Gabriel Jaime Vargas Betancur

OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientador:
Prof. Nei Pereira Jr., *PhD*.

Rio de Janeiro
2010

B562o Betancur, Gabriel Jaime Vargas.

Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração / Gabriel Jaime Vargas Betancur Vargas Betancur. – 2010.
xxii, 174 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Nei Pereira Jr.

1. Biocombustível 2. Etanol de segunda geração. 3. Fermentação. 4. Cana de açúcar. 5. Hidrólise ácida. I. Pereira Jr., Nei (orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. III. Título.

CDD: 665.776

Gabriel Jaime Vargas Betancur

OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E AVALIAÇÃO DA FERMENTABILIDADE DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do titulo de Doutor em Ciências

Aprovada por:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* (DEB/UFRJ)
(Orientador)

Adriana Ururahy Soriano, *DSc* (PETROBRAS)

Prof. Donato Alexandre Gomes Aranda, *DSc* (DEQ/UFRJ)

Prof[a]. Gisella Maria Zanin, *DSc* (DEQ/UEM)

Lidia Maria Melo Santa Anna, *DSc* (PETROBRAS)

Prof. Maurício Bezerra de Souza Jr., *DSc* (DEQ/UFRJ)

À memória do meu pai,
Francisco Vargas Palacio

À minha mãe, Martha;
minhas irmãs, Marta e Ana;
meu irmão, Francisco,
e minhas sobrinhas, Andréa, Natalia, Danna, Sofia

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem tudo se deve;

Ao professor Nei Pereira Jr., por sua assertividade e orientação no desenvolvimento desta Tese e da minha formação professional, por me abrigar nos seus laboratórios e, principalmente, por seu apoio incondicional;

À equipe dos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos, especialmente à Carol e o Roberto, por estarem sempre presentes quando necessário e serem o melhor exemplo de trabalho em equipe e companheirismo; à Verônica pelo seu companheirismo desinteressado e sua alegria inesgotável; ao Luiz, braço direito e esquerdo do laboratório; à Patrycia e Kelly, que conseguiram me aturar todos estes anos; à Neumara, Felipe, Paulo, Vanessa, Eleandro e Jorge, por tornarem de nosso lar de trabalho um ambiente agradável; à Liliana, Luiz André, Elcio, Danielle, Diogo e à equipe da central analítica; e a todos aqueles que me marcaram no LADEBIO, especialmente, à Mariana, Luciana, Rafael e Joyce, dos quais só tenho gratas recordações e devo o meu treinamento no laboratório;

Aos integrantes da Gerência de Biocombustíveis do CENPES, pelo auxílio com algumas análises e as valiosas discussões decorrentes do nosso trabalho conjunto, especialmente à doutora Lidia Santa Anna, Claudia, Absai, Danuza e Emersom;

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Ambiental por disponibilizar sua estrutura durante algumas quantificações, especialmente à professora Magali Cammarota e à Verônica;

À minha família, minha força inesgotável;

À Elisa, meu anjo da guarda no Brasil, assim como a sua família, Vilmar e Pedrinho, que se tornaram minha família;

À Sandra, mais que minha prima, minha mente duplicada, quem me devolveu a emotividade perdida;

Aos meus amigos no Brasil, o contrapeso na balança trabalho-lazer, especialmente, à dupla Jose e Lina, oásis "*paisa*" onde queira que estejam; e à Anna, simplesmente incondicional;

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos e aos funcionários da secretaria de Pós-graduação da Escola de Química, por terem me auxiliado nos processos burocráticos durante o Doutorado e aqueles relacionados à minha permanência no Brasil;

À PETROBRAS e a FAPERJ por financiar os projetos que permitiram a realização desta pesquisa;

Ao CNPq pelo auxilio financeiro.

Resumo

BETANCUR, Gabriel Jaime Vargas. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Orientador: Nei Pereira Jr.

O bagaço de cana, material lignocelulósico, é produzido em grandes quantidades no Brasil e representa uma importante fonte de açúcares fermentáveis como xilose e glicose para a produção de etanol de segunda geração, caso sejam aplicadas técnicas para o fracionamento da biomassa em seus principais componentes. Neste trabalho objetivou-se otimizar as condições para o pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar visando à obtenção de um hidrolisado hemicelulósico que permitisse a produção eficiente de etanol. Inicialmente, a técnica para a realização do pré-tratamento foi aperfeiçoada e a influência do tamanho de partícula estabelecida. Aplicando métodos de planejamento experimental e de otimização simultânea de múltiplas variáveis, através da função desirability, encontrou-se uma relação sólido:líquido de 1:2,8 (1 g de bagaço:2,8 mL de solução de ácido sulfúrico 1% v/v) e temperatura de 121ºC durante 27 min, como as condições que maximizaram simultaneamente a eficiência do pré-tratamento (60%) e a concentração de xilose no hidrolisado (50,1 g/L). Estas mesmas condições permitiram também minimizar as concentrações de furfural (0,55 g/L), hidroximetilfurfural (0,09 g/L), ácido acético (6,04 g/L) e compostos fenólicos (1,18 mg/L). A fermentação deste hidrolisado, utilizando uma linhagem floculante da levedura Pichia stipitis, permitiu atingir a maximiza relação etanol/xilitol (6,7 g/g), obtendo-se uma concentração final de etanol de 19 g/L, e reduzir o tempo de fermentação do hidrolisado de 60 para 40 horas. Adicionalmente, foi determinada a tolerância máxima ao etanol para esta levedura (60 g/L), quando utilizada xilose como fonte de carbono, assim como sua capacidade na co-fermentação de misturas xilose-glicose. O uso de hidrolisado hemicelulósico fermentado como diluente para a realização do processo de fermentação e sacarificação simultânea (SSF) de celulose utilizando um preparado enzimático comercial (Multifect CX - Genencor) e a levedura Saccharomyces cerevisiae, resultou em uma concentração final de etanol de aproximadamente 59,5 g/L, sinalizando o alto potencial desta estratégia tecnológica.

Abstract

BETANCUR, Gabriel Jaime Vargas. **Optimization of the acid pretreatment of sugar cane bagasse and evaluation of the hemicellulosic hydrolysate fermentability for second generation ethanol production**. D.Sc. These. Chemical High School, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Supervisor: Nei Pereira Jr.

Sugarcane bagasse, a lignocellulosic feedstock, is produced in great amounts in Brazil and represents an important source of sugars, such as xylose and glucose, for the production of second generation ethanol, if techniques for the selective biomass fractionation into its main components are applied. This work aimed at optimizing the diluted acid pretreatment of sugar cane bagasse in order to obtain obtaining a hemicellulosic hydrolysate that would allow efficient ethanol production. Initially, the pretreatment methodology was improved, as well as the particle size influence on the process was established. Using experimental design techniques and simultaneous optimization for several response variables, through the desirability function, it was possible to establish a solid:liquid ratio of 1:2.8 (1g of bagasse:2.8 mL of sulfuric acid solution 1.0% v/v), a temperature of 121ºC, and time of exposure of 27 min, as the conditions to maximize simultaneously the pretreatment yield (60%) and the xylose concentration (50.1 g/L). These same conditions also allowed minimizing the concentration of furfural (0.55 g/L), hydroxymethylfurfural (0.09 g/L), acetic acid (6.04 g/L) and phenolic compounds (1.18 mg/L). The fermentation of the generated hydrolysate in optimum conditions by a flocculating strain of *Pichia stipitis* resulted in the highest ethanol/xylitol ratio (6.7g/g), a final ethanol concentration of 19 g/L and the reduction of the fermentation time from 60 hour to 40 hour. Additionally, both the maximum ethanol tolerance of this yeast (60 g/L), when xylose was used as sole carbon source, as well as its capacity for co-fermenting glucose and xylose were determined. The use of fermented hemicellulosic hydrolysate as diluent to perform the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process of the cellulose component was also investigated. For this strategy, the system was loaded with a commercial cellulase preparation (Multifect CX-Genencor), which was inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* cells, resulting in a final ethanol concentration of 59.5 g/L, and indicating the high potential of this strategy.

SUMÁRIO

Página

Capítulo 1

1 APRESENTAÇÃO DO TEMA DE TESE 1

Capítulo 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6

2.1 ENERGIA E DESENVOLVIMENTO 6

2.2 O ETANOL 9

2.2.1 Aplicações do etanol 10

2.2.2 Vantagens da inserção do etanol no mercado energético e sua influência no melhoramento do ambiente 11

2.2.3 Mercado mundial 13

2.2.4 O contexto brasileiro 14

2.2.4.1 Uso de etanol como aditivo e combustível 14

2.2.4.2 Aspectos sócio-econômicos da implantação do álcool combustível no Brasil 16

2.2.4.3 Produção de etanol no Brasil 16

2.2.4.4 Resíduos lignocelulósicos no Brasil 17

2.2.5 Processos para produção de etanol 19

2.2.5.1 Etanol de primeira geração 19

2.2.5.2 Etanol de segunda geração 21

2.3 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 24

2.3.1 A fração celulósica 25

2.3.2 A fração hemicelulósica 26

2.3.3 Lignina 28

2.3.4 Potencial dos materiais lignocelulósicos dentro do conceito de biorrefinaria 31

2.4 PRÉ-TRATAMENTOS PARA MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 32

2.4.1 Pré-tratamento ácido 39

2.4.2 Inibidores do processo de fermentação gerados durante os pré-tratamentos 40

2.5 APROVEITAMENTO DE CELULOSE 43

2.6 APROVEITAMENTO DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA 45

Página

2.6.1 Catabolismo da xilose 46
2.6.2 Microrganismos para produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos 48
2.6.3 Microrganismos geneticamente modificados visando à produção de etano a partir de materiais lignocelulósicos 50
2.6.4 Fatores ambientais que afetam a fermentação de xilose 52
2.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS 57

Capítulo 3
3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS 60
3.1 JUSTIFICATIVA 60
3.2 OBJETIVOS 61

Capítulo 4
4 MATERIAIS E MÉTODOS 63
4.1 CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 63
4.2 APRIMORAMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO PARA A OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO 64
4.2.1 Otimização do pré-tratamento ácido sob condições moderadas 66
4.3 MICRORGANISMOS 68
4.3.1 Manutenção do microrganismo 69
4.4 MEIOS EMPREGADOS PARA ATIVAÇÃO, PROPAGAÇÃO E FERMENTAÇÃO 70
4.4.1 Meio de ativação 70
4.4.2 Meios para propagação celular 71
4.4.3 Meios de fermentação 72
4.5 METODOLOGIAS DE PROPAGAÇÃO CELULAR 72
4.6 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO 73
4.6.1 Experimentos em frascos cônicos 73
4.6.2 Fermentações em biorreator instrumentado 74
4.6.3 Processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) 77
4.7 AMOSTRAGEM 78
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS 79
4.8.1 Determinação de massa celular 79

Página

4.8.2 Determinações quantitativas 80
4.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA 82
4.10 VARIÁVEIS DE RESPOSTA 84

Capítulo 5
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 86
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR 87
5.2 APRIMORAMENTO DA TÉCNICA PARA A HIDRÓLISE DE HEMCELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR 87
5.2.1 Metodologias para a mistura de fases 87
5.2.2 Tamanho de Partícula 89
5.3 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA FERMENTABILIDADE DE HIDROLISADO OBTIDO COM ÁCIDO 1% (v/v) 91
5.4 APRIMORAMENTO DO PROCESSO DE PROPAGAÇÃO CELULAR 96
5.5 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM ÁCIDO DILUÍDO 99
5.5.1 Planejamento preliminar 99
5.5.2 Segundo planejamento incluindo fermentabilidade dos hidrolisados 104
5.6 FERMENTAÇÕES SEQUÊNCIAIS UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO 126
5.7 ESTUDOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL EM UM SISTEMA DE HIDRÓLISE E CO-FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS 129
5.7.1 Tolerância da levedura *P. stipitis* ao etanol durante o processo de fermentação 129
5.7.2 Crescimento de *Pichia stipitis* em meio sintético contendo xilose e glicose 135
5.7.3 Avaliação da hidrólise enzimática de celulose e co-fermentação simultâneas utilizando *P. stipitis* 139
5.8 AVALIAÇÃO DO PROCESSO SSF REALIZADO UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO FERMENTADO 140
5.8.1 Efeito dos componentes do meio de fermentação de pentoses no processo SSF 141
5.8.2 Efeito do hidrolisado hemicelulósico fermentado no processo SSF 145

