxigênio e glicose como *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, vêm sendo apontados como promissores ao cenário industrial (Blomqvist et al., 2011; Tiukova et al., 2013; Reis et al., 2014), devido à notória capacidade de assimilação para estes dissacarídeos e fermentação a etanol trazendo boas perspectivas sob o ponto de vista de produtividade (Galafassi et al., 2011). Embora muitos micro-organismos sejam mencionados na literatura como capazes de assimilar xilose e celobiose como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaromyces nepalensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera/Brettanomyces naardenensis* e *Kluyveromyces cellobivorus*, estas espécies são mais suscetíveis aos estresses alcoólicos e presença de produtos tóxicos a partir dos processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (Santos et al., 2011; Lewis Liu et al., 2012; Long et al., 2012). Neste contexto, a linhagem de *D. bruxellensis* GDB 248 se apresenta como mais adaptada para os processos industriais, até mesmo por que a mesma foi isolada desses ambientes (De Souza Liberal et al., 2005), inclusive sob condições de altas concentrações de etanol (Basso et al., 2008).

Diante desse aspecto tecnológico, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar e sorgo sacarino após pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em meio alcalino e hidrólise enzimática com celulasas e fermentação dos hidrolisados utilizando *D. bruxellensis* GDB 248, fazendo um acompanhamento analítico das ultraestruturas dos respectivos bagaços em cada etapa de pré-tratamento e também analisando o perfil fermentativo dessa levedura em condições de anaerobiose restrita frente a dois tipos de resíduos lignocelulósicos provenientes da indústria sucroalcooleira da região Nordeste do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Biomassa

O bagaço de cana-de-açúcar (BC) utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela usina Japungú Agroindustrial S/A, localizada no estado da Paraíba, Brasil e o bagaço de sorgo sacarino foi oriundo de experimento de avaliação de cultivares para produção de etanol cedido pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Após a moagem, os dois tipos de bagaços foram lavados para extração de açúcares residuais e secos em estufa a 45 °C por 48h. Após a secagem os bagaços

passaram por moagem, individualmente, em moinho de facas tipo Willey e recolhidas as frações que passaram pela malha de 2 mm para os experimentos de pré-tratamento.

2.2. Pré-tratamento

Os dois tipos de bagaço foram submetidos ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (H₂O₂) nas seguintes condições: 10 % (m/v) substrato, 7,5 % H₂O₂ (m/v) e incubação por 1h a 150 rpm à temperatura ambiente. Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer com um volume total de 1000 mL. O pH do meio foi ajustado para 11,5 com solução de NaOH a 5M. Após o término da reação a fração sólida foi recuperada por filtração e lavada com 1,5 L de água destilada aquecida (c. 70°C) até eliminação da coloração com o objetivo de remoção de compostos residuais, especialmente a lignina. Após a lavagem os bagaços pré-tratados foram secos em estufa a 45 °C por 48 h. Nesta etapa foi possível determinar a perda de massa após o pré-tratamento (equação 1)

$$PM (\%) = \frac{Mi - Mf}{Mi} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Onde PM: Perda de massa (%); Mi: massa inicial de bagaço (g); e Mf: massa final de bagaço (g).

2.3. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi conduzida utilizando enzima comercial Celluclast® 1.5L (atividade 45 FPU.mL⁻¹), sem complemento com β-glicosidase, cedida gentilmente pela Novozymes A/S. A estratégia de utilização de uma enzima comercial que não fosse suplementada com β-glicosidase esta pautada no aproveitamento da própria celobiase detectada e metabolizada pela linhagem em estudo (Blomqvist et al., 2011; Reis et al., 2014). Os bagaços foram suspensos em tampão citrato de sódio a 0,05 M pH 4,8 para concentração de 20 g.L⁻¹ e tratado sob agitação 150 rpm à 50 °C por 48 h com a enzima comercial na proporção de 20 FPU.g⁻¹ de biomassa seca⁻¹ (Cao et al., 2012). As hidrólises foram conduzidas em frascos de Erlenmeyers com volume de trabalho de 100 mL e após o término do tempo da ação enzimática, os hidrolisados foram submetidos a um aquecimento de 76°C para desnaturação das enzimas e analisados quanto aos teores de açúcares. Com a determinação dos açúcares foi possível calcular a eficiência de hidrólise enzimática em relação à conversão de celulose em glicose e celobiose (Equação 2).

$$EH (\%) = \frac{C1+C2}{Wxfx1,11} * 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Onde EH: Eficiência de hidrólise enzimática; C1: Concentração de glicose no hidrolisado (g); C2: Concentração de celobiose no hidrolisado(g); W: Concentração de substrato (g); f: Teor de celulose no bagaço (%); e 1,11 como fator de conversão de celulose em glicose.

2.4. Ensaios de Fermentação em Bancada

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em batelada em frascos de Erlenmeyer onde foram adicionados 100 mL de hidrolisado lignocelulósico acrescidos com 2% m/v de células de GDB 248 previamente crescidas em YPD por 7 h. Os frascos foram incubados a 32°C em condição estática e amostras foram coletadas periodicamente a cada hora. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado a 0,22µm e utilizado para análises de metabólitos da fermentação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os parâmetros cinéticos calculados ao final da fermentação foram: produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e eficiência de conversão de açúcares (glicose e celobiose) em etanol (ECA), conforme as equações 3 e 4.

$$Q_p \text{ (g.L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)} = \frac{P}{T} \text{ (Eq. 3)}$$

$$ECA(\%) = \frac{Y_p}{0,51} \times 100 \text{ (Eq. 4)}$$

Onde: P concentração de etanol (g.L⁻¹), T tempo de fermentação (h), $Y_{p/s}$ rendimento de etanol por açúcar consumido e 0,51 rendimento teórico máximo de etanol por cada 1g de glicose.

2.5. Hidrólise e fermentação em biorreator

Um experimento de hidrólise enzimática seguida de fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H₂O₂, nas condições descritas acima, foi realizado em um reator New Brunswick Bioflo 110 de vaso com capacidade nominal de 1L utilizando um volume de trabalho de 0,5L. Todos os estudos foram realizados a uma temperatura de 32°C, controlada por um banho termostático. Não houve injeção de ar, entretanto foi promovida uma pequena agitação a fim de evitar a deposição de células e biomassa celulósica (150rpm), assegurando a esterilidade do sistema com a

instalação de um filtro 0,44µm na saída de gases. As amostras foram coletadas a cada quatro horas, durante 24 (vinte e quatro) horas. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado a 0,22µm e utilizado para análises de metabólitos da fermentação por CLAE. A produtividade volumétrica de etanol e eficiência de conversão (glicose e celobiose) em etanol (ECA) foram calculadas como nas equações 3 e 4.

2.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Com objetivo de estudar as mudanças estruturais dos grupos funcionais presentes, principalmente nos polissacarídeos presentes nas amostras de biomassa lignocelulósica de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e bagaço de sorgo Sacarino (BS) in natura, estas foram pré-tratadas, lavadas e secas a 65 °C até peso constante e posteriormente foram submetidas à análise de espectroscopia FTIR. Os espectros foram coletados em espectrômetro Vertex® 70 (Bruker optics, Alemanha) com resolução de 4cm⁻¹ sendo efetuadas 64 scans por amostra numa faixa de número de ondas de 500 a 4500 cm⁻¹ no modo de atenuação total de refletância (Kataoka e Kondo, 1998).

2.7. Difração de Raios X

Além de análises de modificações de grupos funcionais na estrutura dos bagaços, também foram realizadas determinações de índice de cristalinidade com o objetivo de verificar alterações na cristalinidade da biomassa lignocelulósica. Amostras secas de BC e BS foram submetidas a análises de difração de raios X, utilizando um difratômetro de raios X da marca Bruker modelo D8 Advance, com intervalo angular entre 10° a 50° (ângulo de Bragg - 2θ) passo angular 0,02° e tempo de contagem de 1s. O índice de cristalinidade dos materiais foi calculado segundo a equação (5) proposta por Segal et al. (1962).

$$CrI(\%) = \frac{I_{cristalino} - I_{amorfo}}{I_{cristalino}} \times 100 \text{ (Equação 5).}$$

Onde: CrI: índice de cristalinidade, I_{cristalino}: intensidade no pico do plano cristalino 21°, I_{amorfo}: intensidade no pico amorfo 18,8°.

2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de BC e BS in natura e pré-tratadas foram lavadas e secas a 65 °C até peso constante e foram submetidas à análise de MEV. As amostras foram aderidas em fitas de carbono suportadas em “stubs” de alumínio e metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo FEI Quanta™ 200F com voltagem aplicada de 20KV, utilizando um espectrômetro EDS (espectroscopia por energia dispersiva), a fim de identificar a presença de possíveis elementos que compõem as biomassas in natura e seus respectivos decaimentos na biomassa pré-tratada.

2.9. Métodos analíticos

A caracterização dos bagaços quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram realizadas segundo a metodologia de Van Soest (1963). A atividade de celulase no preparado enzimático comercial foi determinado em papel filtro pelo método padrão recomendado pela IUPAC (Ghose, 1987).

Os açúcares e os metabólitos da fermentação foram determinados por CLAE composto por um sistema Agilent® 120039, um injetor automático, um detector nas faixas de comprimento de onda no infravermelho e ultravioleta e uma coluna de troca catiônica AMINEX HPX-87H (Bio-Rad, USA), precedida de uma pré-coluna micro-Guard (Bio-Rad). A fase móvel usada foi de ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0,6 mL/min. A temperatura do forno foi de 70°C. O volume de amostra injetado foi de 20 µL. Os compostos foram identificados a partir dos seus tempos de retenção relativos e quantificados diretamente a partir de uma curva padrão com diluição seriada. Os valores representam, pelo menos, a média de duas réplicas biológicas.

2.10. Análises estatísticas

Os dados de hidrólise enzimática e fermentação foram analisados utilizando o Software ASSISTAT® (7.6 beta Version) (Silva e Azevedo, 2006) e conduzidos em duplicatas. Os resultados analíticos foram apresentados como média das duplicatas com seus respectivos desvios padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da biomassa lignocelulósica pré-tratada

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa in natura e após o pré-tratamento do BC e BS estão apresentados na tabela 1. O BC e o BS in natura apresentaram 39,21 % e 42,46 % de celulose, 37,86 % e 38 % de hemicelulose e 11,82 % e 4,01 % de lignina detergente ácido, respectivamente. A composição química da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar e do sorgo sacarino varia de acordo com o local de cultivo, cultivar avaliada, idade de colheita da biomassa e com o método de quantificação empregado, mas em média sua composição varia entre 35 a 45 % celulose, 20 a 35% hemicelulose e 3 a 15 % lignina detergente ácido (Martin et al., 2007; Zhao et al., 2009; Han et al., 2012). Após o pré-tratamento com H_2O_2 , os teores de celulose aumentaram para os dois tipos de bagaços enquanto que os teores de hemicelulose e lignina decresceram indicando a solubilização destes componentes. A ordem de grandeza dos constituintes após o pré-tratamento foi celulose maior que a hemicelulose que por sua vez, maior que lignina detergente ácido.

O objetivo do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é desorganizar a matriz orgânica para possibilitar a etapa de hidrólise dos carboidratos. Para os dois tipos de bagaços avaliados neste trabalho o pré-tratamento com H_2O_2 em meio alcalino resultou na perda média de massa em torno de 36%, sem diferença significativa entre os bagaços (Tabela 2). A perda de massa está relacionada com a solubilização de parte da lignina, extrativos, cinzas e frações de carboidratos principalmente proveniente da hemicelulose para a fase líquida da reação. Resultados semelhantes foram observados por Cao et al. (2012) ao comparar 5 tipos de pré-tratamentos para pré-tratar bagaço de sorgo sacarino, dentre eles o H_2O_2 com perda de massa média de 32,25 %.

O pré-tratamento com H_2O_2 é um processo de deslignificação da biomassa lignocelulósica que permite alcançar uma maior eficiência na recuperação de açúcares na etapa de hidrólise enzimática (Karagöz, Rocha et al., 2012) uma vez que a presença de lignina dificulta o acesso das enzimas ao substrato. Foram observadas eficiências de remoção de lignina detergente ácido dos bagaços in natura entre 44,33 % para BC e 78,55 % para BS. Rabelo et al. (2011) ao avaliar o pré-tratamento H_2O_2 em meio alcalino para o bagaço de cana-de-açúcar observou redução de 70% de lignina com uma carga de sólidos no processo menor (4%) do que reportado neste trabalho (10%). Cao et al. (2012) observou 78,84 % de redução de lignina detergente ácido ao pré-tratar biomassa de sorgo sacarino com H_2O_2 (5 % m/v, 24h) em meio alcalino.

Este tipo de pré-tratamento tem eficiência dependente da biomassa avaliada e os resultados apresentaram diferenças significativas para a produção de glicose, açúcares totais e perda de massa após hidrólise enzimática para o BC e BS (Tabela 2). A diferença entre os teores de glicose e açúcares totais para os dois tipos de bagaços podem ser explicadas pela diferença nos teores de celulose após o pré-tratamento com H_2O_2 (Tabela 1) e também na liberação de xilose e celobiose formada, uma vez que a hidrólise enzimática foi conduzida com celulasas comerciais, sem complementação com β -glicosidases, que apresentam baixa atividade de β -glicosidases (Saha e Cotta, 2010). Também pode ser explicado pela maior remoção de lignina observada para o BS, uma vez que a remoção da lignina aumenta a eficiência de hidrólise enzimática pela eliminação de sítios de ligação não produtivos entre lignina e celulasas (Kumar et al., 2009).

A eficiência de hidrólise enzimática, relação entre a celobiose e a glicose liberada no hidrolisado em função da carga de biomassa aplicada na hidrólise, foi de 84,28 % para o BC e 88,07% para o BS (Tabela 2). Resultados de eficiência de hidrólise enzimática para biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar e sorgo sacarino são bastante variáveis na literatura, em função das diferenças de composições químicas, do método de cálculo de eficiência e principalmente pelos diferentes métodos de pré-tratamentos utilizados. Sipos et al. (2009) avaliaram o pré-tratamento com explosão a vapor do bagaço de sorgo sacarino para melhorar a etapa de hidrólise enzimática, com celulasas complementada com β -glicosidase (1,5 L Celluclast adicionada de Novozymes 188) e carga inicial de sólidos 2% m/v e observaram valores de conversão glicose entre 85 a 90%. Chandel et al. (2013) estudaram o pré-tratamento com ácido oxálico do bagaço de cana-de-açúcar em condições de hidrólise enzimática com Celluclast 1,5 L e Novozymes 188 com carga de 20 FPU. g de biomassa⁻¹ e 30 UI. g de biomassa⁻¹ e observaram eficiência 66,51 % expresso em termos de açúcares redutores pelo total de carboidratos.

Tabela 1 – Teores de celulose, hemicelulose e lignina em detergente ácido no bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sorgo sacarino in natura e após o pré-tratamento (base seca).

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	LDA (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
BC ¹	39,21 ± 1,1	37,86 ± 0,1	11,82 ± 1,5	4,92 ± 0,3	5,37 ± 0,2
BS	42,46 ± 0,5	38 ± 0,6	4,01 ± 0,2	1,09 ± 0,07	11,72 ± 1,2
Média	40,84	37,93	7,91		
Após pré-tratamento H ₂ O ₂					
	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	LDA (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
BC	56,13 ± 0,3	30,20 ± 2,4	6,58 ± 0,7	ND	ND
BS	67,13 ± 0,5	25,92 ± 0,1	0,86 ± 0,1	ND	ND
Média	61,63	28,06	3,72	ND	ND

¹BC: bagaço de cana, BS: bagaço de sorgo sacarino; LDA: lignina detergente ácido; ND: não determinado.

Tabela 2 – Perda de massa durante o pré-tratamento com H₂O₂ e teores de açúcares e perda de massa após a hidrólise enzimática (48h) da biomassa de BC e BS.

Biomassa	PM*(%)	AT (g/L)	Glicose (g/L)	PM** (%)	EH (%)
BC ¹	35,85 ± 0,8	14,49 ± 0,1	9,57 ± 0,2	68,05 ± 0,4	84,28 ± 1,14
BS	36,45 ± 1,5	18,07 ± 0,4	11,5 ± 0,3	79,06 ± 0,9	88,07 ± 1,6
Média geral	36,15	17,32	9,45	73,55	86,18
CV (%)	3,28	2,39	3,65	0,97	

¹BC: bagaço de cana, BS: bagaço de sorgo sacarino; *PM: perda de massa pré-tratamento; AT: Açúcares totais (Celobiose + xilose + glicose). **PM: perda de massa hidrólise enzimática.

3.2. Análise de deslignificação dos bagaços por FTIR, Difração de Raios X e MEV/EDS

Além das avaliações de perda de massa e composição química após o pré-tratamento, ferramentas de análise estrutural da biomassa são importantes para corroborar mudanças na fração lignocelulósica (Chandel et al., 2013). Os resultados de FTIR, apesar de serem usados mais como uma ferramenta de comparação qualitativa, determinaram as mudanças nas estruturas químicas dos polissacarídeos presentes na superfície das biomassas lignocelulósicas pré-tratadas H₂O₂ em meio alcalino para as amostras de BS e BC como estão ilustradas nas figuras 1A e 1B.

Os picos em 1242,07 (BC) e 1244,83 (BS) cm⁻¹ encontram-se no intervalo onde ocorre o alongamento da ligação C-O, que é uma característica da hemicelulose e lignina e demonstraram diminuição nos bagaços que sofreram o tratamento com H₂O₂ alcalino confirmando assim a solubilização de frações de lignina e hemicelulose. Também foram observados decréscimos das bandas 1730,16 (BC) e 1730,64 (BS) cm⁻¹ presentes nos materiais in natura, sendo estas bandas relacionada a alongamento não conjugados de C=O presentes em hemicelulose como também em

lignina (Chandel et al., 2013). Além disso, os picos em 1510,20 e 1514,75 cm^{-1} estão relacionados com vibrações de anéis aromáticos em ligninas (1500 - 1550 cm^{-1}) e revela que o material deslignificado sofreu rupturas das ligações de lignina. Resultados semelhantes foram observados por Rezende et al. (2011) com bagaço de cana-de-açúcar.

A principal estratégia para alcançar aumentos significativos na conversão enzimática é a diminuição da cristalinidade da celulose dos resíduos lignocelulósicos (Chandel et al., 2013). Neste sentido análises de DRX para o BC (Figura 2A) e BS (Figura 2B) apresentaram valores de 34% e 33,8 % para os bagaços in natura, respectivamente. Após a etapa de pré-tratamento foram verificados aumentos significativos no IC para os dois bagaços para valores de 47,6% e 47,5%. Aumentos nos IC estão relacionados com a remoção de frações amorfas de hemicelulose e outros constituintes. Resultados semelhantes foram observados por Chandel et al. (2013) que verificaram aumento no IC de 45,61 % para 52,56 % para o bagaço de cana-de-açúcar quando submetido ao pré-tratamento com expansão de fibras com ácido oxálico. No entanto, é importante mencionar que o índice de cristalinidade deve ser corrigido pela eficiência da etapa de pré-tratamento, pois representa de forma mais real o índice de cristalinidade do material. Assim quando corrigidos os valores de IC para os dois tipos de bagaços (17,1% para BC e 17,3% para BS) é observado uma diminuição do IC para os dois bagaços o que corrobora a melhora na eficiência de conversão enzimática dos bagaços pré-tratados.

Ainda sobre o estudo das mudanças na ultraestrutura dos bagaços de cana e sorgo sacarino, os resultados de microscopia eletrônica de varredura reforçaram a ação do pré-tratamento por oxidação via radicais de decomposição do H_2O_2 em meio alcalino demonstrando alterações na extensão das fibras celulósicas e consequentemente em sua exposição, devido à remoção das frações de lignina e diminuição da sua recalcitrância. Isto pode ser percebido nas diferenças entre os bagaços “in natura” (Figura 3 A e C) e os pré-tratados (Figura 3 B e D). É importante notar a presença de microespaços no bagaço de cana pré-tratado (Figura 3B) em maior quantidade que o bagaço de sorgo. Sugere-se que esses “microvazios” aparecem devido à ação deslignificante do peróxido de hidrogênio, que varia de acordo com o teor de lignina de cada material lignocelulósico e que como mostrado acima, o bagaço de cana apresenta um maior teor de lignina (Tabela 1). Para a modalidade EDS (espectroscopia de energia dispersiva), tanto o bagaço de cana quanto o bagaço de sorgo apresentaram em sua estrutura “in natura” um espectro muito intenso de silício (dados não mostrados), confirmando a presença de cinzas. Já nos bagaços pré-tratados esses espectros não aparecem mais, colaborando para a eficiência da metodologia como adequada aos processos fermentativos.

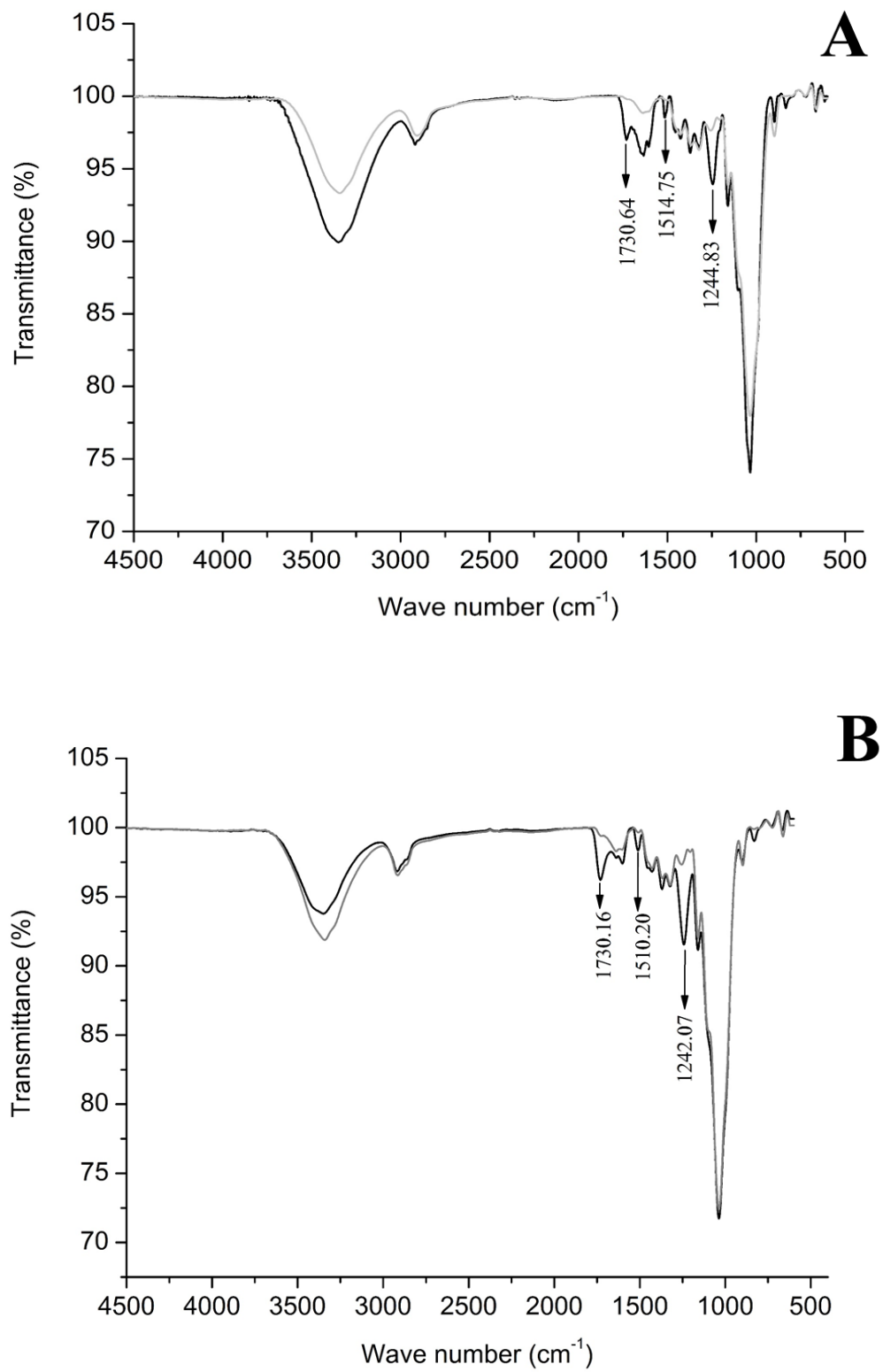


Figura 1. Espectros de FTIR para amostras de bagaço de cana-de-açúcar (A) e sorgo sacarino (B) pré-tratadas com H₂O₂ 7,5% m/v, pH 11,5, 10% sólido-líquido, 25 °C, 1h, 150 rpm.