Página

Capítulo 6

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES 149

6.1 CONCLUSÕES 149

6.2 SUGESTÕES 152

REFERÊNCIAS 155

ANEXOS 174

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 2.1 Matriz energética mundial 7

Figura 2.2 Aplicações do etanol 11

Figura 2.3 Participação do Brasil na produção mundial de etanol 13

Figura 2.4 Relação de produção de veículos no Brasil segundo por tipo de combustível 15

Figura 2.5 Produção de etanol no Brasil nos últimos anos 17

Figura 2.6 Produção de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos anos 18

Figura 2.7 Alternativas para a bioprodução de etanol 20

Figura 2.8 Diagrama de blocos do processo com hidrólise ácida total 22

Figura 2.9 Diagrama de blocos do processo SHF com hidrolise seletiva de hemicelulose 22

Figura 2.10 Diagrama de blocos do processo SSF 23

Figura 2.11 Diagrama de blocos do processo SSCF 24

Figura 2.12 Diagrama de blocos do processo CBP 24

Figura 2.13 Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico 25

Figura 2.14 Disposição das moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas (A); estrutura simplificada da celulose (B) 26

Figura 2.15 Estrutura típica da hemicelulose 27

Figura 2.16 Álcoois precursores da lignina 29

Figura 2.17 Produtos potenciais a serem obtidos da fração celulósica 30

Figura 2.18 Produtos potenciais a serem obtidos da fração hemicelulósica 31

Figura 2.19 Produtos potenciais a serem obtidos da lignina 31

Figura 2.20 Reação global de conversão de D-xilose a etanol 46

Figura 2.21 Metabolismo de D-xilose em leveduras 47

Figura 4.1 Reator utilizado para a hidrólise do bagaço de cana (a) e prensa hidráulica para extração hidrolisado (b) 65

Figura 4.2 Observação microscópica da linhagem floculante de *Pichia stipitis* CBS 5774 69

Figura 4.3 Esquema representativo das metodologias utilizadas para propagação celular. (a) propagação com cultivo de ativação; (b) propagação sem cultivo de ativação 73

Página

Figura 4.4 Biorreator BIOSTAT B para fermentação de hidrolisado, com capacidade para 1,5 L 75

Figura 4.5 Diagrama para o processamento das amostras 79

Figura 4.6 Curva de calibração para quantificação de massa celular 80

Figura 4.7 Cromatograma da solução padrão indicando os tempos de retenção dos compostos mais relevantes na fermentação de hidrolisado hemicelulósico 81

Figura 4.8 Curva de calibração para quantificação de compostos fenólicos 82

Figura 5.1 Concentração final de açúcares após pré-tratamento ácido (1atm/40 minutos com uma relação de 1 g de bagaço:2 mL de solução H_2SO_4 1% v/v) aplicando diferentes metodologias de mistura bagaço-solução ácida 88

Figura 5.2 Distribuição granulométrica do bagaço de cana utilizado para hidrólise ácida 90

Figura 5.3 Concentração de açúcares fermentáveis (glicose e xilose) em hidrolisados obtidos a partir de sólido com diferente tamanho de partícula 90

Figura 5.4 Cinética de fermentação do hidrolisado obtido com uma solução de ácido 1% (v/v), realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm), utilizando-se uma concentração inicial de células de 4,3 g/L. (a) Primeiras 10 horas de processo; (b) Comportamento até 75 horas de processo 93

Figura 5.5 Cinética de fermentação do hidrolisado obtido com uma solução de ácido 1% (v/v), realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm), utilizando-se uma concentração inicial de células de 10 g/L 95

Figura 5.6 Cinética de cultivo de ativação em meio sintético (a) e em meio com 25% de hidrolisado (b) 97

Figura 5.7 Cinética de fermentação do hidrolisado obtido com uma solução de ácido 1% (v/v), realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm, X_o=10 g/L), sem a utilização de cultivo de ativação para a preparação do inóculo 99

Página

Figura 5.8 Diagramas de Pareto para concentração de xilose (a), concentração de açúcares fermentáveis (b), eficiência de hidrólise (c) e quantidade de hidróxido necessária para ajuste de pH (d) 102

Figura 5.9 Influência do grau de severidade sobre a concentração de xilose nos hidrolisados 106

Figura 5.10 Relação entre furfural (a) e Hidroximetilfurfural (b) com o grau de severidade utilizado nos ensaios do pré-tratamento ácido 107

Figura 5.11 Influência do grau de severidade na eficiência de hidrólise da fração hemicelulosica de bagaço de cana durante o pré-tratamento ácido 108

Figura 5.12 Relação entre os compostos fenólicos (a) e o ácido acético (b) com o grau de severidade utilizado nos ensaios do pré-tratamento ácido 109

Figura 5.13 Diagramas de Pareto para concentração de xilose (a), eficiência de hidrólise (b), concentração de ácido acético (c), compostos fenólicos (d), furfural (e) e hidroximetilfurfural (f) 110

Figura 5.14 Influência do grau de severidade sobre a concentração de etanol (a), a concentração de xilitol (b), o rendimento em etanol (c) e o rendimento em xilitol (d) 113

Figura 5.15 Influência do grau de severidade sobre a relação etanol/xilitol 114

Figura 5.16 Influência da concentração de inibidores na relação etanol/xilitol após 48 horas de fermentação 115

Figura 5.17 Diagramas de Pareto para concentração de etanol (a), rendimento em etanol (b), concentração de xilitol (c), rendimento em xilitol (d) e relação etanol/xilitol (e) 116

Figura 5.18 Superfície de resposta para a função *desirability* da otimização do pré-tratamento ácido visando tanto as características do hidrolisado quanto sua fermentabilidade 122

Página

Figura 5.19 Perfil cinético da fermentação de hidrolisado hemicelulósico obtido nas condições preditas na otimização do processo 125

Figura 5.20 Perfis cinéticos de fermentações sequênciais utilizando hidrolisado hemicelulósico obtido nas condições preditas pela otimização e com reutilização direta de células (a) ou aplicando a metodologia Melle-Boinot entre cada fermentação (b) 127

Figura 5.21 Perfis cinéticos de fermentações com *P.stipitis* realizadas em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm) utilizando glicose (a) ou xilose (b) como fontes de carbono 130

Figura 5.22 Perfis cinéticos de fermentações com *P.stipitis* realizadas em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm) e conduzidas em batelada alimentada por pulsos, utilizando glicose (a) ou xilose (b) como fontes de carbono 132

Figura 5.23 Perfil cinético de fermentação com *P.stipitis* realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm) e conduzida em batelada alimentada continuamente, utilizando xilose 133

Figura 5.24 Concentração final de células (*P. stipitis*) após 24 horas de fermentação utilizando diferentes substratos em uma concentração inicial de 20 g/L 136

Figura 5.25 Concentração final de etanol após 24 horas de fermentação com *P. stipitis* utilizando diferentes substratos em uma concentração inicial de 20 g/L 137

Figura 5.26 Concentração final xilose, glicose e xilitol após 24 horas de fermentação com *P. stipitis* utilizando diferentes substratos em uma concentração inicial de 20 g/L 138

Figura 5.27 Desempenho da levedura *P. stipitis* em processos SSF utilizando tampão citrato (a) e SSCF utilizando hidrolisado hemicelulósico (b) 139

Figura 5.28 Perfil cinético da variação do etanol equivalente durante o processo SSF para avaliação do efeito dos componentes utilizados na fermentação de hidrolisado hemicelulósico 143

Página

Figura 5.29 Diagramas de Pareto para Glicose total (a), Glicose liberada na pré-hidrólise enzimática (b) e concentração de Etanol equivalente após processo SSF (c) 144

Figura 5.30 Perfil cinético para a liberação de CO_2 durante o processo SSF com *S. cerevisiae* em ensaios com diferentes teores de hidrolisado hemicelulósico fermentado 145

Figura 5.31 Variáveis relacionadas com o processo SSF utilizando diferentes teores de hidrolisado hemicelulósico fermentado 147

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 2.1 Características do etanol 9

Tabela 2.2 Períodos relevantes no desenvolvimento do mercado do etanol no Brasil 14

Tabela 2.3 Composição de alguns resíduos agroindustriais 28

Tabela 2.4 Constituintes básicos de alguns materiais 28

Tabela 2.5 Vantagens e desvantagens para diferentes pré-tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos 36

Tabela 2.6 Resultados e características reportadas na literatura para alguns pré-tratamentos aplicados a materiais lignocelulósicos 37

Tabela 2.7 Características mais relevantes dos principais microrganismos utilizados na fermentação de hidrolisado hemicelulósico 49

Tabela 2.8 Uso de *Pichia stipitis* na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos 56

Tabela 4.1 Peneiras de classificação utilizadas para determinar a distribuição granulométrica para o bagaço de cana 66

Tabela 4.2 Variáveis e níveis do planejamento experimental 67

Tabela 4.3 Planejamento central composto, em valores codificados, realizado para avaliar a hidrólise com ácido diluído da hemicelulose presente no bagaço 67

Tabela 4.4 Meio de manutenção 70

Tabela 4.5 Composição do meio utilizado para ativação das células 70

Tabela 4.6 Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico 71

Tabela 4.7 Variáveis e níveis escolhidos para determinar o efeito dos componentes da fermentação de hidrolisado hemicelulósico no processo SSF 78

Tabela 4.8 Planejamento experimental desenvolvido para determinar o efeito dos componentes da fermentação do hidrolisado hemicelulósico no processo SSF 78

Tabela 4.9 Condições operacionais do cromatógrafo para quantificação de açúcares e metabólitos principais 80

Tabela 4.10 Condições operacionais do cromatógrafo para quantificar furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético 82

Página

Tabela 5.1 Composição básica do bagaço de cana-de-açúcar 87

Tabela 5.2 Influência da concentração celular inicial na fermentação de hidrolisado obtido com solução ácida 1% (v/v) 95

Tabela 5.3 Parâmetros relevantes ao cultivo de ativação em meio sintético e meio com 25% de hidrolisado hemicelulósico 98

Tabela 5.4 Parâmetros relevantes às fermentações em biorreator de hidrolisado utilizando-se inóculo propagado em três (ativação, 1ª e 2ª aclimatação) ou duas (1ª e 2ª aclimatação) etapas 98

Tabela 5.5 Resultados experimentais do planejamento preliminar para o pré-tratamento ácido 100

Tabela 5.6 Variáveis e níveis do segundo planejamento experimental 104

Tabela 5.7 Resultados experimentais das características do hidrolisado no segundo planejamento para a otimização do pré-tratamento ácido 105

Tabela 5.8 Resultados experimentais para os parâmetros relacionados com a fermentabilidade dos hidrolisados após 48 h de fermentação 112

Tabela 5.9 Tendências necessárias das condições de pré-tratamento para atingir o ótimo de cada uma das variáveis de resposta, baseados na significância estatística dos efeitos 119

Tabela 5.10 Coeficiente empíricos para os modelos que representam o comportamento de cada uma das variáveis de resposta escolhidas para a otimização do pré-tratamento 120

Tabela 5.11 Condições preditas na otimização do processo e resultados experimentais de validação das mesmas 123

Tabela 5.12 Composição básica da celulignina ácida (fração sólida) gerada após pré-tratamento do bagaço nas condições preditas 126

Tabela 5.13 Parâmetros cinéticos mais relevantes em fermentações sequênciais com hidrolisado hemicelulósico re-utilizando as células 128

Página

Tabela 5.14 Resultados para o planejamento experimental desenvolvido para determinar o efeito dos componentes da fermentação de hidrolisado hemicelulósico após 50 horas de processo SSF 141

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLAS

AGOCF: Alexander´s Gas Oil Connections: Features;

ANFAVEA: Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores;

CBS: Central Bureau voor Schimmelcultures;

CIMA: Conselho Interministerial do açúcar e do Álcool;

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisas do Estado de São Paulo;

MAPA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

PROALCOOL: Programa Nacional do Álcool;

RFA: Renewable fuels association;

UNICA: União de Agroindústria Canavieira de São Paulo;

ABREVIATURAS

AEAC: álcool etílico anidro combustível;

AEHC: álcool etílico hidratado combustível;