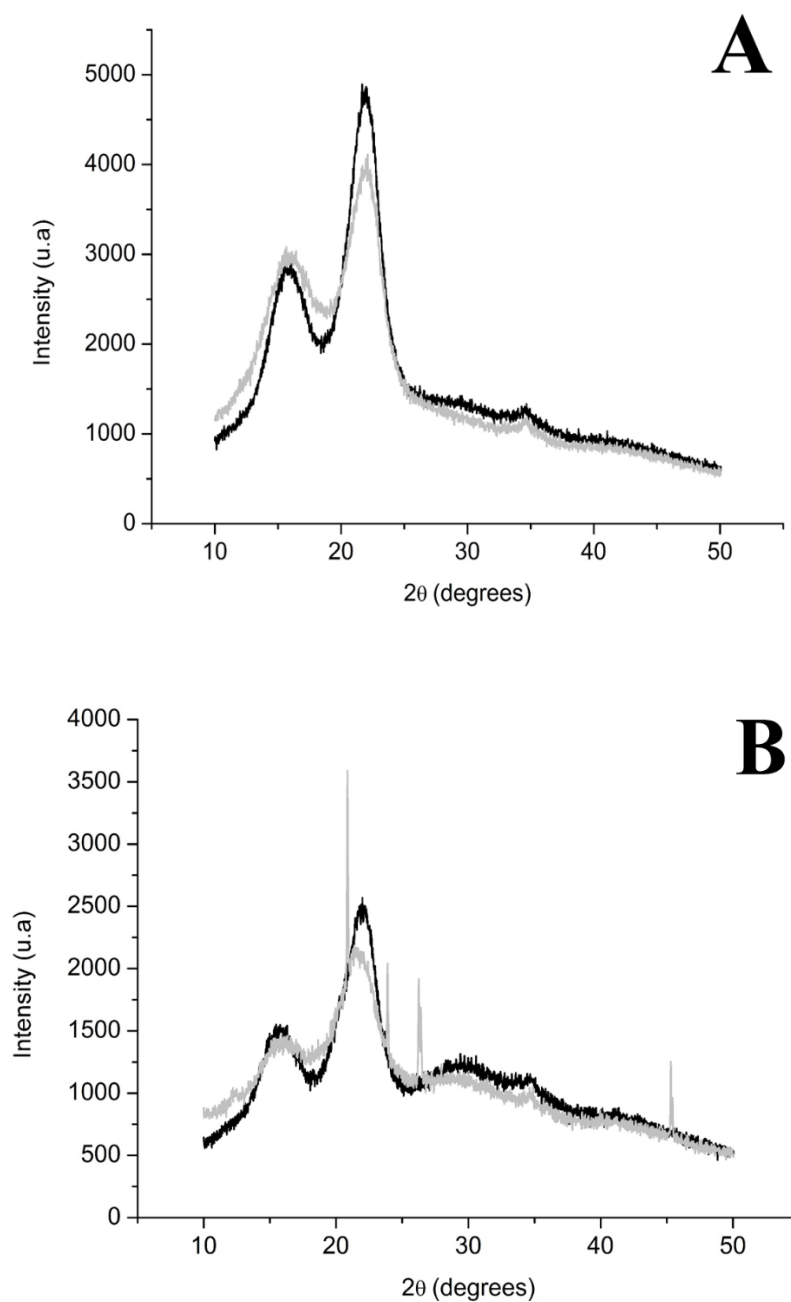


Figura 2. (A) Espectros de difração de raios – X para amostras de bagaço de sorgo in natura, linha cinza no espectro e na linha preta a biomassa de sorgo pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino 7.5% (m/v), pH 11.5, 10% líquido-sólido, 25 ° C, 1h, 150 rpm em agitador orbital tipo “shaker”. Em (B) representação gráfica semelhante do bagaço de cana-de-açúcar, sob as mesmas condições de pré-tratamento.

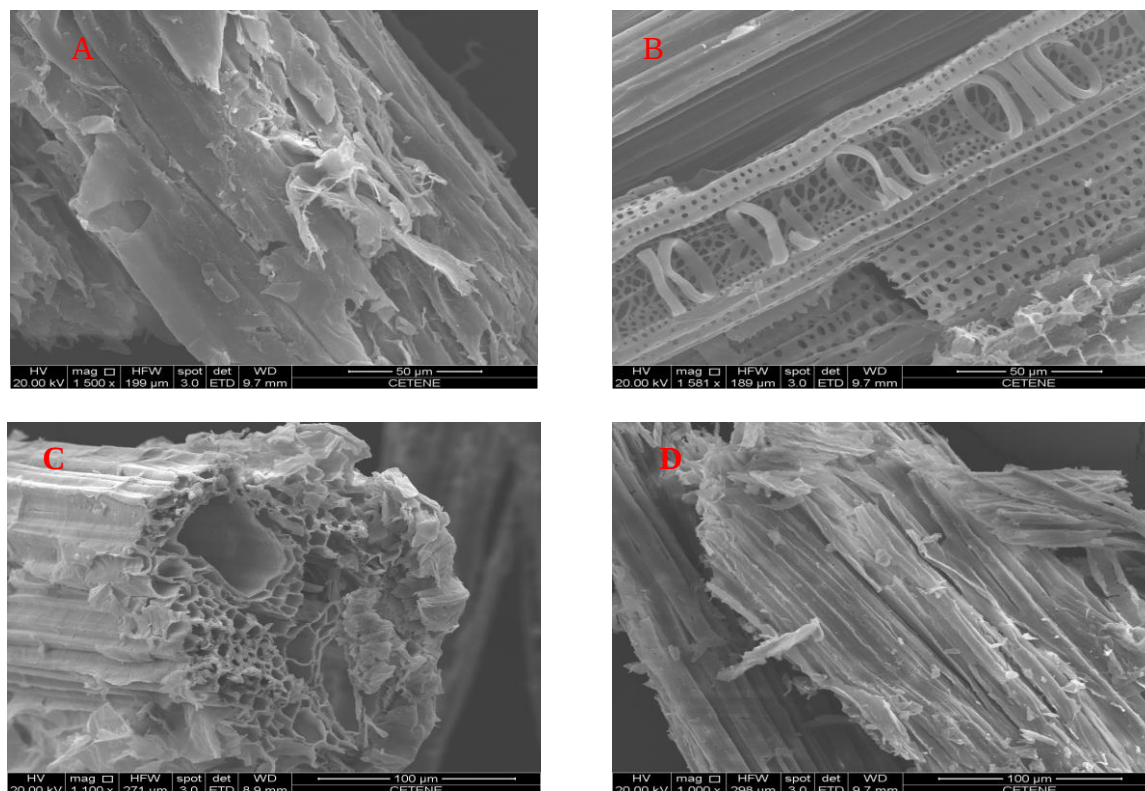


Figura 3. Imagens de MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar in natura (A) e após pré-tratamento (B) e sorgo sacarino in natura (C) e após pré-tratamento (D). Pré-tratamento com H₂O₂ 7,5% v/v, pH 11,5, 10% sólido-líquido, 25 °C, 1h, 150 rpm.

3.2. Fermentação dos hidrolisados por *D. bruxellensis*

A fermentação de hidrolisados de biomassa geralmente acarreta em baixas concentrações de etanol no meio, uma vez que os teores iniciais de biomassa pré-tratada submetida à hidrólise são baixos, mesmo maximizando a eficiência da hidrólise enzimática. De uma forma geral não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros cinéticos durante a fermentação dos hidrolisados de BC e BS, com exceção dos açúcares consumidos (glicose e celobiose) (Tabela 3). Em média 94,08 % dos açúcares fermentescíveis foram consumidos por *D.bruxellensis* em um tempo de 7h com eficiência média de conversão dos açúcares em etanol de 84,41% o que indica boa fermentabilidade dos hidrolisados (Tabela 3). Apesar de apresentar rendimentos ainda inferiores às linhagens de *S. cerevisiae*, GDB 248 exibiu uma melhor desempenho fermentativo, frente à conversão dos hidrolisados de bagaços de cana-de-açúcar e sorgo sacarino e em termos de produtividade etanólica, em comparação com experimentos realizados por Blomqvist (2010) empregandoas linhagens CBS 11269, CBS 11270 e CBS 74, utilizando meios sintéticos contendo glicose e celobiose em concentrações equivalentes às encontradas nos hidrolisados desta pesquisa. South et al. (2010)

utilizando hidrolisados de serragem de faia (*Fagus sp*) pré-tratado hidrotermicamente com explosão à vapor, também obteve valores de rendimento (0,45 em média para seus hidrolisados) inferiores ao obtido nesse estudo utilizando CBS 11269. Sugere-se que esses baixos rendimentos estejam relacionados à baixa produção de açúcares metabolizáveis por *D. bruxellensis* nos estudos citados.

Além dos parâmetros cinéticos finais, também foram comparados os perfis cinéticos de fermentação dos hidrolisados de BC e BS, partido de concentrações iniciais diferentes de glicose (9,57 g.L⁻¹ para o hidrolisado de BC e 11,5 g.L⁻¹ para o hidrolisado de BS) e celobiose (0,81 g.L⁻¹ para o hidrolisado de BC e 1,62 g.L⁻¹ para o hidrolisado de BS), principais sacarídeos a serem metabolizados por *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. Os dois meios não foram suplementados com nitrogênio, a fim de avaliar sua capacidade fermentativa e simulando ao máximo uma condição industrial.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos para a fermentação dos hidrolisados da biomassa de BC e BS por *D. bruxellensis* com tempo de 7h.

Hidrolisados	P* (g/L)	Q _p (g/L.h)	ECA (%)	AC (%)
BC ¹	4,20 ± 0,2	0,60 ± 0,1	82,94 ± 2,9	95,65 ± 0,1
BS	5,32 ± 0,8	0,76 ± 0,1	85,88 ± 13	92,50 ± 0,7
Média geral	4,76	0,68	84,41	94,08
CV (%)	11,84	11,84	11,17	0,53

¹BC: bagaço de cana, BS: bagaço de sorgo sacarino; *P: concentração de etanol; Q_p: Produtividade volumétrica de etanol; ECA: eficiência de conversão de açúcares em etanol; AC: açúcares consumido.

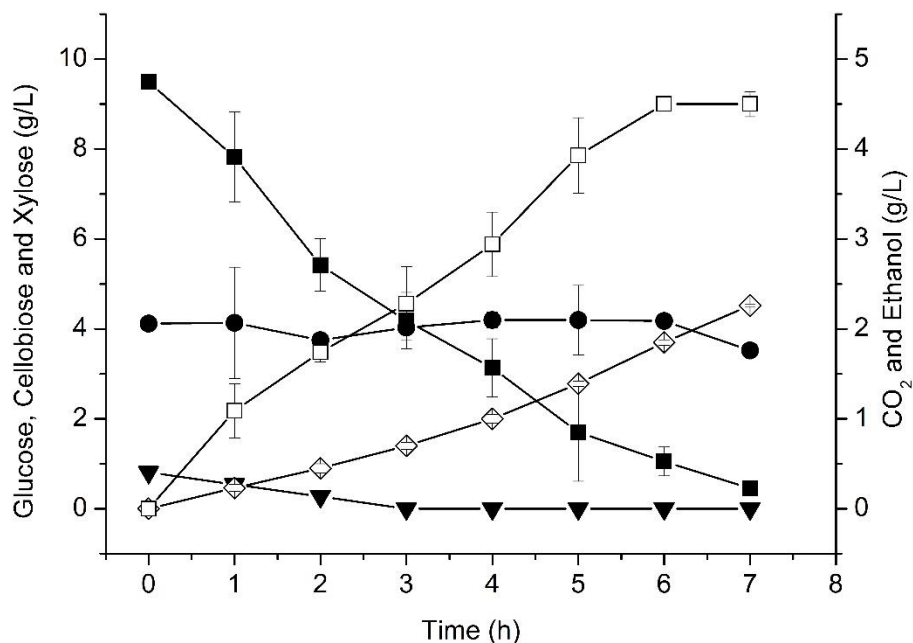


Figura 4. Aspecto fermentativo de *D. bruxellensis* GDB 248 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sem suplementação com nitrogênio. CO₂ (●), Xilose (○), Celobiose (◇), Glicose (■) e Etanol (□). Os valores representam a média de duplicatas.

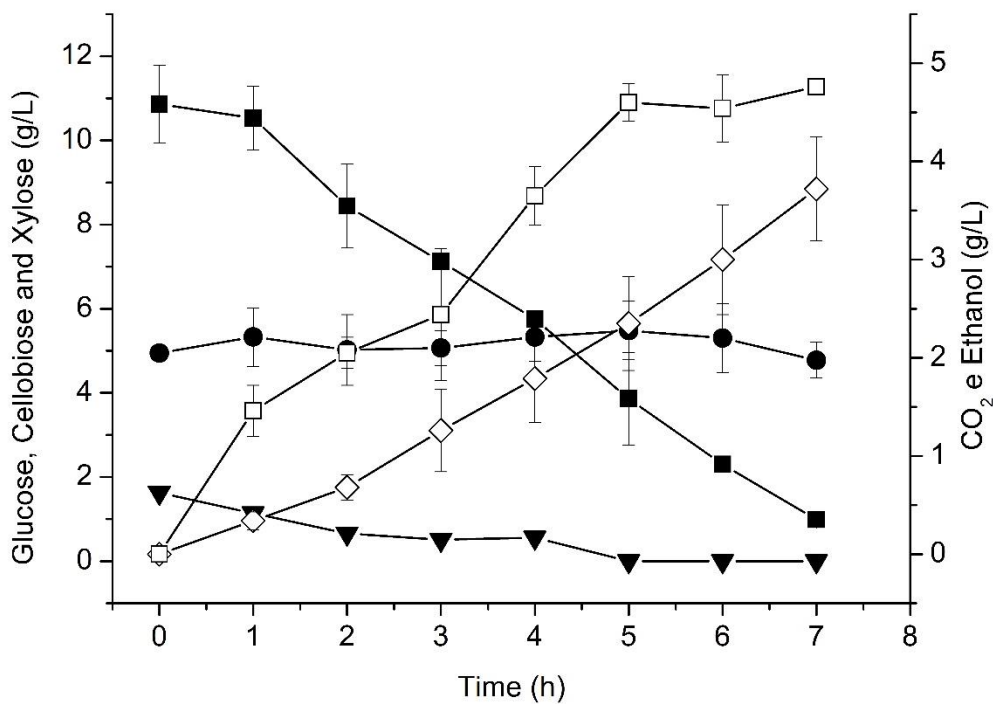


Figura 5. Aspecto fermentativo de *Dekkera bruxellensis* GDB 248 em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino, sem suplementação com nitrogênio. CO₂ (●), Xilose (○), Celobiose (◇), Glicose (■) e Etanol (□). Os valores representam a média de duplicatas.

Na primeira hora foi detectada a produção de etanol (1,09 g/L para o meio com BC e 1,46 g/L para o meio de BS) durante o consumo lento da celobiose e assimilação rápida da glicose, como mostra as Figuras 4 e 5.

Não foi observada a produção significativa de ácido acético, uma característica muito comum em fermentações de açúcares por *D. bruxellensis* em condições de aerobiose restrita. A não suplementação do meio com uma fonte metabolizável de nitrogênio, como descrito por de Barros Pitta (2011) que testou a habilidade do uso de nitrato por *D. bruxellensis* em função da competição ecológica com *Saccharomyces cerevisiae* em ambientes industriais. Os rendimentos de fermentação por *D. bruxellensis* GDB 248 em função do consumo de glicose acumulado com celobiose para o BC e BS foram respectivamente de aproximadamente 65% e 74,4%, baseados na produção de etanol e CO₂.

A partir dos dados obtidos em frascos de Erlenmeyer e tendo como objetivo confirmar a capacidade fermentativa da celobiose por *D. bruxellensis* em seu rendimento em função da produtividade volumétrica de etanol e eficiência de conversão de açúcares (glicose e celobiose) em etanol, foi realizado um “scale-up” em reator de bancada utilizando o BioFlo®110 (volume de 1000mL), New Brunswick Scientific Co., empregando condições semelhantes às aplicadas aos ensaios em frascos, alterando apenas a carga de biomassa lignocelulósica de bagaço de cana-de-açúcar para 4% (m/v), no objetivo de aumentar a quantidade de açúcar fermentescível ao final da hidrólise enzimática. A fermentação foi conduzida por 24h, e os pontos coletados nos tempos 0, 1, 4, 8, 13 e 24h a fim de estabelecer uma cinética de fermentação no reator. O rendimento de fermentação nesse experimento em função do consumo de glicose, inclusive o acumulado da celobiose, e também o sutil consumo de xilose para o BC foi de aproximadamente 63%, baseado na produção de etanol (Figura 6).

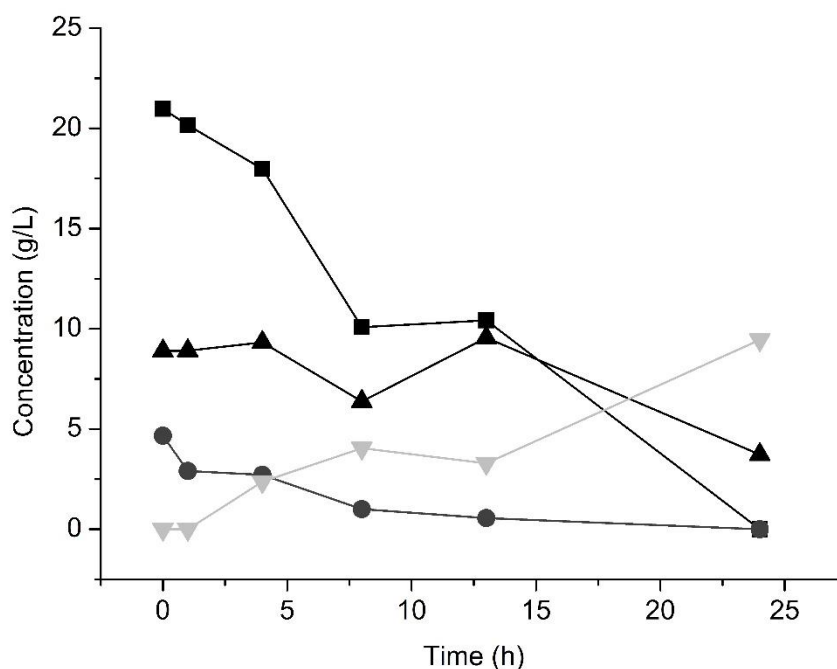


Figura 6. Cinética de fermentação de *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* GDB 248 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de bancada. Os valores representam a média de duplicatas.

4. Conclusões

Os resultados apresentados sustentam a viabilidade técnica da utilização do H_2O_2 em meio alcalino em temperatura ambiente e reduzido tempo de reação para pré-tratar biomassas de alta disponibilidade na Região Nordeste do Brasil. Foi possível obter altas eficiências de hidrólise enzimática utilizando apenas preparações comerciais de celulases, sem complementação com β -glicosidades, o que pode diminuir os custos de processo de hidrólise. Análises de ultraestrutura com técnicas de FT-IR e MEV-EDS corroboraram as análises químicas de caracterização da biomassa que indicaram alterações significativas nas frações de lignina e hemicelulose dos bagaços de cana-de-açúcar e sorgo sacarino.

Do ponto de vista das fermentações, os experimentos realizados confirmaram a capacidade de fermentação da celobiose por *D. bruxellensis* em etanol e que a glicose presente no meio parece não inibir a atividade celobiásica. O resultado do experimento em reator de bancada mostrou um consumo sutil de xilose a partir da décima oitava hora quando praticamente toda a glicose foi consumida (dados não mostrados). Isso pode sugerir uma habilidade, ainda não descrita, dessa linhagem em metabolizar a xilose para sua utilização na via das pentoses fosfato como observado por outras espécies do gênero

como *Brettanomyces naardenensis* CBS 6042, *Brettanomyces claussenii* e *Dekkera intermedia* ATCC 24196 (Skoog e Hahn-Hägerdal, 1988). Como não está descrito na literatura que leveduras fermentam diretamente a xilose, mas a xilulose por uma isomerase associada a uma redutase NADPH dependente, entende-se que esse mecanismo pode estar integrado aos processos de “balanços redox” devido à mudança de pH do meio (Pereira, Bassi et al., 2012).

Sob o contexto da sua utilização em meios industriais, o grande desafio como uma levedura de fermentação adaptada a esse meio é a questão das baixas taxas de conversão devido ao consumo lento das frações de celobiose e possivelmente da xilose. Entretanto, outros estudos moleculares relacionados às vias de assimilação de açúcares e clonagem gênica estão sendo realizados em nosso laboratório a fim de avaliar a sua capacidade em converter eficientemente hidrolisados de bagaço de cana de açúcar e sorgo sacarino em etanol com altos rendimentos industriais.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da Rede de Pesquisas em Bioetanol do Estado de Pernambuco (programa CNPq-FACEPE/PRONEM, concessão nº APQ-1452-2.01/10), pelo programa CNPq-Universal (concessão nº 472106/2012-0) e pela Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil (número SIGTEC PRJ03.33).

Referências Bibliográficas

ARJA, M.-O. Cellulases in the textile industry. In: (Ed.). **Industrial Enzymes**: Springer, 2007. p.51-63. ISBN 1402053762.

BANERJEE, G. et al. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnol Biofuels**, v. 4, p. 16, 2011.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008. ISSN 1567-1364.

BINDER, J. B. et al. Synthesis of furfural from xylose and xylan. **ChemSusChem**, v. 3, n. 11, p. 1268-1272, 2010. ISSN 1864-564X.

BLOMQVIST, J. et al. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010. ISSN 0175-7598.

BLOMQVIST, J. et al. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 1, p. 73-78, 2011. ISSN 1472-765X.

BOLLAG, D. M.; EDELSTEIN, S. J.; ROZYCKI, M. D. **Protein methods**. Wiley-Liss New York, 1996. ISBN 0471118370.

BORGES DE MELO, E.; DA SILVEIRA GOMES, A.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006. ISSN 0040-4020.

BURNQUIST, Heloisa Lee. Porque o Brasil deve apoiar a internacionalização do etanol. Revista Opiniões, 2007.

CAO, W. et al. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource technology**, v. 111, p. 215-221, 2012. ISSN 0960-8524.