ANOVA: análise de variância;

DHR: Dedini Hidrólise Rápida;

ETBE: éter etílico terc-butílico;

Conc. Acid.: concentração de ácido;

GL: Graus de Liberdade;

HMF: Hidroximetilfurfural;

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência;

MTBE: éter metílico terc-butílico;

OTR: taxa de transferência de oxigênio;

Rel. sol:liq ou S:L: relação sólido:líquido;

RSM: Metodologia de superfície de resposta;

SQ: Soma Quadrática;

SSF: Sacarificação simultânea à fermentação;

SSCF: Sacarificação simultânea à co-fermentação;

TAME: éter metílico terc-amílico;

u.m.a.: unidade de massa atômica;

XR: xilose redutase;

XDH: xilitol desidrogenase;

NOMENCLATURA

MQ: Média Quadrática;

P: concentração final de etanol, g/L;

P_o:concentração inicial de etanol, g/L;

Q_P: produtividade volumétrica em etanol, g/L.h;

S: Concentração final de substrato, g/L;

S_o: Concentração inicial de substrato, g/L;

T: temperatura, ^oC;

t_f: tempo de fermentação, horas;

v/v: relação volume/volume;

vvm: volume de ar por volume de meio por minuto, min^{-1};

X: concentração final de biomassa, g/L;

X_o: concentração inicial de biomassa, g/L;

$Y_{P/S}$: Fator de rendimento em produto por substrato consumido, g/g;

$Y_{X/S}$: Fator de rendimento em biomassa por substrato consumido, g/g;

CAPÍTULO 1

1. APRESENTAÇÃO DO TEMA DE TESE

O desenvolvimento tecnológico, intrínseco à história da humanidade, tem levado ao inevitável aumento expressivo da demanda por energia que não tem sido acompanhado pela oferta da mesma, gerando uma diminuição acelerada das reservas energéticas tradicionais, principalmente das reservas de petróleo ao ponto de inviabilizar o desenvolvimento sustentável de nações em crescimento. Adicionalmente, o uso indiscriminado de combustíveis fósseis tem contribuído para o aumento na poluição atmosférica, relacionada com o grave problema de aquecimento global que atinge o nosso planeta. Estes fatos têm se tornado cada vez mais importantes no mundo, afetando tanto as questões ambientais, econômicas, e outras que envolvem a segurança mundial e as políticas de produção e comercialização do petróleo e seus derivados.

Diante dessa problemática, tem-se apresentado um crescente interesse por fontes alternativas de energia, destacando-se os empreendimentos realizados pelo Brasil e Estados Unidos no desenvolvimento de projetos para a produção do biocombustível etanol com base em resíduos agroindustriais oriundos da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente. Atrelados a esse interesse pelo etanol encontram-se: a indústria automobilística, com vendas crescentes de veículos movidos a etanol e tipo “FLEX” (utilizam qualquer mistura

etanol:gasolina); os governos, com diversas regulamentações que aumentam gradativamente o teor de etanol em gasolina; e a indústria de biotecnologia, com enzimas e microrganismos cada vez mais eficientes e visando diminuir o seu custo. A sinergia criada entre esses setores vem aumentando acentuadamente a demanda por novas tecnologias para produção, consumo e pesquisa/desenvolvimento na área dos biocombustíveis.

Os atuais projetos de investigação, relacionados com a produção de etanol, objetivam o desenvolvimento de processos que permitam o aproveitamento eficiente de resíduos lignocelulósicos, matéria-prima abundante e de baixo custo, em processos caracterizados por apresentarem produtividades iguais ou superiores àquelas dos processos existentes.

Especificamente no Brasil, atualmente o segundo maior produtor mundial de etanol, são gerados anualmente como sub-produto da moagem de cana-de-açúcar, aproximadamente, 166 milhões de toneladas de bagaço de cana sendo a maior parte utilizada para geração de vapor e eletricidade. Porém, entre 10 a 15% do bagaço não possuem destinação apropriada e é considerado como resíduo (FAIRBANKS, 2003; LAMONICA, 2005; MAPA, 2010). Além disso, empresas especializadas no desenvolvimento de equipamentos para usinas produtoras de etanol asseguram que, com a implementação de estratégias de integração energética e o uso de caldeiras de última geração, o excedente do bagaço poderia atingir a marca de 78% (FAIRBANKS, 2003).

O bagaço de cana apresenta-se, então, como um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial para produção de etanol e outros produtos de interesse, dentro do conceito denominado de "*Biomass Refinery*" ou "Biorrefinaria". Este conceito baseia-se na separação seletiva das frações do material lignocelulósico de acordo com suas características químicas e/ou dos produtos desejados a serem obtidos. Direcionados por esse conceito, pode-se afirmar que a hemicelulose e a celulose, principais frações estruturais do bagaço de cana, representam uma fonte potencial de xilose e glicose, respectivamente. Porém, a obtenção desses açúcares requer a aplicação de técnicas que permitam a sua extração seletiva.

No caso da disponibilização seletiva de xilose, a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana, são utilizadas diferentes metodologias para sua geração, entre as quais se destaca o pré-tratamento ácido. Com a aplicação

dessa metodologia, embora eficiente, são obtidos hidrolisados que apresentam níveis de toxicidade prejudiciais à fermentação por leveduras.

A presente pesquisa de doutorado teve como objetivo geral a otimização do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar visando à obtenção de um hidrolisado prontamente fermentável para a produção de etanol a partir do aproveitamento da xilose. A pesquisa insere-se nos estudos desenvolvidos nos Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ, coordenados pelo professor Nei Pereira Jr., direcionados ao aproveitamento integral do bagaço de cana por via biotecnológica.

Este texto está estruturado em seis capítulos e duas seções finais, na primeira parte listam-se todas as referências bibliográficas consultadas e na última apresentam-se, como anexos, os artigos publicados em periódicos indexados em bases internacionais.

Após este capítulo, de cunho introdutório, discorre-se sobre a revisão bibliográfica (Capítulo 2) desta temática, na qual é contextualizada a problemática energética e a inserção, cada vez maior, dos biocombustíveis na matriz energética mundial. Dentre os biocombustíveis, destaca-se o bioetanol, que já se constitui em realidade industrial, tendo as suas metodologias de produção a partir de matérias-primas sacaríneas (Brasil) e amiláceas já bem estabelecidas e mostra-se como a produção a partir de materiais lignocelulósicos, etanol de segunda geração, é uma das tendências mais promissoras para desenvolvimento tecnológico sob diferentes concepções. Adicionalmente, estabelece-se a composição química e características dos materiais lignocelulócos, ressaltando-se os resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais.

Na sequência, o Capítulo 3 define o objetivo geral e os específicos, bem como as justificativas para a consecução do presente trabalho.

O Capítulo 4 descreve os materiais e métodos empregados para a realização deste trabalho, aprofundando-se nas técnicas aplicadas e melhoradas para o pré-tratamento ácido, os planejamentos experimentais utilizados, equipamentos e sistemas empregados na realização dos experimentos e as metodologias analíticas desenvolvidas para quantificar todas as variáveis de respostas escolhidas para cada etapa da pesquisa.

Os resultados e discussões são apresentados no Capítulo 5, começando com o aprimoramento da técnica de mistura do bagaço de cana, e suas

características granulométricas, com solução ácida. Posteriormente, determinam-se as condições do pré-tratamento ácido que maximizam a concentração de xilose e a eficiência da hidrólise e minimizam a concentração de inibidores para se obter hidrolisados com alta fermentabilidade. Apresentam-se, também, as fermentações realizadas para quantificar o potencial dos hidrolisados e a levedura *Pichia stipitis* na fermentação alcoólica e abordam-se experimentos de co-fermentação de misturas xilose-glicose, provenientes das frações polissacarídeas do bagaço. Adicionalmente, são relatados os resultados dos experimentos relacionados com a fermentação sequencial de xilose proveniente de hemicelulose, utilizando *Pichia stipitis*, e glicose proveniente de celulose, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Finalmente, as conclusões e sugestões contidas no Capítulo 6, indicam o avanço decorrente do desenvolvimento deste trabalho no aproveitamento da fração hemicelulósica do bagaço de cana para a produção de etanol de segunda geração, bem como sinalizam-se questões para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

Com o desenvolvimento desta tese foi possível publicar dois artigos em periódicos indexados, depositar uma patente em conjunto com a PETROBRAS e apresentar diversos trabalhos completos em eventos científicos e tecnológicos, tanto relacionados diretamente com o conteúdo deste trabalho quanto aplicações decorrentes desta pesquisa em estudos com outros materiais lignocelulósicos, como os relacionados a seguir:

Artigos em periódicos indexados:

Gabriel J. Vargas Betancur & Nei Pereira Jr. (2010) Sugar Cane Bagasse as Feedstock for Second Generation Ethanol Production. Part I: Diluted Acid Pretreatment Optimization. Electronic Journal of Biotechnology, *in press*.

Gabriel J. Vargas Betancur & Nei Pereira Jr. (2010) Sugar Cane Bagasse as Feedstock for Second Generation Ethanol Production. Part II: Hemicellulose Hydrolysate Fermentability. Electronic Journal of Biotechnology, *in press*.

Patente depositada:

Lídia Maria Melo Sant´anna, Nei Pereira Junior, **Gabriel Jaime Vargas Betancur**, Juliana Vaz Bevilaqua, Absai da Conceição Gomez, Emerson Pires Menezes (2007) Processo de Produção de Etanol a Partir do Hidrolisado da

Fração Hemicelulósica do Bagaço de Cana-de-açúcar em Reator Tipo Prensa. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, PI 0505299-8A.

Trabalhos completos em congressos:

G. J. V. Betancur; A. S. Lima; P. G. De melo; A. S. Dos santos, N. Pereira Jr. (2006) Otimização da Hidrólise Ácida da Fração Hemicelulósica do Bagaço de Cana Visando a Obtenção de Hidrolisados com Alto Conteúdo de Xilose para Produção de Etanol por Via Biotecnológica. Anais: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, pp. 893-900

P. G. de Melo; A. S. Lima; **G. J. V. Betancur**; N. Pereira Jr (2006) Aumento na Eficiência da Fermentação Alcoólica de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana não Destoxificado por Implementação de Propagação Celular Sequencial, Anais: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, pp. 2713-2719

M. P. Vásquez, **G. J. Vargas**, J. N. Silva, P. G. Melo; M. B. Souza Jr., N. Pereira Jr. (2006) Evaluación del Potencial Biotecnológico del Follaje de Caña de Azúcar Para la Producción de Etanol. Anais: XXII Congreso Latinoamericano de Ingeniería Química, código 27-006 (179) 16 p.

Gabriel Jaime Vargas Betancur & Nei Pereira Jr. (2007) Aproveitamento de Biomassas Residuais para Produção de Etanol: Materiais Lignocelulósicos. XI IFNOPAP, 28 a 30 de junho, Ponta de Pedras (PA). Anais.

Gabriel Vargas Betancur, Patrycia Garcia de Melo & Nei Pereira Jr. (2007) Hidrólise Ácida da Hemicelulose de Bagaço de Cana: Influência da Acidez e a da Relação Sólido:Líquido. Anais: XVI Simpósio Brasileiro de Bioprocessos, código PFE0519, 8 p.

Gabriel J. Vargas Betancur, Felipe Peres Oliveira, Neumara Luci Conceição Silva, Nei Pereira Jr. (2009) Optimization of the Diluted Acid Pretreatment of Sugarcane Bagasse at High Solid:Liquid Ratio for Ethanol Production from the Hemicellulosic Hydrolysated by *Pichia stipitis*. Anais: IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas.

Patrycia G. de Melo, Kelly C. N. R. Pedro, **Gabriel Vargas Betancur**, Nei Pereira Jr. (2009) Avaliação do Potencial Biotecnológico de Palha de Cana-de-Açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração. Anais: IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas.

Felipe Peres Oliveira, Ludymilla Bastos Rocha de Souza, **Gabriel Jaime Vargas Betancur**, Nei Pereira Jr. (2009) Avaliação da Evolução Direcionada no Desempenho da Linhagem *Pichia stipitis* na Fermentação Alcoólica de Hidrolisados Hemicelulósicos de Bagaço de Cana. Anais: IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são brevemente apresentados alguns aspectos teóricos referentes à temática abordada: o etanol, a demanda energética e o futuro dos combustíveis fósseis. Adicionalmente, são destacados aspectos referentes ao bagaço de cana como matéria-prima para a produção de etanol e sua utilização para a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose, assim como algumas características relevantes ao processo de aproveitamento do material lignocelulósico.