CHANDEL, A. K. et al. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013. ISSN 1754-6834.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In: (Ed.). **Biofuels**: Springer, 2007. p.67-93. ISBN 3540736506.

CHANG, V. S.; BURR, B.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of switchgrass. In: (Ed.). **Biotechnology for Fuels and Chemicals**: Springer, 1997. p.3-19. ISBN 1461274974.

CHAROENCHAI, C. et al. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, n. 1, p. 2-8, 1997. ISSN 1755-0238.

CLARKE, A.J.; Bray, M.R.; STRATING, H. 1993. β -Glucosidases, β -Gucanases, and Xylanases: Their Mechanism of Catalysis. In: Esen, A. (Ed.) **β -Glucosidases, Biochemistry and Molecular Biology**. ACS Symposium Series 533, pp. 27-41.

CONAB, C. N. D. A.-. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012-Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, p. Safra 2012/2013, 2014. ISSN 2318-7921. Disponível em: <
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf >. Acesso em: 04 de fevereiro de 2014.

DE BARROS PITA, W. et al. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p. 99-107, 2011. ISSN 0003-6072.

DE SOUZA LIBERAL, A. et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA PCR. **Letters in applied microbiology**, v. 40, n. 1, p. 19-23, 2005. ISSN 1472-765X.

DE SOUZA LIBERAL, A. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007. ISSN 1365-2672.

DE SOUZA LIBERAL, A. T. et al. The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2473-2478, 2012. ISSN 0959-3993.

GALAFASSI, S. et al. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1079-1088, 2011. ISSN 1367-5435.

GERÓS, H.; AZEVEDO, M.-M.; CÁSSIO, F. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, 2000. ISSN 1334-2606.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4980-4991, 2010. ISSN 0960-8524.

GOULD, J. M. Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 6, p. 893-896, 1985. ISSN 1097-0290.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006. ISSN 1367-5931.

HAN, K. J. et al. Ethanol production potential of sweet sorghum assessed using forage fiber analysis procedures. **GCB Bioenergy**, 2012. ISSN 1757-1707.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1207-1218, 2012. ISSN 0734-9750.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HOLTZAPPLE, M. T. et al. The ammonia freeze explosion (AFEX) process. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 59-74, 1991. ISSN 0273-2289.

IBGE, I. B. D. G. A. E. E.-. Produção Agrícola Municipal - Culturas Temporárias e Permanentes. Rio de Janeiro, 2011. ISSN 0101-3963. Acesso em: 05 de fevereiro de 2014.

INGLIN, M.; FEINBERG, B. A.; LOEWENBERG, J. R. Partial purification and characterization of a new intracellular beta-glucosidase of *Trichoderma reesei*. **Biochem. J.**, v. 185, p. 515-519, 1980.

KARAGÖZ, P. et al. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. **Bioresource technology**, v. 104, p. 349-357, 2012. ISSN 0960-8524.

KATAOKA, Y.; KONDO, T. FT-IR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation. **Macromolecules**, v. 31, n. 3, p. 760-764, 1998. ISSN 0024-9297.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009. ISSN 0888-5885.

LEE, Y.; IYER, P.; TORGET, R. W. Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. In: (Ed.). **Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics**: Springer, 1999. p.93-115. ISBN 3540655778.

LEITE, F. C. B. et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 2013. ISSN 1567-1364.

LEWIS LIU, Z. et al. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 410-416, 2012. ISSN 0960-8524.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006. ISSN 0175-7598.

LONG, T. M. et al. Cofermentation of Glucose, Xylose, and Cellobiose by the Beetle-Associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012. ISSN 0099-2240.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002. ISSN 1092-2172.

MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011. ISSN 1359-5113.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 3, p. 426-432, 2007. ISSN 0141-0229.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. ACS symposium series, 1994, ACS Publications. p.292-324.

MESSNER, R. et al. Cellobiohydrolase II is the main conidial-bound cellulase in *Trichoderma reesei* and other *Trichoderma* strains. **Archives of microbiology**, v. 155, n. 6, p. 601-606, 1991. ISSN 0302-8933.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 0003-2700.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005. ISSN 0960-8524.

NREL, N. R. E. L.-. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Contract**, v. 303, p. 275-3000, 2011. **Opinões [sobre o setor sucroenergético]**, p. 2, Jan-Mar 2007 2007.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007. ISSN 0099-2240.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P.; SANTA ANNA, L. M. M. Series on biotechnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on biotechnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**, 2008.

PEREIRA, L. F. et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012. ISSN 0003-6072.

QI, B. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 15, p. 7346-7353, 2009. ISSN 0888-5885.

RABELO, S. et al. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource technology**, v. 102, n. 17, p. 7887-7895, 2011. ISSN 0960-8524.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003. ISSN 0100-4042.

REIS, A. L. et al. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 38, 2014. ISSN 2193-1801.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2011. ISSN 1754-6834.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol. **New biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 10-16, 2010. ISSN 1871-6784.

SANTOS, R. O. et al. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 635-642, 2011. ISSN 0003-6072.

SCHEFFERS, W. Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 45, n. 1, p. 150-150, 1979. ISSN 0003-6072.

SEGAL, L.; et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, Princeton, 29(10):786-794, 1962

SEIBOTH, B. et al. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5318-5320, 1997. ISSN 0021-9193.

SILVA, F. D. A. E.; AZEVEDO, C. D. A new version of the assistat-statistical assistance software. World Congress on computers in agriculture, 2006, American Society of Agricultural Engineers Orlando. p.393-396.

SIPOS, B. et al. Sweet sorghum as feedstock for ethanol production: enzymatic hydrolysis of steam-pretreated bagasse. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 153, n. 1-3, p. 151-162, 2009. ISSN 0273-2289.

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and microbial technology**, v. 10, n. 2, p. 66-80, 1988. ISSN 0141-0229.

SOUTH, E. Fermentation of lignocellulosic material by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. 2010. ISSN 1101-8151.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002. ISSN 0960-8524.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 305-311, 2001. ISSN 1389-1723.

TIUKOVA, I. A. et al. Transcriptome of the Alternative Ethanol Production Strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in Sugar Limited, Low Oxygen Cultivation. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58455, 2013. ISSN 1932-6203.

TORRES, R. R. N. B. 2012. Análise do gene codificante da enzima beta-glicosidase na levedura *Dekkera bruxellensis*. **Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética**, Centro de Ciências Biológicas. 73p.

VAN DER WALT, J. Dekkera, a new genus of the Saccharomycetaceae. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 30, n. 1, p. 273-280, 1964. ISSN 0003-6072.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS microbiology letters**, v. 32, n. 3-4, p. 199-224, 1986. ISSN 0378-1097.

VAN SOEST, P. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. **Journal of animal Science**, v. 26, n. 1, p. 119-128, 1967. ISSN 0021-8812.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in analysis of fibrous feeds: a rapid method for the determination of fiber and lignin. **J. Assoc. Off. Agric. Chem**, v. 46, p. 829-835, 1963.

WANG, W. et al. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water. **Bioresource technology**, v. 108, p. 252-257, 2012. ISSN 0960-8524.

WIJSMAN, M. R. et al. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, n. 2, p. 183-192, 1984. ISSN 0003-6072.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, n. 1, p. 189-226, 1999. ISSN 1056-3466.

YAHARA, G. A. et al. Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 30, n. 6, p. 389-395, 2007. ISSN 1615-7591.

YAMASHITA, Y. et al. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 914-920, 2010. ISSN 0144-8617.

YOSHIDA, E. et al. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 beta-glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Biochem. J**, v. 431, p. 39-49, 2010.

ZHAO, Y. et al. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 47, n. 1, p. 18-24, 2004. ISSN 1006-9305.

ZHAO, Y. L. et al. Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel. **Field Crops Research**, v. 111, n. 1, p. 55-64, 2009. ISSN 0378-4290.

ANEXOS

RESEARCH

Open Access

Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain

Alexandre Libanio Silva Reis^{1,5*}, Raquel de Fátima Rodrigues de Souza², Rochane Regina Neves Baptista Torres², Fernanda Cristina Bezerra Leite², Patrícia Maria Guedes Paiva³, Esteban Espinosa Vidal¹ and Marcos Antonio de Moraes Jr^{1,2,3,4}

Abstract

The discovery of a novel yeast with a natural capacity to produce ethanol from lignocellulosic substrates (second-generation ethanol) is of great significance for bioethanol technology. While there are some yeast strains capable of assimilating cellobiose in aerobic laboratory conditions, the predominant sugar in the treatment of lignocellulosic material, little is known about this ability in real industrial conditions. Fermentations designed to simulate industrial conditions were conducted in synthetic medium with glucose, sucrose, cellobiose and hydrolyzed pre-treated cane bagasse as a different carbon source, with the aim of further characterizing the fermentation capacity of a promising *Dekkera bruxellensis* yeast strain, isolated from the bioethanol process in Brazil. As a result, it was found (for the first time in oxygen-limiting conditions) that the strain *Dekkera bruxellensis* GDB 248 could produce ethanol from cellobiose. Moreover, it was corroborated that the cellobiase activity characterizes the enzyme candidate in semi-purified extracts (β -glucosidase). In addition, it was demonstrated that GDB 248 strain had the capacity to produce a higher acetic acid concentration than ethanol and glycerol, which confirms the absence of the Custer effect with this strain in oxygen-limiting conditions. Moreover, it is also being suggested that *D. bruxellensis* could benefit *Saccharomyces cerevisiae* and outcompete it in the industrial environment. In this way, it was confirmed that *D. bruxellensis* GDB 248 has the potential to produce ethanol from cellobiose, and is a promising strain for the fermentation of lignocellulosic substrates.

Keywords: BGL gene; β -glucosidase; Hydrolyzed bagasse; Lignocellulose

Introduction

Recently, it has been demonstrated that the yeast *Dekkera bruxellensis* has the potential to ferment sucrose from sugarcane juice (Pereira et al. 2012; Leite et al. 2013). As well as being suitable for industrial production (de Souza Liberal et al. 2007), this yeast is a microorganism that can be used for ethanol fuel production. In addition, another useful characteristic is the ability to assimilate cellobiose, a disaccharide produced by the incomplete hydrolysis of cellulose. This capacity is of great importance in ethanol production from bagasse hydrolysates, where the waste

material resources that are used, are inaccessible to the fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Blomqvist et al. 2011). Cellobiose fermentation has been shown in *D. bruxellensis*, however, this feature is not present in all strains of this species (Blondin et al. 1982; Spindler et al. 1992; Blomqvist et al. 2010; Galafassi et al. 2011).

Two further well-documented features of *D. bruxellensis* are its ability to produce acetic acid from glucose, although only under aerobiosis conditions (Leite et al. 2013), and the Custer effect, the temporary inhibition of fermentation under anaerobic conditions (Wijsman et al. 1984; Scheffers 1979). In previous studies it has been suggested that *D. bruxellensis* is not able to produce glycerol (Gerós et al. 2000; Wijsman et al. 1984). However, we and others demonstrated that small amounts of glycerol are produced by this yeast (Pereira et al. 2012; Leite et al. 2013). In general, yeasts produce glycerol to redress the

* Correspondence: libanio.reis@gmail.com

¹Bioprocessing Laboratory, CETENE, 50740-540 Recife, PE, Brazil

⁵Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz Freire, 01 - Cidade Universitária, 50740-540 Recife, PE, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

imbalance in redox potential, in anaerobic or oxygen-limiting growth conditions (van Dijken and Scheffers 1986).

In a previous study, we showed that *D. bruxellensis* strain GDB 248 is able to assimilate cellobiose when oxygen is supplied by flask agitation (Leite et al. 2013). In a continuation of this work, we are now showing that this *D. bruxellensis* strain GDB 248 can also ferment cellobiose under oxygen-limiting conditions and show the identification and partial characterization of the cellobiose activity (β -glucosidase, EC 3.2.1.21) and its encoding gene. There is also a discussion of the advantages and constraints of the biotechnological use of this yeast for second-generation ethanol production.