2.1 ENERGIA E DESENVOLVIMENTO

O rápido crescimento populacional atrelado ao desenvolvimento industrial tem aumentado aceleradamente a demanda mundial por energia e, consequentemente, por fontes alternativas ambientalmente mais amigáveis (NAIK *et al.*, 2010). Atualmente, a maior parte da energia consumida no mundo provém de fontes não renováveis (carvão, óleo, gás natural e principalmente petróleo), como observado na Figura 2.1, as quais poderão ser esgotadas rapidamente se não for racionalizado seu uso (SAXENA *et al.*, 2007). Esta

problemática já ocasiona uma grande instabilidade no mercado destas fontes. Como exemplo, pode-se destacar a previsão de uma total depleção do petróleo nos próximos 40 anos (ODAC, 2007 *Apud* PEREIRA Jr. *et al.* 2008), e as fortes variações no preço internacional do barril que no período entre julho e dezembro de 2008 oscilou entre US$137,11 e US$34,57, encontrando-se atualmente em torno dos US$ 75 e tendo como previsão retornar a valores acima dos US$100 nos próximos anos (PEREIRA *et al.*, 2008; EIA, 2010).

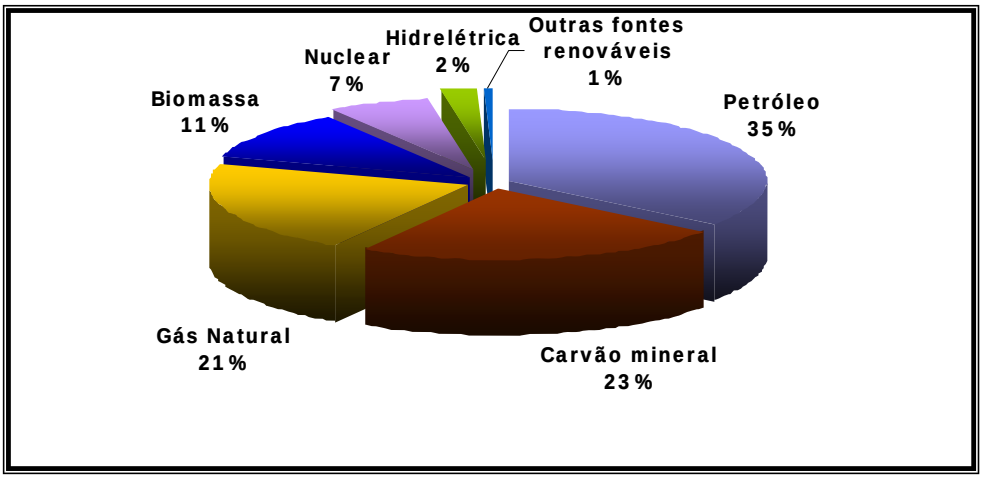


Figura 2.1 Matriz energética mundial
Fonte: MAPA (2009)

Adicionalmente, a queima de combustíveis fósseis, para a obtenção de energia, emite uma grande quantidade de gases para a atmosfera, entre os quais é majoritário o CO_2, que vem deteriorando o meio ambiente e é apontado como o principal responsável pelo aquecimento global. Como uma resposta a todas estas problemáticas, existem iniciativas que visam à redução na emissão de gases geradores do efeito estufa, entre as quais se destaca o Tratado de Kyoto, o qual definiu mecanismos e limites para a redução nas emissões e criou um mercado que permite aos paises geradores a compra de "créditos de carbono" dos países que consigam reduzir suas emissões (PEREIRA Jr., *et al.* 2008; NAIK *et al.*, 2010).

Sob este contexto econômico e ambiental pode-se afirmar que a produção energética mundial deverá ser direcionada ao aumento na utilização de fontes renováveis de energia, entre as quais se destaca a utilização de biomassas mediante diferentes tecnologias, algumas ainda em desenvolvimento, apresentando vantagens como (SAXENA *et al.*, 2007; NAIK *et al.*, 2010):

- √ Permitir a valorização de materiais considerados como resíduos;
- √ São fontes renováveis, potencialmente sustentáveis e com menores danos ao meio ambiente;
- √ Existe uma enorme diversidade de biomassas, o que oferece novas oportunidades de desenvolvimento;
- √ Uma grande parte das biomassas são consideradas produtos indesejados e sua utilização reduziria, significativamente, o tratamento de efluentes e de resíduos;
- √ A combustão de biomassas gera quantidades insignificantes de dióxido de enxofre e, consequentemente, pouco contribui para geração de chuva ácida;
- √ A geração de cinzas pela combustão de biomassas é menor à reportada para o carvão e, adicionalmente, estas cinzas podem ser utilizadas como adubo em cultivos agrícolas;
- √ Possuem um preço baixo e, sendo produtos domésticos, dependem menos de taxações e flutuações dos mercados mundiais;
- √ Sua utilização sinaliza uma alternativa para prevenir e remediar o aumento nas emissões de dióxido de carbono, não contribuindo significativamente ao aquecimento global;
- √ Favorecer a redução da pressão sobre as reservas naturais.

Dentre as biomassas podem ser contemplados todos os sólidos de caráter biológico gerados em processos naturais ou atropogênicos, os quais compreendem: madeiras e resíduos madeireiros, ervas, resíduos agrícolas e agroindustriais, plantas aquáticas e algas, resíduos animais, resíduos da fabricação de alimentos, entre outros (DEMIRBAS *et al.*, 2009; VASSILEV, *et al.*, 2010). Estima-se que no mundo são produzidas ao redor de 100 bilhões de toneladas de biomassas (base seca) provenientes do uso da terra e 50 bilhões de toneladas de biomassas de origem aquática (NAIK *et al.*, 2010).

As biomassas de caráter lignocelulósico destacam-se por corresponderem, aproximadamente, aos 50% das existentes. Para se ter uma idéia da abundância destes materiais pode-se ressaltar resíduos como a palha de arroz, o bagaço de cana e a palha de trigo, os quais são gerados, mundialmente, na ordem dos 750, 400 e 300 milhões de toneladas por ano, respectivamente (PEREIRA, 2006).

Neste cenário, o número de pesquisas desenvolvidas para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos tem aumentado aceleradamente,

visando substituir matérias-primas fósseis por renováveis, como uma das principais tendências da biotecnologia dentro do conceito de Biorrefinaria. Consegue-se assim, dar um caráter de matéria prima valiosa a um material tradicionalmente descartado (SUN & CHENG, 2002; PEREIRA Jr. *et al.*, 2008). Adicionalmente, existem esforços focados na modificação genética de plantas, com o objetivo de facilitar o aproveitamento dos componentes básicos da parede celular para a obtenção de produtos de interesse industrial (MANSFIELD, 2009).

2.2 O ETANOL

O etanol é um líquido incolor e volátil, de odor ardente característico, facilmente inflamável, de chama azulada que não gera fuligem, e muito higroscópico; sua pureza habitualmente é medida por grau Gay Lussac[1]. No estado desidratado é perfeitamente miscível com substâncias orgânicas ou minerais como ésteres, carburantes e acetonas entre outros. Outras características desta substância encontram-se sumarizadas na Tabela 2.1 (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Tabela 2.1 Características do etanol

Fórmula molecular	CH_3CH_2OH
Massa molecular	46 u.m.a.
Massa específica (20°C)	0,7894 g/mL
(15°C)	0,7942 g/mL
Densidade API	47,1
Índice de refração (20°C)	1,3619
Temperatura de ebulição (1 atm)	78,32°C
Temperatura de fusão (1 atm)	-117,22°C
Temperatura de inflamação	12°C
Limite de estabilidade	300°C
Tensão de vapores (0°C)	12,00 mmHg
(20°C)	44,00 mmHg
Calor latente	921096,00 J/kg
Octanagem aparente (ASTM)	99
Índice de cetano aparente	10
Razão ar:combustível	9,0:1

Adaptado de SOMAVILLA & GOMES NETO (2005)

[1] Quantidade em mililitros de álcool absoluto contida em 100 mililitros de mistura hidro-alcoólica.

2.2.1 Aplicações do etanol

O etanol foi, inicialmente, utilizado para a produção de bebidas alcoólicas, vinagres e conservas. Atualmente, é aplicado na indústria de fármacos, perfumes e cosméticos; na fabricação de corantes e vernizes, materiais explosivos, seda artificial e materiais plásticos, além da sua aplicação como matéria-prima de produtos da química fina. O etanol é utilizado, também, em iluminação e aquecimento; na produção de éter para misturas com carburantes e na fabricação de borracha sintética (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

No entanto, sendo o etanol uma fonte líquida de energia facilmente estocável, com alto conteúdo de oxigênio (35%) e combustão limpa, tem seu maior potencial de aplicação na área dos combustíveis, sendo utilizado como substituto da gasolina, como aditivo da mesma e/ou como insumo na produção de biodiesel (CRUEGER & CRUEGER, 1993; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Como outra possível aplicação, pesquisas estão sendo desenvolvidas visando a utilização do etanol como fonte de hidrogênio para sua aplicação nas denominadas células a combustível, aproveitando sua relação carbono/hidrogênio, com alto teor de hidrogênio (uma relação de 6 átomos de hidrogênio para cada 2 átomos de carbono, ou seja 1:3) e vantagens quanto a questões ambientais e de manipulação que o etanol apresenta sobre o metano, que é a substância com a melhor relação carbono/hidrogênio (1:4) (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Cabe destacar que a utilização de etanol apresenta as seguintes vantagens:

- É uma substancia que pode ser obtida com alto grau de pureza;
- Fácil transporte e estocagem;
- Facilmente miscível com água;
- Baixo perigo de explosão;
- Agente desinfetante;
- Facilmente oxidável;
- Apresenta uma elevada biodegradabilidade;
- Pode ser utilizado como substrato em processos biotecnológicos.

Na Figura 2.2 são apresentadas as aplicações mais comuns para o etanol e alguns dos produtos derivados deste álcool, assim como algumas das substâncias obtidas por meio de biotransformação microbiana.

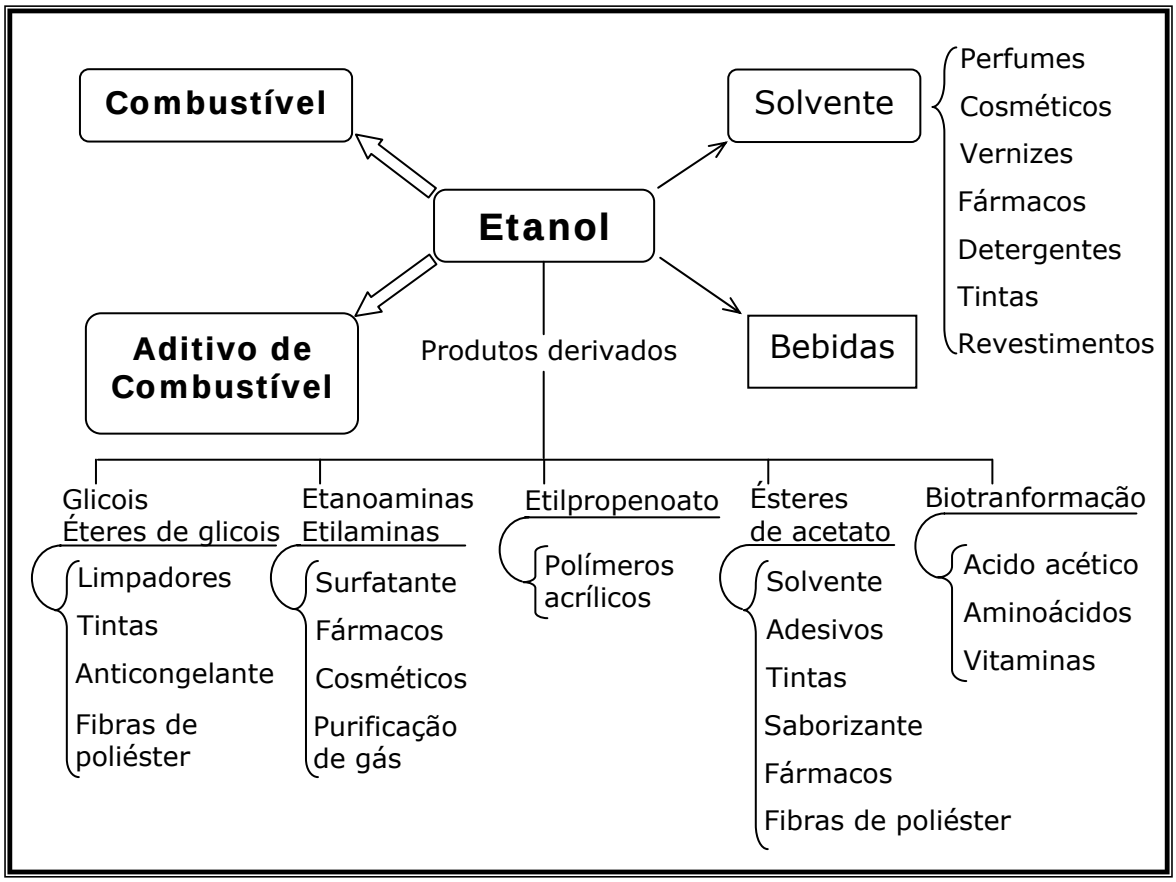


Figura 2.2 Aplicações do etanol

2.2.2 Vantagens da inserção do etanol no mercado energético e sua influência no melhoramento do ambiente

A utilização do etanol como combustível em veículos leves, assim como aditivo na gasolina, decorre da necessidade estratégica de reduzir a dependência do setor de transporte por combustíveis fósseis (SANTOS, 2002). Esta necessidade torna-se cada vez maior com o aumento progressivo, e em alguns períodos aumentos excessivos, no preço do petróleo (EIA, 2010).