Methods

Yeast strain

Dekkera bruxellensis strain GDB 248 which is used in this study, is a wild strain isolated from the bioethanol industrial process (de Souza Liberal et al. 2005). Colonies of the strain were maintained by successive pitching in YPD agar plates.

Bagasse hydrolysis

Steam-exploded sugarcane bagasse was suspended in 100 mM Tris-Acetate pH 4.5 buffer to 20 g/L and treated with Fibrenzyme™ LWT commercial preparation (Dyadic International Inc., Jupiter, USA), with 40 FPU/g of enzyme preparation for each 2% w/v of bagasse, at 50°C for 72 h with gentle agitation. The hydrolysate was centrifuged at $1,200 \times g$ for 5 minutes and the liquid part was used for fermentation assays. The total sugar composition was evaluated by HPLC (as described below).

Cultivations assays

Cells were pre-grown in liquid YPD at 30°C and 150 rpm for 24 h. Then, the yeasts were centrifuged at $4,500 \times g$ for 10 min, and used for inoculation in the next stage. Industrial-like fermentations were performed with 10% (w/v) yeast biomass, in synthetic complete YNB medium (1.7 g/L) containing sucrose (25 g/L) (SMsuc), cellobiose (SMcello) (20.5 g/L) or a mixture of cellobiose and glucose (SMcello/glu) (10 g/L each), as well as in hydrolysed sugar cane bagasse (SMBag) (4.45 g/L cellobiose, 9.43 g/L glucose, 8.15 g/L xylose) at 30°C for different periods. Gentle agitation at 120 rpm was carried out to avoid cell sedimentation.

Protein extract and cellobiose (β -glucosidase) activity

Yeast cells were cultivated in complete synthetic medium (1.7 g/L YNB) containing cellobiose at 1 g/L until 0.6 A_{600nm} and diluted 1/1000 to 250 mL fresh synthetic medium containing glucose, cellobiose or sucrose at 1.0 g/L. The flasks were incubated for 24 h at 33°C and

130 rpm in an orbital shaker. Afterwards, the cells were collected by centrifugation, re-suspended in 250 mL corresponding medium and cultivated (as described above). This process was repeated four times and after the last cycle, the final cell density was determined (Leite et al. 2013). All the cells were collected by centrifugation at $3,800 \times g$ and 4°C for 30 min. The cell pellet was re-suspended in two volumes of 10 mM Acetate buffer pH 4 containing 1 mM β -mercaptoethanol and lysed by maceration in liquid nitrogen. The lysates were centrifuged at $21,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C and the supernatant was recovered. Protein concentration was determined by the Comassie® Blue method. The enzyme reaction was performed by mixing 100 μ g of protein from a cell-free extract and sugar solution diluted in 100 mM sodium citrate buffer pH 4.8 for a final volume of one mL. The reaction was incubated for 10 min at 37°C and stopped by transferring the tubes to an ice bath. The release of glucose was measured with the aid of a glucose oxidase kit (LabLabor, Brazil). The specific activity was recorded as μ mol of glucose released per minute from the amount of protein in one gram of yeast cells. When testing the presence of extracellular enzymes, supernatants of the cultures for sucrose or cellobiose were used for enzyme reactions.

Cellobiose (β -glucosidase) purification

To obtain the protein extracts, yeast cells were grown in complete synthetic medium with cellobiose as a carbon source, lysed and subjected to fractioning in ammonium sulfate from 0% to 60% saturation. The precipitate was re-suspended in 100 mM sodium citrate buffer pH 5 and then dialyzed against deionized water for desalting protein fractions (Bollag et al. 1996). The protein fractions were tested for β -glucosidase activity using the chromogenic substrate p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG). The fractions that showed enzyme activity were pooled (fraction EF1) and subjected to molecular exclusion chromatography in Sephadex® G75 (26 mm diameter, 10 cm height columns equilibrated with 100 mM citrate-phosphate buffer pH 5 at 6 mL/h). The fractions eluted containing β -glucosidase activity were pooled and subjected to ion exchange chromatography in CM-cellulose (15 mm diameter, 10 cm height columns equilibrated with 10 mM citrate-phosphate buffer pH 3.8 at 10 mL/h). Proteins linked to the matrix were eluted with 0.5 M NaCl solution at 10 mL/h flux and the fractions containing β -glucosidase activity were again pooled (fraction EF2). The purity of the proteins was checked by standard SDS-PAGE electrophoresis in 12% acrylamide gel. Isoelectrofocusing was performed to determine the isoelectric point of the protein. Immobilized pH Gradient (IPG) strips with pH ranging from 3 to 10 were equilibrated for 30 min with solution containing 6.5 mM DTT and 134 mM IAA and the protein was submitted to an electrophoretic run

at 200 V (2 mA) for two hours followed by 3,500 V (2 mA) for 1.25 h. The strips were used for a second dimension run in 12% acrylamide gel and revealed by Coomassie® Blue staining.

Enzyme kinetic assays

Substrate specificity for disaccharides was determined (as described above). The kinetic profile of the EF2 fraction was evaluated using pNPG as substrate. Standard reactions used a volume of enzyme fractions containing 100 µg protein, an equal volume of 10 mM pNPG solution and 100 mM sodium citrate buffer pH 4.8 to one ml final volume. The reaction was incubated at 37°C for 10 minutes and stopped by adding 100 µL of 1 M sodium bicarbonate solution and the yellow color of pNP release was quantified at 410 nm. A standard curve was prepared with pNP to correlate the absorbance with the amount of the product released and the specific activity was calculated as the amount of enzyme that released one µmol pNP per minute per milligram of protein in the sample. Optimum pH was evaluated by using citrate-phosphate buffer adjusted for different pHs and the reactions were incubated at 30°C for 10 minutes. When testing the optimum temperature of cellobiase activity, the pH was adjusted to 4.0 and the reactions were incubated at different temperatures for 10 minutes. Thermal stability of the enzyme was analyzed by incubation with EF2 fraction for 10 minutes at temperatures ranging from 20°C to 60°C. Afterwards, the enzyme preparation was left at room temperature (ca. 25°C) for 10 min and then used for enzyme activity using pNPG at optimum pH and temperature. The maximum conversion rate (V_{max}) and affinity constant (K_M) were calculated from Lineweaver-Burk plot by varying pNPG concentration in the reactions, and were used to calculate the catalytic constant (K_{cat}) of the partially purified enzyme. Inhibitory activity was measured by adding disaccharides or pNPGal at 10 mM in reactions containing pNPG and expressed as the percentage of pNPG cleavage. All these measurements were performed at the optimum pH and temperature.

Analysis of sugars and the main metabolic products

The concentration of ethanol, acetate, sucrose, glucose and cellobiose in the fermentation samples was determined by HPLC which comprises an Agilent 120039 system, an automatic injector, an infrared and UV detector and an AMINEX HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad, USA), preceded by a micro-Guard pre-column (Bio-Rad). The mobile phase used was sulfuric acid 5 mM at a flow rate of 0.6 ml/min. The oven temperature was 70°C. The sample injected was 20 µL. The compounds were identified by their relative retention times and quantified by direct comparison with a serial dilution and

standard curve. The value represents the average of at least two biological replicates.

Gene identification and *in silico* analysis

Searches through the keywords hydrolase, amylase, glucosidase and amyloglucosidase were performed in the *D. bruxellensis* Genomic Database (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/dekkera/>) and the nucleotide sequences of the retrieved contigs were used for BLASTx analysis at GenBank. The *D. bruxellensis* contig which has a greater similarity to β -glucosidase encoding genes, was recovered and the ORF determined by the ORF Finder tool at NCBI. The partial sequence of the β -glucosidase protein was used for BLASTp analysis in the *D. bruxellensis* genome database of the Joint Genome Initiative-JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/Dekbr1/Dekbr1.home.html>) to recover the complete protein sequence. Phylogenetic analysis of the amino acid sequences encoded by β -glucosidase genes of *D. bruxellensis* and other fungi, was performed as previously reported (de Souza Liberal et al. 2012). A sequence of the bacterial *Thermotoga neapolitana* β -glucosidase was used as the out-group. Functional domains of the putative β -glucosidase of *D. bruxellensis* were identified by using the structural analysis tools available online at the European Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>) and SIB Bioinformatic Resource Portal (<http://www.expasy.org/>).

Statistical analysis

The data were analysed with ASSISTAT Software (7.6 beta Version) (Silva and Azevedo 2006). A series of seven tests was conducted to analyse the normal distribution of the variables ($P > 10$). Data with a normal distribution were analysed with parametric tests. The differences between the principal metabolites and higher alcohols measured in the fermentation samples, were determined by carrying out an analysis of variance (ANOVA) in a completely randomized design ($p < 0.05$). The Tukey Test was applied at a level of 5% of probability ($p < 0.05$) to determine the significant difference between the variables.

Results

Production and purification of *D. bruxellensis* cellobiase (β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21)

With the aim of determining the best conditions for the expression of cellobiase activity, GDB 248 yeast cells were cultivated in synthetic media containing glucose, sucrose, maltose and cellobiose to test the activities of cell-free extracts for the main gluco-hydrolases: invertase (EC 3.2.1.26, β -fructofuranosidase), cellobiase (β -glucosidase, E.C. 3.2.1.21) and maltase (α -glucosidase, EC 3.2.1.20). No hydrolytic activity was detected in the supernatant of the cell cultures. The results of the analysis showed that intracellular invertase activity was 1.6 and 3.3-fold higher when

cultivated in glucose, whereas the intracellular cellobiase activity was 3.4 and 1.8-fold higher in the sucrose than under cellobiose conditions (Table 1). Intracellular maltase activity was not detected in any of the conditions tested. However, it was only in the cellobiose growth conditions that the cellobiase activity was found to be around 1.6-times higher than with the invertase activity. To confirm the cellobiase expression, the cell-free extract prepared from the cellobiose cultivation of yeast cells was fractionated by ammonium sulfate precipitation and the fractions with cellobiase activity were pooled and partially purified (Table 2).

Kinetic parameters of *D. bruxellensis* cellobiase

The purified cellobiase fraction candidate (referring to the EF2 fraction in Table 2) from *D. bruxellensis*, displayed a narrow range of pH, with its optimum activity in 100 mM sodium nitrate buffer at pH 3.8 when cellobiose was used as substrate (Figure 1A). On the other hand, EF2 showed a wider range of optimum temperatures (Figure 1B). Under these conditions (100 mM sodium citrate pH 3.8 and 30°C), the cellobiase from *D. bruxellensis* showed a broad spectrum of activity for disaccharides (Table 3). However, when the chromogenic synthetic disaccharide pNP-β-D-glucopyranoside (pNPG) was used, the optimum conditions for enzyme activity were established as 30°C and 5 mM sodium acetate buffer pH 4.8 and from this time onwards, all the experiments were performed in this condition. No activity was detected for the synthetic disaccharide pNP-β-D-galactopyranoside (pNPGal) (Table 3). Competitive inhibition of pNPG hydrolysis was observed in the presence of the cellobiose, sucrose and even maltose disaccharides, while the presence of pNPGal did not prevent an interaction of pNPG with the active site of the enzyme (Table 3). The

Table 1 Effect of different carbon source medium on enzyme activity in the crude cell-free extracts from *Dekkera bruxellensis* GDB 248

Sugar in the medium	Substrate of enzyme reaction	Enzyme assayed	Specific activity (U/mg protein) ^a
Glucose	Sucrose	Invertase	0.998 ± 0.01
	Cellobiose	β-glucosidase	0.835 ± 0.02
	Maltose	α-glucosidase	0.000
Sucrose	Sucrose	Invertase	0.598 ± 0.01
	Cellobiose	β-glucosidase	0.024 ± 0.03
	Maltose	α-glucosidase	0.000
Cellobiose	Sucrose	Invertase	0.295 ± 0.01
	Cellobiose	β-glucosidase	0.460 ± 0.02
	Maltose	α-glucosidase	0.000

^aOne unit of enzyme activity (U) refers to the μmol of glucose released per minute at 30°C from the amount of protein in one gram of yeast cells.