Além de ser uma alternativa aos combustíveis fósseis, o álcool hidratado e a mistura etanol-gasolina apresentam diversas vantagens ambientais. Por exemplo, quando utilizado como combustível, comparado à gasolina, há uma redução nas emissões de óxidos de enxofre, CO_2, particulados e outras substâncias poluentes como CO, hidrocarbonetos e NO_X (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; SANTOS, 2000a). Cabe destacar que, no caso de combustão incompleta, o acetaldeído gerado pelo uso do etanol é menos agressivo para a

saúde humana, e para a natureza, quando comparado ao formaldeído gerado com a utilização da gasolina.

Em matéria ambiental, a utilização do etanol como combustível permite uma redução do desbalanceamento global no ciclo do carbono, fenômeno gerado pelo uso dos combustíveis fósseis e, consequentemente, do "efeito estufa". Esta redução no desbalanceamento no ciclo do carbono, explica-se pela absorção de CO_2 atmosférico realizado pelas plantas, fontes de açúcares a serem fermentados para a obtenção do etanol, durante o processo de fotossíntese. Adicionalmente, a absorção de carbono, embora temporária, pode ser catalogada dentro dos créditos de carbono previstos no Tratado de Kyoto, tornando-se negociáveis com países poluidores (FAIRBANKS, 2003; PEREIRA Jr. *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 2010). Algumas estimativas indicam que a indústria canavieira brasileira é potencialmente responsável por uma redução de 9,5 milhões de toneladas de CO_2 atmosférico, correspondente a 18% das emissões geradas pela utilização dos combustíveis fósseis (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005). Porém, a utilização de queimadas durante a colheita, que deve ser reduzida segundo regulamentações governamentais, é ainda muito discutida.

Como mais uma vantagem ambiental, pode-se ressaltar que, no caso de derramamentos ou vazamentos, o etanol não apresenta os enormes prejuízos ambientais gerados pelos combustíveis fósseis tradicionais (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Outra vantagem, ao se comparar o etanol com combustíveis derivados do petróleo, é a possibilidade de produção local. Em outras palavras, o etanol pode ser produzido onde for necessário, utilizando materiais agroindustriais característicos de cada lugar, enquanto o petróleo só pode ser extraído de lugares específicos e acaba sendo submetido a diferentes taxações para sua comercialização (FERREIRA, 2002; LAWRENCE, 2010).

A crescente demanda de etanol, aliada ao rápido crescimento populacional, aos progressos tecnológicos referentes à produção, uso e abastecimento, e as vantagens ambientais numeradas com sua utilização, fazem do etanol um combustível alternativo com um futuro altamente promissor (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; NAIK *et al.*, 2010).

Além disto, o uso de etanol como aditivo da gasolina permitiu a substituição de aditivos químicos como o chumbo tetraetila, gerador de poluentes altamente tóxicos e precursores de chuva ácida; o MTBE (éter metílico

terc-butílico), ETBE (éter etílico terc-butílico) e o TAME (éter metílico terc-amílico), que levam ao alto desgaste no motor e à geração de subprodutos fortemente prejudiciais para a saúde humana. A quantidade de etanol adicionada à gasolina varia entre 5 e 24% permitindo melhoras no desempenho dos motores de combustão interna (NAIK *et al.*, 2010).

2.2.3 Mercado mundial

No ano 2009 foram produzidos, no mundo, 73,9 milhões de m^3 de etanol, sendo os Estados Unidos e o Brasil os maiores produtores, atualmente responsáveis por 85% do abastecimento, como pode se verificar na Figura 2.3 (RFA, 2010). Porém, cabe destacar que os custos de produção de etanol com a tecnologia brasileira é 39% menor que com a tecnologia norte-americana, devido à necessidade de etapas mais extensivas para o processamento do milho, matéria-prima base nos Estados Unidos (FAIRBANKS, 2003; SIMÕES, 2006).

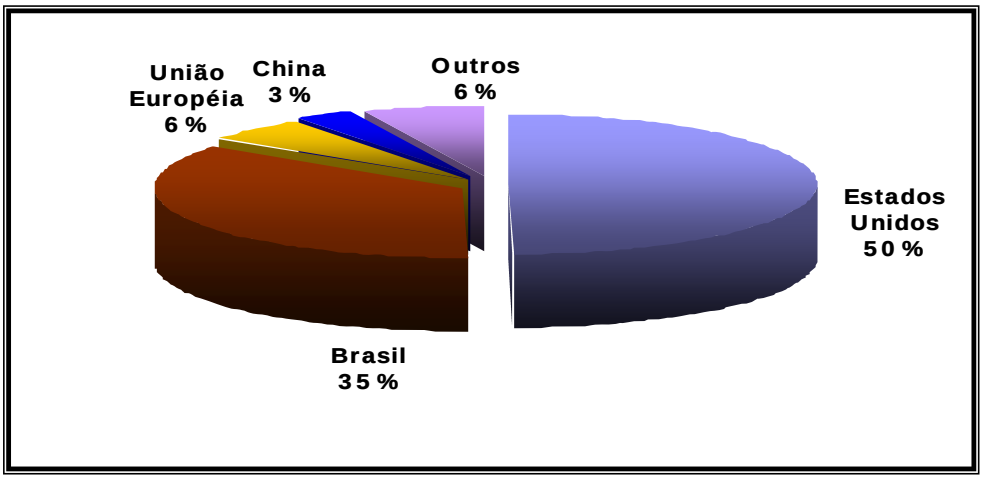


Figura 2.3 Participação do Brasil na produção mundial de etanol
Fonte: RFA – Renewable Fuels Association- (2010)

No caso dos outros países produtores, as estimativas contemplam um crescimento na produção superior a 100%, magnitude justificada nos aumentos na demanda provocados pela implantação de leis que regulamentaram a adição de etanol na gasolina em diferentes regiões do mundo. Só nos EUA estima-se uma produção de etanol, para 2015, de 56 milhões de m^3 a partir de fontes tradicionais (milho) e de 21 milhões de m^3 a partir de celulose, enquanto no Brasil a demanda de etanol, para 2013, deve atingir os 32 milhões de m^3

(FAIRBANKS, 2003; RFA, 2010; BERG, 2001; AGOCF, 2003; PEREIRA Jr. *et al.*, 2008; BOIN, 2010).

2.2.4 O contexto brasileiro

2.2.4.1 Uso de etanol como aditivo e combustível

No Brasil, o uso do AEAC (álcool etílico anidro combustível) começou a ser obrigatório em toda a gasolina comercializada, numa proporção de 5% (v/v), a partir de 1931. A porcentagem utilizada tem sido alterada segundo as políticas energéticas de cada época e em função dos preços internos e externos do açúcar, do etanol e da gasolina. Diferentes estágios relevantes ao uso de etanol no Brasil encontram-se sumarizados na Tabela 2.2 (SANTOS, 2000a; SCHMIDELL *et al.*, 2001a, ANFAVEA, 2009).

Tabela 2.2 Períodos relevantes no desenvolvimento do mercado do etanol no Brasil

Ano	Acontecimento
1931	Foi decretada obrigatória uma proporção de 5% (v/v) de AEAC na gasolina
1966	Foi elevado o limite de álcool de 5 para 10% (v/v)
1975	Criação do programa PROALCOOL visando a utilização do AEHC como substituto da gasolina em veículos leves
1985	Pesquisas coordenadas pela Petrobrás estabelecem um patamar de 22% (v/v) de AEAC na gasolina
1990	Redução do patamar do álcool para 13% (v/v) devido à crise generalizada do setor sucroalcooleiro
1994	Oficialização de um teor de 22% (v/v) de AEAC na gasolina
1997	O teor foi alterado para 24% (v/v) de AEAC
1999	A porcentagem de AEAC é aumentada para 26% (v/v)
2000	Argumenta-se que os motores a gasolina toleram até 30% (v/v) de AEAC
2003	Aparecem no mercado veículos com o sistema tipo "Flex" que permitem o uso de todas as misturas etanol-gasolina

AEAC (álcool etílico anidro combustível)
AEHC (álcool etílico hidratado combustível)
PROALCOOL (Programa Nacional do Álcool)

Deve-se destacar que em 1975 foi implantado o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) na procura da utilização de fontes energéticas alternativas à gasolina, fundamentado na possibilidade de ampliação dos cultivos de cana-de-açúcar, na sua característica renovável e na tecnologia existente no país na época. Com o PROALCOOL conseguiu-se reduzir o déficit na balança comercial brasileira a partir da substituição parcial da gasolina, como combustível em veículos leves, por uma fonte nacional renovável: o álcool etílico hidratado (AEHC) (GIANNINI, 1997).

Nos últimos anos, a quantidade de álcool etílico anidro (AEAC) adicionada à gasolina tem variado entre os 20 e 25% em volume, segundo as necessidades de reservas e preços do álcool no mercado (SANTOS, 2000b; OLIVEIRA *et al.*, 2006; ANP, 2010). Além dos aumentos na proporção do AEAC na gasolina, o PROALCOOL impulsionou o mercado de veículos a álcool, principalmente, na década de 80, quando a produção destes veículos superou a produção de veículos a gasolina (Figura 2.4). Porém, com a crise da década de 90, o mercado de veículos a álcool diminui, retomando crescimento a partir de 2001. Contudo, a partir do ano 2003, com o desenvolvimento dos motores tipo "Flex", que permitem o uso de misturas etanol-gasolina de qualquer grau, veículos com este tipo de motor tornam-se dominadores do mercado, correspondendo ao 85% dos veículos leves produzidos em 2009 (Figura 2.4)(ANFAVEA, 2009).