Table 2 Summary of partial purification of cellobiase from *Dekkera bruxellensis* GDB 248 grown on cellobiose medium

Purification step ^a	Protein concentration (mg/mL)	Specific activity (μmol EqGlucose/min.mgProtein) ^b	Purification factor
Cell-free extract	0.95	0.104	1.0
EF1 ^c	1.19	0.113	1.09
EF2 ^d	0.11	0.848	8.16

^aFive grams of yeast pellet was used for protein extraction and purification.

^bβ-Glucosidase activity was assay with 100 mM of p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG) at 30°C.

^cActive fraction collected from molecular exclusion chromatography.

^dActive fraction collected from ion exchange chromatography.

following kinetic parameters were determined using pNPG: $K_M = 0.58$ mM; $V_{max} = 154$ μmol/min.mgProtein; $K_{cat} = 12.84$ min⁻¹.

In silico analysis of BGL gene

The nucleotide sequence of the cellobiase encoded *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* BGL gene was identified from the *Dekkera bruxellensis* Genomic Database. The protein structure analysis predicted three major domains, similar to the *Kluyveromyces marxianus* enzyme. The N-terminus showed a glucosyl-hydrolase family 3 motif followed by the PA14 β-barrel, which is involved in carbohydrate binding in *K. marxianus* (Yoshida et al. 2010). At the C-terminus, there was a fibronectin type III-like domain that is also present in the structure of *K. marxianus* cellobiase (Yoshida et al. 2010). It is possible that this domain is involved in protein-protein interaction to form a homodimer structure of the enzyme. The results obtained in silico confirmed the identification of the putative BGL gene encoding cellobiase (β-glucosidase) of *D. bruxellensis*.

Industrial-like fermentation

A comparative fermentation assay was carried out using cellobiose as the carbon source to analyze the fermentation efficiency of GDB 248 strain with regard to the model for sucrose containing industrial fermentation. Figure 2 displays the kinetic profile of the GDB 248 strain in YNB synthetic medium with sucrose (SMsuc) (panel A) and cellobiose (SMcello) (panel B). It was calculated that the rate of sucrose consumption was 3.8-fold higher than cellobiose (Table 4). Although all the sucrose was consumed in the first 6 hours of fermentation, in the SMcello condition the cellobiose still remained above 50% at 8 h of fermentation (Figure 2B). This resulted in a 1.56-fold higher production of ethanol in the SMsuc condition. In contrast, the acetate production was 1.64-fold higher in cellobiose than in sucrose supplementation. No glycerol was detected in the course of the fermentation in either of the disaccharide carbon

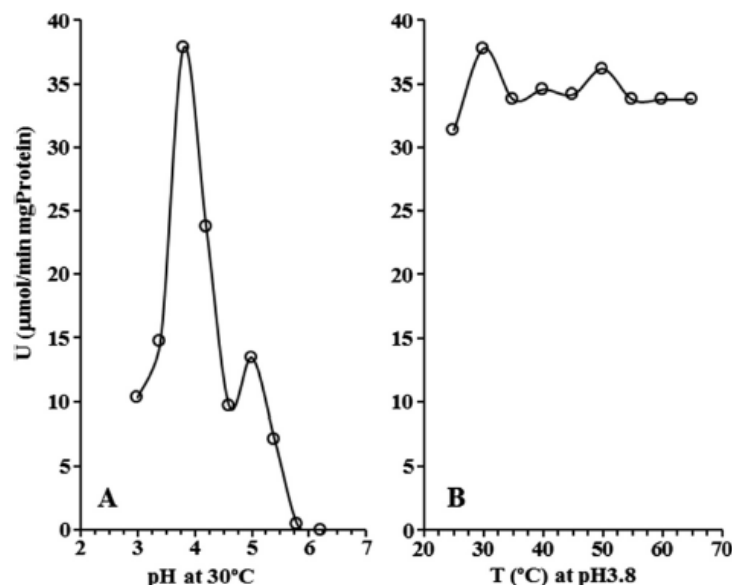


Figure 1 Activity of β -glucosidase partly purified from *Dekkera bruxellensis* GDB 248 using pNPG as substrate at 37°C. (A) Optimal pH and (B) temperature.

sources. At the same time, it was only in SMSuc conditions that increased concentrations of fructose and glucose were detected (at 1 g/L for four hours of fermentation declining to zero for 8 hours). No variation in the cell biomass was observed (data not shown) in any of the conditions applied.

Following this, the fermentative parameters of assays which had a mixture of the same quantities of glucose and cellobiose, were compared so that a further analysis could be conducted of the sugar cane bagasse to assess the assimilation capacity of the GDB 248 strain. In Figure 3 the kinetic profile of GDB 248 strain is represented with a mixture of glucose and cellobiose (SMcello/glu) (A) and in sugarcane bagasse (B). The cellobiose and glucose curves showed that the GDB 248 strain displayed 17-fold and 10.5-fold higher consumed rate in SMcello/glu condition than in the SMBag (Table 1). Of all the conditions tested, glycerol production was found to be higher

in the SMBag condition, with a change that was 2.8-fold more than in the SMcello/glu condition. With regard to acetate and ethanol, the production was similar for both conditions ($p < 0.01$), whereas the maximum productivity in SMcello/glu was 2.4-fold higher than in the SMBag condition, which, together with the SMSuc condition, was one of the highest production rates detected (0.24 g/L.h) (Table 4). Thus, it seemed that the fermentation of cellobiose was stimulated by the presence of glucose in the medium, while reducing acetate production and increasing fermentation efficiency (Table 4). This may be partially explained by the fact that glucose induced the cellobiase activity in the cell-free extract more than the other carbon sources tested in this study (Table 1).

Discussion

The yeast *D. bruxellensis* strain has a reputation for causing spoilage in bioethanol and wine production and for being a dominant factor in these industrial processes (de Souza Liberal et al. 2005). However, its merit as a potential candidate for fermenting yeast in second-generation bioethanol production from lignocellulosic substrates has been reported (Blomqvist et al. 2011). In addition, the industrial strain has shown a relatively high performance in sugarcane juice fermentation (Pereira et al. 2012) and sugarcane molasses (manuscript in preparation) as well as being capable of using cellobiose as a carbon source (Leite et al. 2013).

Cellobiose assimilation and hydrolysis is of special concern when considering the production of ethanol from hydrolysed cellulosic material. In this study, the

Table 3 Effect of disaccharides on the activity of the purified cellobiase from *Dekkera bruxellensis* GDB 248

Substrate	Glucosyl link	Relative activity (%)	Inhibitory activity (%) ^a
Cellobiose	Glucose- β (1 $\rightarrow$ 4)-Glucose	100.0	100.0
Maltose	Glucose- α (1 $\rightarrow$ 4)-Glucose	27.7 $\pm$ 0.01	94.9
Sucrose	Glucose- α (1 $\rightarrow$ 2)-Fructose	90.0 $\pm$ 0.03	95.2
pNPG	Glucose- β (1 $\rightarrow$ 4)-phenyl	100.0	na ^b
pNPGAL	Galactose- β (1 $\rightarrow$ 4)-phenyl	0.0	0.0

^aDissaccharides were added to reactions with the chromogenic substrate pNPG.

^bnot applicable.

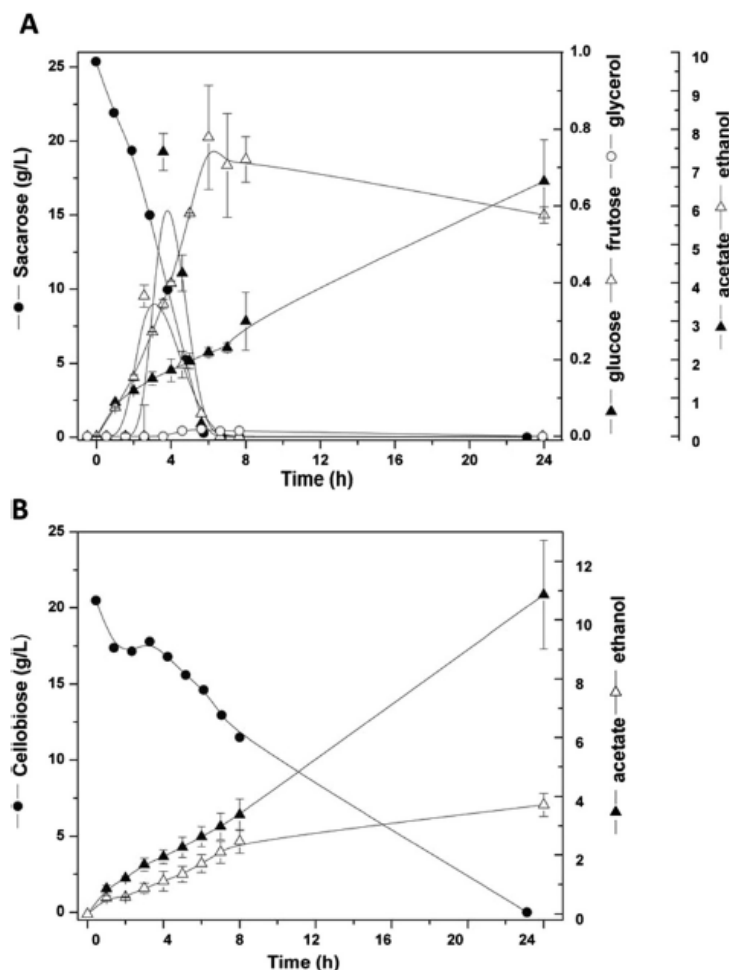


Figure 2 Fermentative kinetics parameters of shake flask cultivation of *Dekkera bruxellensis* GDB 248. Synthetic medium containing sucrose (A) or (B) cellobiose for 24 hours at 32°C in oxygen-limiting conditions.

results demonstrated that under oxygen-limiting conditions the cells of GDB 248 strain are able to assimilate cellobiose with 64.5% relative efficiency compared with the assimilation of sucrose. The fermentation conditions employed in this work included high inoculum biomass

(10% w/v), low agitation and high carbon concentration and the generation of high positive CO₂ pressure. This ensured an almost anaerobic or oxygen-limited environment, which allowed us to evaluate the potential ability of the GDB 248 strain to produce ethanol in industrial-

Table 4 Physiological parameters at the end of fermentation by *Dekkera bruxellensis* strain GDB 248

Media ^a	Sugar	Sugar supplied (g/L)	Residual sugar (g/L)	qS (-g/L.h)	Glycerol (g/L)	Acetate (g/L)	Ethanol (g/L)	P _{max} (g/L.h)	Fermentation efficiency (%)
SMSsuc	Sucrose	25.00	0.00	4.79	0.00	6.64(±1.08) ^{ab}	5.76(±0.21) ^a	0.24	42.85
SMScello	Cellobiose	20.50	0.00	1.26	0.00	10.87(±1.85) ^a	3.72(±0.39) ^b	0.15	33.71
SMScello/glu	Cellobiose	10.00	0.00	0.43	0.18(±0.04) ^a	4.73(±0.89) ^b	5.88(±0.49) ^a	0.25	56.06
	Glucose	10.00	0.00	2.89					
SMSbag	Cellobiose	4.45	3.41(±0.30) ^a	0.04	0.49 ±(0.04) ^b	5.38(±0.24) ^b	4.87(±0.40) ^{ab}	0.10	53.95
	Glucose	17.58	0.95(±0.06) ^b	0.18					

^aSynthetic YNB medium containing sucrose (SMSsuc), cellobiose (SMScello), a mixture of cellobiose and glucose (SMScello/glu) or acid pre-treated enzyme-hydrolyzed sugarcane bagasse (SMSbag). Rates of sugar consumption (qS) and maximal ethanol production (P_{max}) as well as the percentage of maximal theoretical yield were calculated. Average values (and standard deviation in parenthesis) were calculated from biological replicates with technical replicates for each sample. Similar superscript letters indicate no statistical difference according to ANOVA test (p < 0.05).