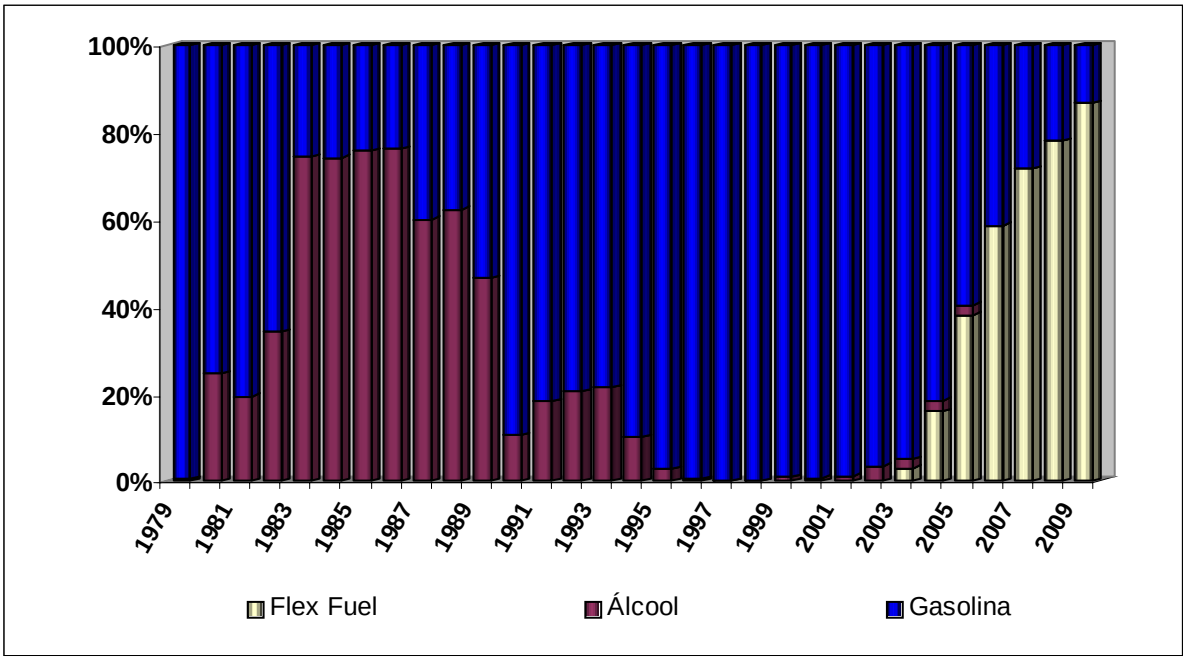


Figura 2.4 Relação de produção de veículos no Brasil segundo o tipo de combustível
Fonte: ANFAVEA (2009)

2.2.4.2 Aspectos sócio-econômicos da implantação do álcool combustível no Brasil

O desenvolvimento promovido pelo PROALCOOL permitiu ao Brasil economizar 1,8 bilhões de dólares por ano (equivalentes à utilização de 200 mil barris de gasolina por dia); movimentar uma frota de veículos movidos a álcool de 2,5 milhões de unidades; contribuir com 16% da matriz energética renovável do país; e promover o Brasil como um dos maiores produtores e exportadores de álcool no mundo (SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; FAIRBANKS, 2003).

Tecnologicamente, o PROALCOOL possibilitou a modernização técnica das usinas de etanol, do sistema de distribuição do biocombustível e do setor agrícola a ele ligado, assim como impulsionou o desenvolvimento dos motores para a utilização do etanol como combustível e dos motores *Flex Fuel*, tornando o Brasil referência mundial (SCHMIDELL *et al.*, 2001b; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005).

Em termos sociais, o setor sucro-alcooleiro é um dos maiores empregadores do Brasil, com mais de 1,28 milhões de trabalhadores diretos (2,15% dos trabalhadores do país) e cerca de 3,01 milhões de indiretos, mantendo mão-de-obra no campo e descentralizando grandes investimentos (SANTOS, 2002; NEVES *et al.*, 2009).

2.2.4.3 Produção de etanol no Brasil

A produção de etanol no Brasil iniciou-se em 1931 com as sobras de melaço da indústria do açúcar, no intuito de ampliar a capacidade produtiva das usinas. Entre 1939 e 1945, devido à falta de gasolina ocasionada pela guerra, iniciou-se a produção em larga escala que, posteriormente, foi impulsionada pelas condições dos mercados de petróleo e açúcar, com a implantação do programa PROALCOOL na metade da década dos 70, passando de 700 mil m^3 entre 1970 e 1975, para 2,5 milhões em 1979, alcançando os 27,7 milhões de m^3 na safra 2008/2009, como mostrado na Figura 2.5 (SCHMIDELL *et al.*, 2001a; MAPA 2009).

Atualmente, estima-se que o setor apresenta uma produtividade de 82 litros de etanol por tonelada de cana, tendo o estado de São Paulo como responsável por 60% da produção. Mundialmente, o Brasil é o detentor dos

maiores índices técnicos, econômicos e ambientais na produção de álcool (FERREIRA, 2002; ANP, 2010; MAPA, 2009).

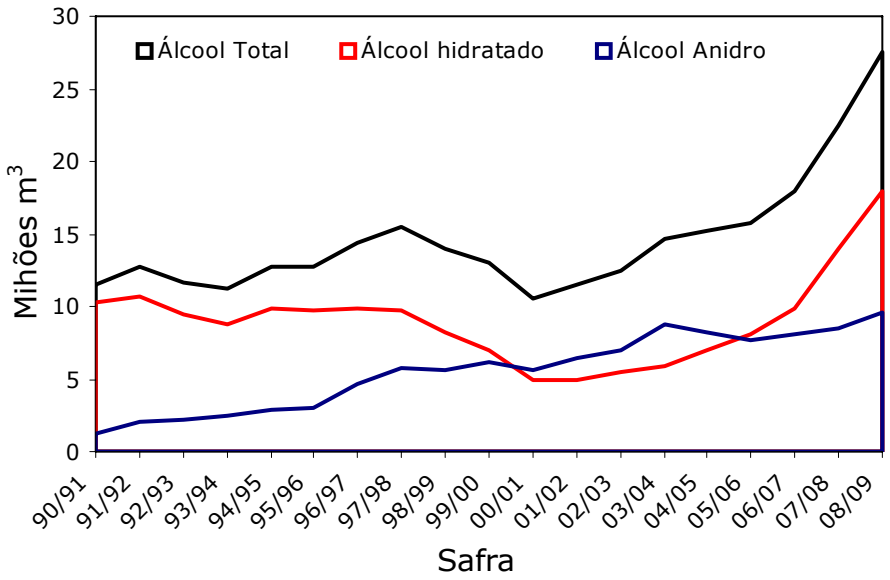


Figura 2.5 Produção de etanol no Brasil nos últimos anos
Adaptado de MAPA (2009) e de UNICA (2005).

2.2.4.4 Resíduos lignocelulósicos no Brasil

O Brasil, dadas suas características agrícolas, é um dos países com maior potencial para o aproveitamento e desenvolvimento de tecnologias baseadas na utilização de materiais lignocelulósicos como matéria prima. Aproximadamente, 350 milhões de toneladas de resíduos agrícolas e agroindustriais são produzidos a cada ano no Brasil, originados, principalmente, do cultivo de cana-de-açúcar (que gera como resíduo bagaço e palha) e de soja (PEREIRA, 2006).

O cultivo de cana-de-açúcar começou no Brasil, no século XVII, com o intuito de produzir açúcar e romper com o monopólio promovido pela França. No início da década de 70, a produção atingiu os 50 milhões de toneladas e, com a implantação do PROALCOOL, este valor quadruplicou no ano de 1985 (MOREIRA & GOLDEMBERG, 1999). A partir desse ano, a produção de cana-de-açúcar tem apresentado um comportamento variável em cada safra, com uma tendência global de crescimento, como pode ser observado na Figura 2.6, principalmente após 2001, como resposta ao aumento nos preços do petróleo e o interesse mundial pelos biocombustíveis.

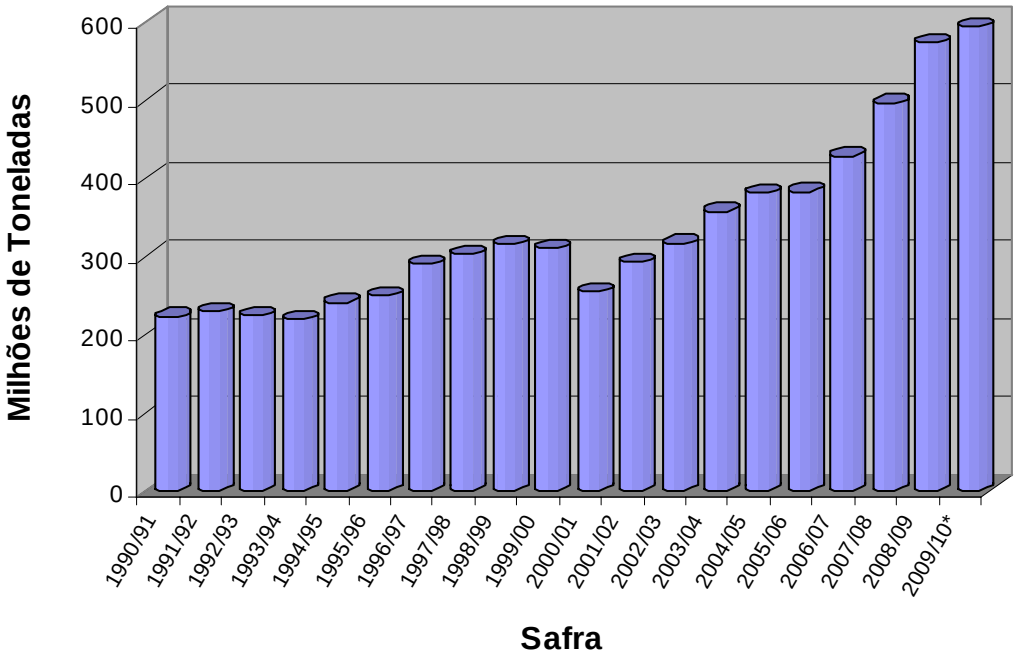


Figura 2.6 Produção de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos anos
* Valor acumulado até 01/03/2010
Fontes: UNICA (2005) -dados de 1990 a 1993-
MAPA (2010) -dados de 1994 a 2010-

Com a moagem da cana-de-açúcar para a extração do suco de cana, geram-se grandes quantidades de bagaço de cana. Segundo Lamonica (2005), assim como a palha, o bagaço compõe, em média, 28% do peso da cana-de-açúcar, ou seja, a cada tonelada de cana processada, 280 kg de bagaço com 50% de umidade são gerados. Este material é atualmente utilizado para a produção de vapor e eletricidade, em processos pouco eficientes, devido à inexistência de aplicações mais atraentes. Apesar deste uso, entre 10% e 15% do bagaço é considerado como excedente (resíduo) do processo (FAIRBANKS, 2003).

A existência de processos de monomerização eficientes, unida à integração energética das usinas, que inclui o uso de caldeiras mais eficientes (já existentes), e à substituição de parte do bagaço queimado por outros materiais, como palha ou lignina, permitiriam uma disponibilidade de bagaço próxima a 78% do obtido no processo de moagem. Esse maior excedente poderia ser destinado a etapas de pré-tratamento e, posterior, transformação em substâncias de maior interesse, melhorando a produtividade das indústrias sem aumento nas áreas de plantio. No caso brasileiro, estima-se que o bagaço

excedente, se fosse utilizado para a produção de etanol, permitiria duplicar a produção no país (PEREIRA, 2006).

2.2.5 Processos para produção de etanol

Desde os tempos antigos, o álcool foi produzido por meio de diversos processos artesanais de fermentação, principalmente, na produção de bebidas para o consumo humano. Posteriormente, com o desenvolvimento da microbiologia industrial, o álcool foi produzido em quantidades que permitiram seu uso como combustível e matéria-prima para a obtenção de diversos produtos químicos (CRUEGER & CRUEGER, 1993). Assim, atualmente, o etanol é obtido utilizando-se três vias: degradativa, fermentativa e sintética, sendo o processo de fermentação o mais utilizado por ser mais econômico (SCHMIDELL *et al.*, 2001a; NAIK *et al.*, 2010).

2.2.5.1 Etanol de primeira geração

Atualmente, são utilizadas matérias-primas sacaríneas e amiláceas, como o caldo extraído da cana-de-açúcar (no Brasil) ou do amido extraído de milho (nos Estados Unidos), para a produção de etanol, denominado de primeira geração, em processos já consolidados (FAIRBANKS, 2003; MOSIER *et al.*, 2005a; NAIK *et al.*, 2010). Na Figura 2.7 é apresentado um diagrama de blocos para a obtenção de etanol a partir de diferentes matérias-primas, no qual se podem observar as etapas comuns aos diferentes processos.