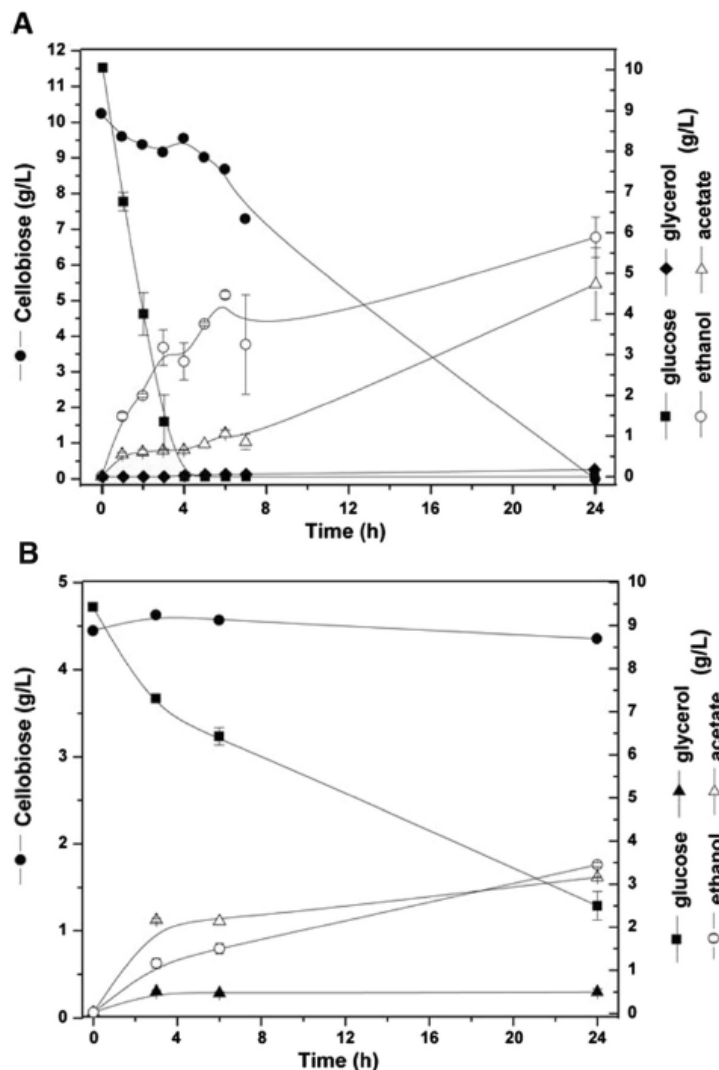


Figure 3 Fermentative kinetics parameters of shake flask cultivation of *Dekkera bruxellensis* GDB 248 for 24 hours at 32°C in oxygen-limiting conditions. (A) Synthetic medium containing a mixture of cellobiose and glucose. (B) Steam exploded sugarcane bagasse.

like conditions. This differed considerably from previous studies that reported cellobiose fermentation from other *D. bruxellensis* strains (Blomqvist et al. 2010; Galafassi et al. 2011). The GDB 248 strain preferred glucose as a carbon source to cellobiose, and this resulted in a higher rate of ethanol production and fermentation efficiency. This preference could be attributed either to the catabolic repression exerted by the glucose or to its limited capacity for cellobiose assimilation, *i.e.* a deficiency in the transporter.

The partial purification of a protein fraction was carried out to confirm the cellobiose activity and this resulted in the characterization of the β -glucosidase activity. The optimum conditions for enzyme activity (30°C

and pH 4.8) and its kinetics profile resemble those outlined by *Kluyveromyces marxianus* (Yoshida et al. 2010). Moreover, the results obtained *in silico* identified the *BGL* gene encoding for β -glucosidase in the genome of *D. bruxellensis*. The theoretical protein contained 840 amino acids with a predicted molecular weight of 93 kDa and had a glucosyl-hydrolase family 3 motif at the N-terminus followed by the PA14 β -barrel, which was thought to be involved in carbohydrate binding in the *K. marxianus* enzyme (Yoshida et al. 2010). At the C-terminus there was a fibronectin type III-like domain that is also present in the structure of *K. marxianus* cellobiose (Yoshida et al. 2010), the function of which is still unknown. This domain might be involved in protein-protein interaction to form a

homodimer structure of the enzyme. Neither the transmembrane nor the signal peptide domain nor the glycosylation sites were identified, which corroborates the experimental results which show the intracellular location of the enzyme.

Ethanol and acetate were produced under all the oxygen-limiting industrial conditions that applied here. Furthermore, only a very low production of glycerol was observed, as previously reported (Pereira et al. 2012; Leite et al. 2013). It is well known that in oxygen-limiting conditions in *D. bruxellensis*, either an inhibition of fermentation, or a Custer effect occurs. In addition, it was found that no acetic acid was produced while the glucose was being consumed at a high rate (Figure 3A). When cellobiose is consumed at a low rate, the production of acetate is accelerated (Figure 3A). These suggest there was glucose inhibition of aldehyde dehydrogenase, which is the enzyme responsible for acetate production (Blomqvist et al. 2011). In this study the results obtained demonstrate the capacity of *D. bruxellensis* to produce acetic acid even in oxygen-limiting conditions and points to the importance of the Custer effect in the final ethanol yield. Similarly, in the study by Blomqvist et al. (2010) noticeably more acetic acid was produced when *D. bruxellensis* was grown on cellobiose as a sole carbon source, than on glucose under the same conditions. Another interesting feature is that *Dekkera/Brettanomyces* yeast is sensitive to acetic acid concentrations above 2 g/L (Yahara et al. 2007), while GDB 248 strains proved to be very resistant to acetic acid - in the range of 5.5-fold higher than other strains. This acetate tolerance has recently been noted (Pereira et al. 2012). It seems that there are wide variations in the genome of different *Dekkera/Brettanomyces* strains, and this leads to a great variety of phenotypes.

Conclusions

The results given here may help to explain why *Dekkera/Brettanomyces* yeasts can outcompete *S. cerevisiae* in industrial environments, while isolated cultures of *D. bruxellensis* in the same condition have low fermentation efficiency. It is possible that this behaviour can be attributed to the fact that both cellobiase and invertase are intracellular in *D. bruxellensis*. However, in the industrial oxygen-limiting conditions in which sucrose is the principal carbon source, the extracellular invertase activity from *S. cerevisiae* can be exploited by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts.

It has been recently stated that there is an increasing number of yeasts capable of hydrolyzing cellobiose for the production of ethanol, for example *Candida queiroziae*, *Clavispora* sp. and *Spathaspora passalidarum* (Long et al. 2012; Lewis Liu et al. 2012; Santos et al. 2011), and *D. bruxellensis* (Blomqvist et al. 2010; Galafassi et al. 2011;

Leite et al. 2013). However, only the *Dekkera/Brettanomyces* species has proved to be able to settle and survive in industrial environments (Passoth et al. 2007; de Souza Liberal et al. 2007; Pereira et al. 2012). Thus, the great challenge for its use as a fermenting yeast is how to address the question of the low conversion rates, when faced with simulated industrial conditions. Studies are being undertaken in our laboratory to identify the main metabolic bottlenecks that characterize this feature and to evaluate the capacity of the species to convert hydrolysates of sugarcane and sweet sorghum bagasse into ethanol and achieve high industrial yields.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ALSR conducted the survey on which the paper is based, performed enzymatic assays and fermentation and contributed to drafting the manuscript. RFRS and FCBL contributed to the fermentation assays and metabolic analyses. RRNB contributed to the gene identification, *in silico* analysis and to drafting the manuscript. PMGP contributed to the protein methods and purification and to drafting the manuscript. EEV contributed to the statistical analysis and to drafting the manuscript. MAMJr is the team leader and also conducted the survey on which the paper is based. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was sponsored by the Bioethanol Research Network of the State of Pernambuco (CNPq-FACEPE/PRONEM program, grant n° APQ-1452-2.01/10), by CNPq-Universal program (grant n° 472106/2012-0) and by the Ministry of Science and Technology of Brazil (SIGTEC number PRJ03.33).

Author details

¹Bioprocessing Laboratory, CETENE, 50740-540 Recife, PE, Brazil. ²Interdepartmental Research Group on Metabolic Engineering, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil. ³Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil. ⁴Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil. ⁵Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE, Av. Prof. Luiz Freire, 01 - Cidade Universitária, 50740-540 Recife, PE, Brazil.

Received: 25 October 2013 Accepted: 14 January 2014

Published: 20 January 2014

References

- Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J, Passoth V (2010) Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 87(4):1487–1497
- Blomqvist J, South E, Tiukova L, Momeni M, Hansson H, Ståhlberg J, Hom S, Schnürer J, Passoth V (2011) Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. *Lett Appl Microbiol* 53(1):73–78
- Blondin B, Ratamaherina R, Amaud A, Galzy P (1982) A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol Bioeng* 24(9):2031–2037
- Bollag DM, Edelstein SJ, Rozycki MD (1996) Protein methods. Wiley-Liss, New York
- de Souza Liberal A, da Silva FE, De Moraes J, Simoes D, de Moraes JM (2005) Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA PCR. *Lett Appl Microbiol* 40(1):19–23
- de Souza Liberal A, Basilio A, do Monte Resende A, Brasileiro B, Da Silva Filho E, De Moraes J, Simoes D, de Moraes M Jr (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol* 102(2):538–547
- de Souza Liberal AT, Carazzolle MF, Pereira GA, Simões DA, de Moraes Jr MA (2012) The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10 gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase. *World J Microbiol Biotechnol* 28(7):2473–2478
- Galafassi S, Merico A, Piza F, Hellborg L, Molinari F, Piškur J, Compagno C (2011) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable

- sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38(8):1079–1088
- Gerós H, Azevedo M-M, Cássio F (2000) Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technol Biotechnol* 38(1):59–62
- Leite FCB, Basso TO, WdB P, Gombert AK, Simões DA, Morais MA (2013) Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res* 13(1):34–43
- Lewis Liu Z, Weber SA, Cotta MA, Li S-Z (2012) A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corn cob residues by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour Technol* 104:410–416
- Long TM, Su Y-K, Headman J, Higbee A, Willis LB, Jeffries TW (2012) Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5492–5500
- Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* 73(13):4354–4356
- Pereira LF, Bassi APG, Avansini SH, Neto AGB, Brasileiro BTRV, Ceccato-Antonini SR, de Morais Jr MA (2012) The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101(3):529–539
- Santos RO, Cadete RM, Badotti F, Mouro A, Wallheim DO, Gomes FC, Stambuk BU, Lachance M-A, Rosa CA (2011) *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99(3):635–642
- Scheffers W (1979) Anaerobic inhibition in yeasts (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 45(1):150–150
- Silva FA, Azevedo C (2006) A new version of the assistat-statistical assistance software. In: World Congress on computers in agriculture. American Society of Agricultural Engineers, Orlando, pp 393–396
- Spindler DD, Wyman CE, Grohmann K, Philippidis GP (1992) Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol Lett* 14(5):403–407
- van Dijken JP, Scheffers WA (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 32(3–4):199–224
- Wijsman MR, van Dijken JP, van Kleeff BH, Scheffers WA (1984) Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 50(2):183–192
- Yahara GA, Javier MA, Tulio MJM, Javier GR, Guadalupe AUM (2007) Modeling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng* 30(6):389–395
- Yoshida E, Hidaka M, Fushinobu S, Koyanagi T, Minami H, Tamaki H, Kitaoka M, Katayama T, Kumagai H (2010) Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem J* 431:39–49

doi:10.1186/2193-1801-3-38

Cite this article as: Reis et al.: Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *SpringerPlus* 2014 **3**:38.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com