Em termos gerais, o processo de bioprodução de etanol pode ser sintetizado da seguinte forma: a matéria-prima, seja qual for sua origem, é submetida a um pré-tratamento e adequação para a liberação de glicídios que são, subsequentemente, metabolizados por um agente biológico adequado para a produção do etanol que, posteriormente, é purificado (MOSIER *et al.*, 2005a; BON *et al.*, 2008). Esses pré-tratamentos, físicos, químicos ou enzimáticos, dependem do tipo de matéria-prima e do agente biológico a ser utilizado. Após a degradação do substrato, por meio de uma sequência de reações, o agente biológico é separado do meio fermentado e reaproveitado ou direcionado a processos de adequação para sua disposição final. O líquido é destilado no intuito de concentrar o etanol até um nível determinado ou até o limite possível, o

azeótropo etanol-água (95,5% etanol). Esse azeótropo é comumente comercializado como etanol hidratado, sendo possível a obtenção de etanol anidro, por meio de processos de desidratação como o arraste com ciclohexano ou o uso de absorventes regeneráveis, utilizado como aditivo da gasolina, entre outras aplicações (MAIORELLA *et al.*, 1983; LEAL, 1998; SOMAVILLA & GOMES NETO, 2005; BON *et al.*, 2008).

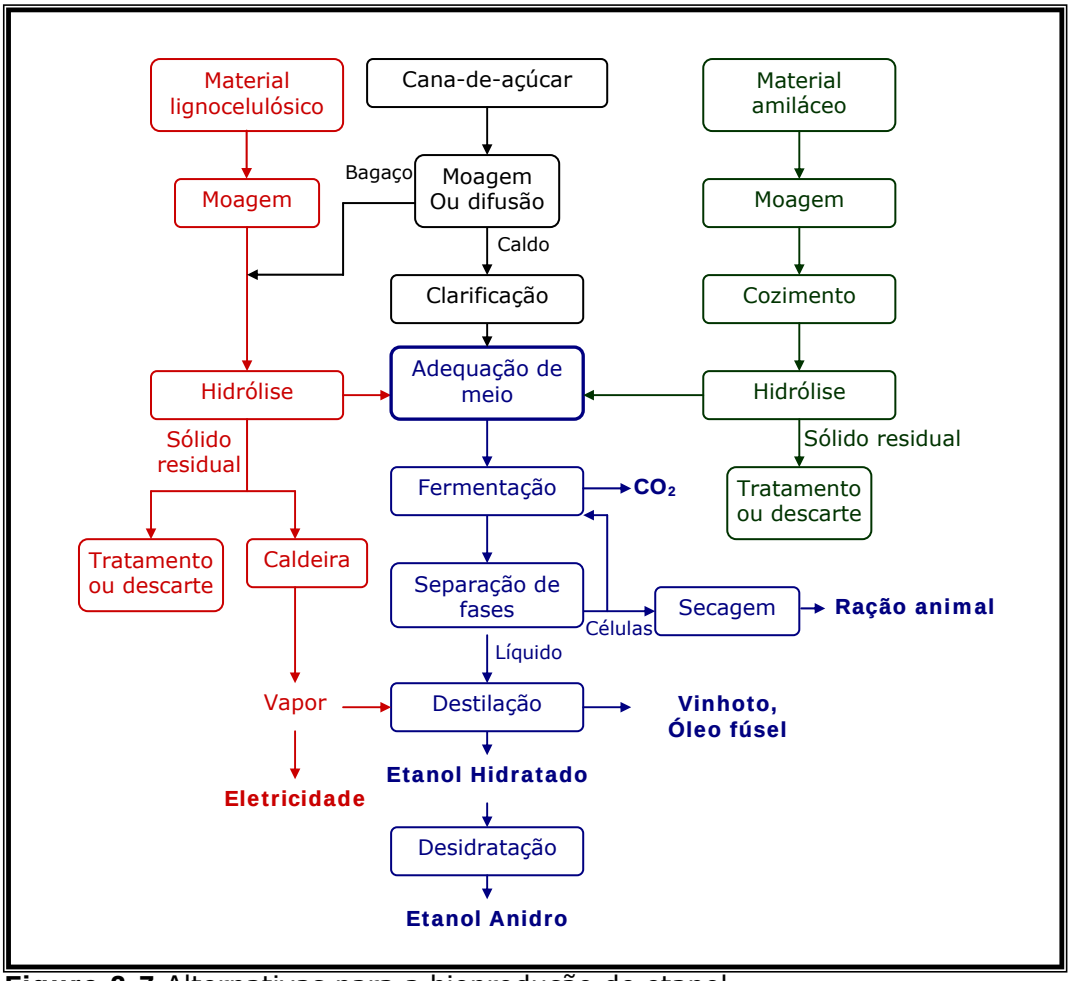


Figura 2.7 Alternativas para a bioprodução de etanol.
Adaptado de PEREIRA Jr. (1991)

Contudo, o etanol de primeira geração vem sendo criticado por utilizar produtos agrícolas que poderiam ser destinados para alimentação, pelo possível desgaste de solos com a aplicação de mono-cultivo e a dependência ao uso de equipamentos condicionado ao uso de combustíveis fósseis (BON *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 2010).

2.2.5.2 Etanol de segunda geração

As tendências atuais sinalizam ao desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento de resíduos agroindustriais como os materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, e assim se produzir o chamado etanol de segunda geração, diminuindo os custos associados às matérias-primas, os quais podem atingir 2/3 do custo total da produção, e incrementar os níveis de produtividade sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo. Deste modo, investiga-se o aproveitamento de biomassas como palhas, bagaço, folhas e resíduos de exploração madeireira entre outros, que são constituídos por açúcares que podem ser liberados utilizando diferentes processos físicos ou químicos, sendo esta uma etapa crucial no processo (SCHMIDELL *et al.*, 2001a; MOSIER *et al.*, 2005a; NAIK *et al.*, 2010).

Para a transformação dos materiais lignocelulósicos tem-se reportado diferentes concepções tecnológicas, devido à presença de diferentes açúcares e à enorme variação na estrutura para cada tipo de material. Quatro estratégias têm-se destacado, cada uma com diferentes estágios de desenvolvimento e são descritas a seguir.

a) Hidrólise e fermentação em etapas separadas

É uma das concepções mais antigas e caracteriza-se pela disponibilização dos açúcares, por via química ou enzimática, em uma etapa separada que precede à fermentação (MOSIER *et al*., 2005a).

Inicialmente, utilizavam-se agentes químicos como catalisadores da hidrólise total da estrutura (Figura 2.8). No entanto, devido à necessidade de alta severidade do processo, os hidrolisados gerados possuíam um alto número de compostos inibidores de fermentação. Neste caso, outras etapas eram requeridas para destoxificação, impossibilitando, assim, a realização da fermentação em forma simultânea ao processo hidrolítico, ou a diluição dos hidrolisados para aumentar sua fermentabilidade. Sob esta concepção, atualmente abandonada, o aproveitamento da totalidade dos açúcares, incluídas pentoses, exigia o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados (FAIRBANKS, 2003).

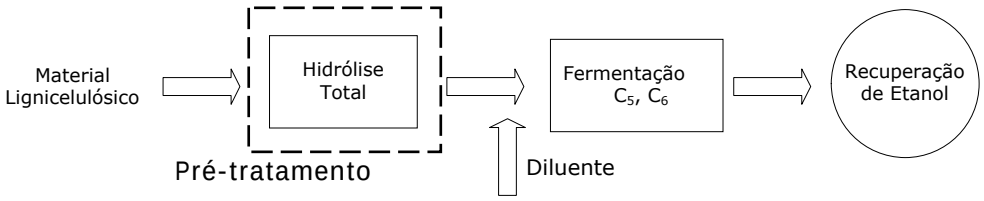


Figura 2.8 Diagrama de blocos do processo com hidrólise ácida total
Adaptado de Pereira Jr. *et al*. (2008)

Posteriormente, foi concebida uma hidrólise enzimática do material lignocelulósico nas condições ótimas de pH e temperatura das celulases. A dificuldade deste processo reside no acúmulo da glicose e polissacarídeos, provenientes da própria hidrólise do material, que atuam como inibidores enzimáticos das enzimas envolvidas, decorrendo de uma hidrólise incompleta da celulose. Uma vez terminada esta etapa, o resíduo sólido é separado e o sobrenadante empregado como base para o meio de fermentação (WINGREN *et al.*, 2003; Mc MILLAN, 2004).

Como alternativa, tem-se sugerido a utilização de ácido diluído na hidrólise para a separação seletiva da fração hemicelulósica, sendo a celulose hidrolisada via enzimática em uma outra etapa, independente do processo de fermentação em um sistema denominado "SHF" (*Sequential Hydrolysis and Fermentation*) (Figura 2.9).

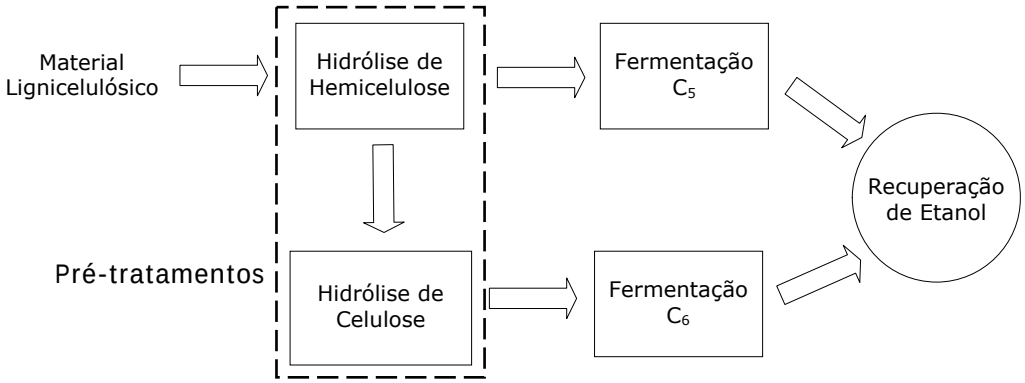


Figura 2.9 Diagrama de blocos do processo SHF com hidrólise seletiva de hemicelulose
Adaptado de Pereira Jr. *et al*. (2008)

b) Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Neste caso, a sacarificação e a fermentação da fração celulósica ocorrem numa única etapa, sendo realizada enzimaticamente a hidrólise da macromolécula, possibilitando o sinergismo com o microrganismo fermentador. Em etapas separadas, são realizados o fracionamento e hidrólise da hemicelulose, assim como a fermentação dos açúcares gerados neste processo. As enzimas empregadas no processo, o complexo celulásico, são também produzidas separadamente (WINGREN *et al.*, 2003; MOSIER *et al.*, 2005a). Na Figura 2.10 representa-se, em diagrama de blocos, as principais etapas para este processo.

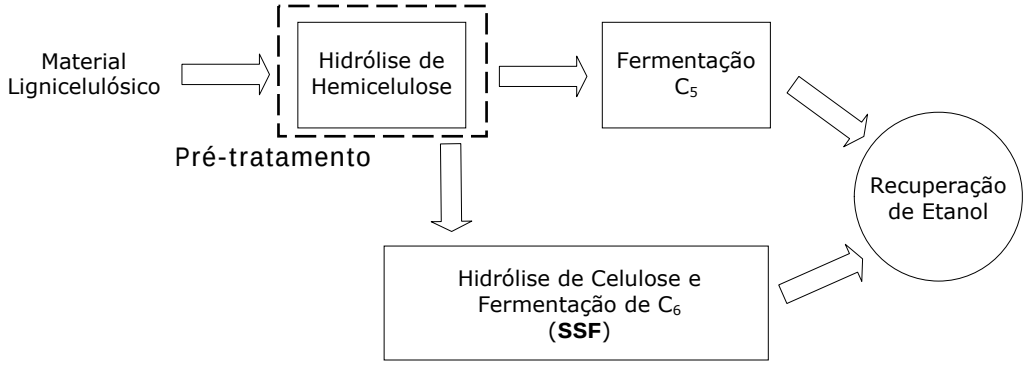


Figura 2.10 Diagrama de blocos do processo SSF
Adaptado de Pereira Jr. *et al*. (2008)

c) Sacarificação com co-fermentação simultânea (SSCF)

Neste processo são realizados numa única etapa: a fermentação de pentoses, a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação de hexoses, sendo realizadas em etapas separadas a hidrólise de hemicelulose e a produção de celulases (Figura 2.11). Contudo, faz-se necessário o auxílio da biologia molecular para o desenvolvimento de microrganismos capazes de fermentar todos os monômeros presentes (MOSIER *et al*., 2005a).

d) Bioprocesso consolidado (CBP)

É o processo de concepção mais complexo devido ao envolvimento de, pelo menos, três das etapas num único equipamento (Figura 2.12). Para este

processo é necessário recorrer às ferramentas modernas, como a engenharia genética, no intuito de se obter um microrganismo que consiga produzir diversas enzimas que permitam a clivagem dos complexos hemicelulósico e celulósico, e alta habilidade fermentativa, tanto de pentoses quanto hexoses (PEREIRA Jr. *et al*., 2008).

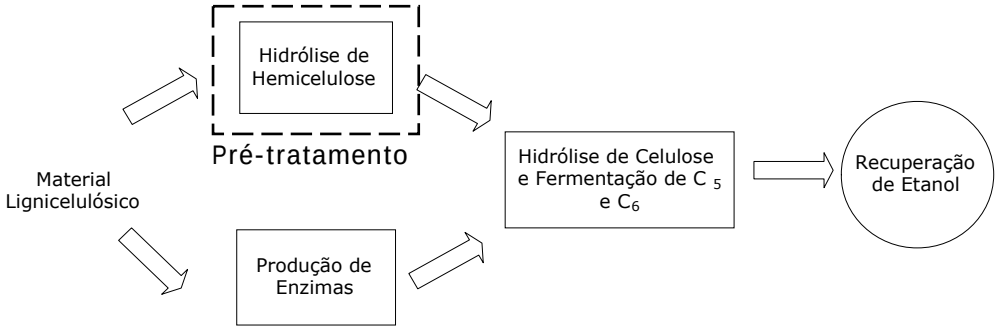


Figura 2.11 Diagrama de Blocos do Processo SSCF.
Adaptado de Pereira Jr. *et al*. (2008)

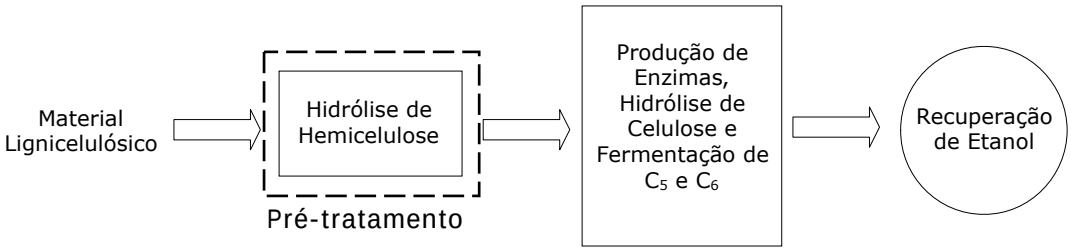


Figura 2.12 Diagrama de blocos do processo CBP
Adaptado de Pereira Jr. *et al*. (2008)

2.3 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas, basicamente, de hemicelulose e celulose (Figura 2.13), infiltradas por outra estrutura formada por álcoois aromáticos, a lignina, à qual se encontram unidas por ligações de hidrogênio e covalentes (LEE, 1997; MOSIER *et al.*, 2005a; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009). Em menores proporções podem também ser encontradas resinas, taninos, ácidos graxos, fenóis, compostos nitrogenados e compostos minerais proveniente de elementos como Ca, K, Si, Mg, Al, S, Fe, P, Cl, e Na (SHLESER, 1994; VASSILEV *et al.*, 2010).

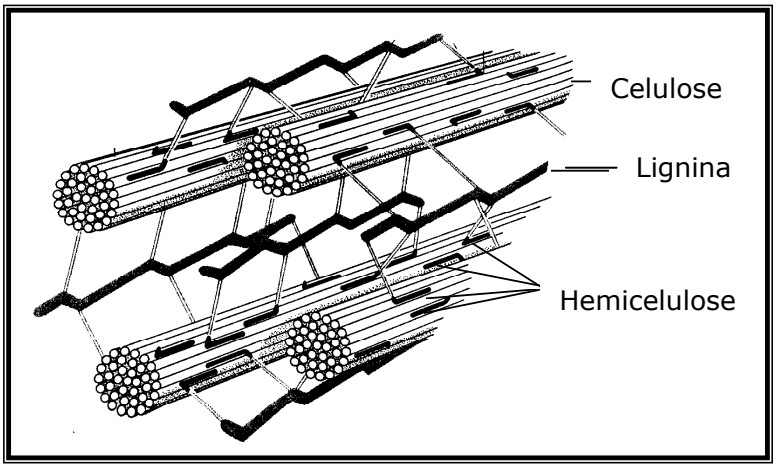


Figura 2.13 Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico
Adaptado de SHLESER (1994)

2.3.1 A fração celulósica

A celulose, o maior constituinte da parede celular das plantas e uma das estruturas constantemente regeneradas, é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de β-D-glicose, unidas por ligações β(1-4) carbono-carbono (Figura 2.14A) (PANDEY, *et al*. 2000; MOSIER *et al.*, 2005a). Este homopolissacarídeo possui entre 8000 e 14000 unidades de glicose, dependendo do tipo de planta, apresentando uma massa aproximada de 2,3 milhões de u.m.a (unidades de massa atômica) (SHLESER, 1994).

As cadeias de celulose formam entre si ligações de hidrogênio intramoleculares (O6-H-O2’ e O6-H-O3’) e intermoleculares (O3-H-O5’) (Figura 2.14B). Estas ligações conferem alta rigidez e ordem à estrutura, criando as denominadas regiões cristalinas, responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose, sendo esta uma das maiores barreiras para o aproveitamento biotecnológico da fração (LEMOS, 2001; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

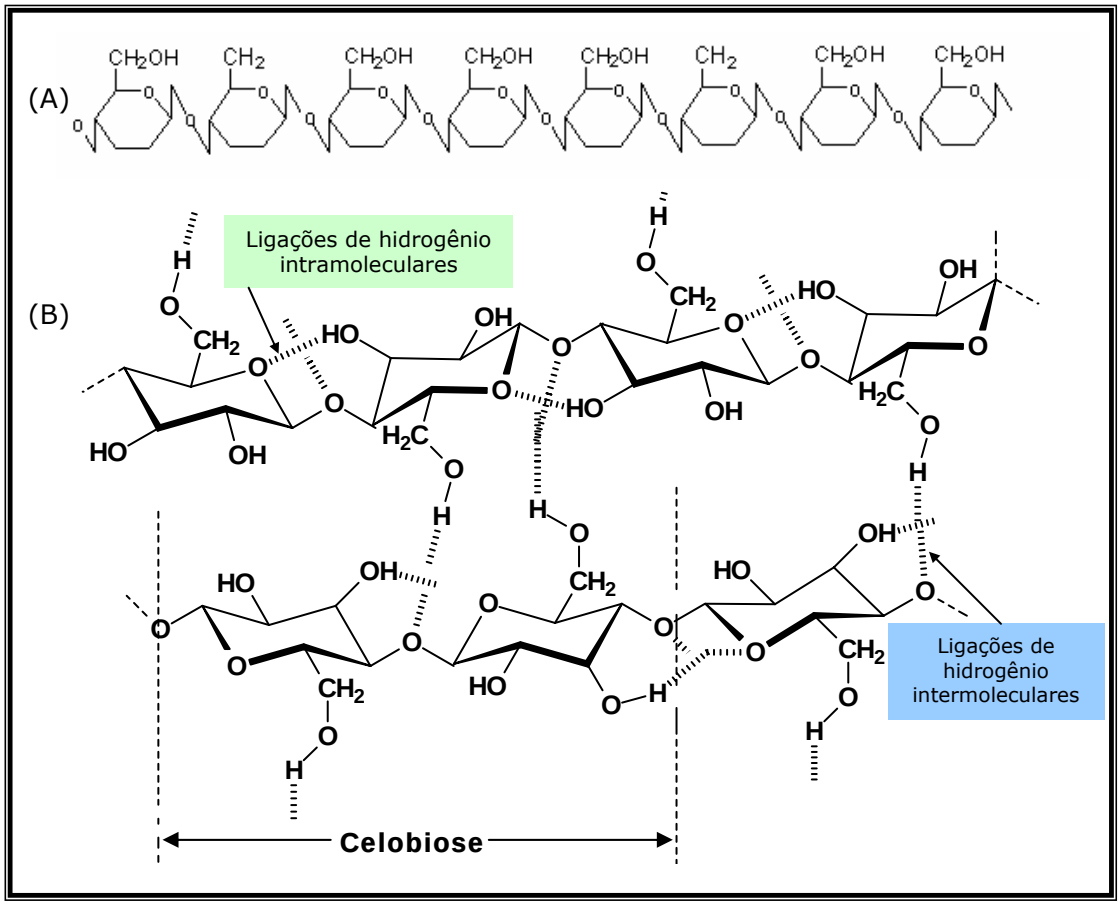


Figura 2.14 Disposição das moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas (A) (COUGHLAN, 1985 *apud* LEMOS, 2001); estrutura simplificada da celulose (B) (PEREIRA Jr., 1991).

2.3.2 A fração hemicelulósica

Na estrutura da hemicelulose participam, pelo menos, dois tipos de unidades de açúcar, formando cadeias entre 100 e 200 unidades de pentoses e hexoses. Dos monômeros encontrados destacam-se a β-D-manose, β-D-glicose, α-D-galactose e, principalmente, as pentoses β-D-xilose e α-L-arabinose. Adicionalmente, encontram-se ácidos como β-D-glucurônico, β-D-galacturônico e α-D-4-O-metilglucurônico, assim como alguns grupos acetil (CARAMEZ, 1999; MOSIER, 2005a; GÍRIO *et al.*, 2010; NAIK *et al.*, 2010).

A macromolécula de hemicelulose (Figura 2.15), sem regiões cristalinas devido ao seu grau de ramificação, está constituída, majoritariamente, por uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular como xilanas, arabinanas e mananas, mas podem ser encontrados polissacarídeos mais complexos como arabinoxilanas, glucoarabinoxilanas, arabinogalactanas, arabinoglucuranoxilanas,

glicuranoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas, xiloglucanas, galactoglucomananas e galactomananas (FOGEL, 2004; GÍRIO *et al.*, 2010).

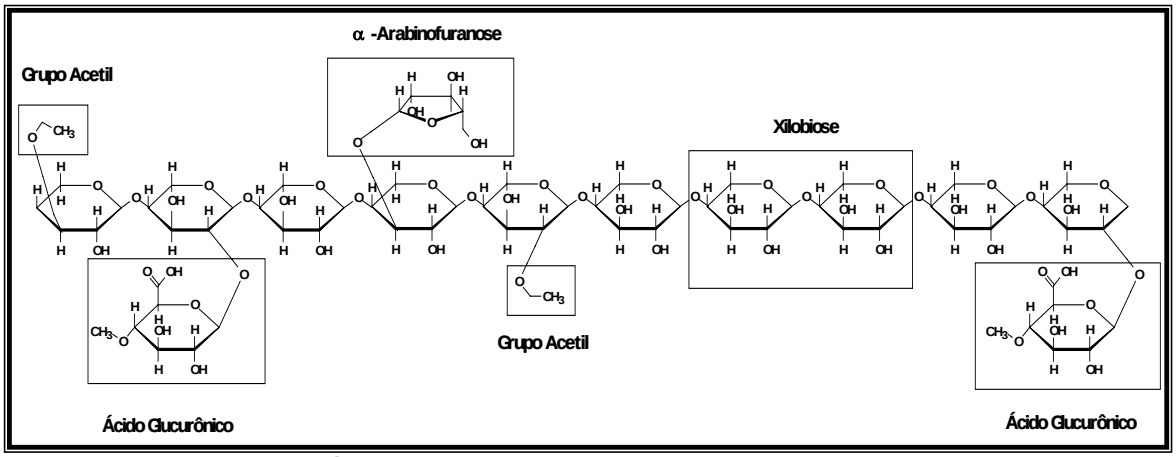


Figura 2.15 Estrutura típica da hemicelulose
Fonte: MUSSATTO (2002)

A xilana é o componente predominante do complexo hemicelulósico, constituindo entre 15% e 35% da massa seca de madeira e resíduos agroindustriais (CARAMEZ, 1999; GÍRIO *et al*., 2010). Em termos gerais, é um polissacarídeo de cadeia linear formada por unidades de xilose, as quais se encontram unidas por ligações β-(1,4) xilanopiranosil e, frequentemente, carregam substituintes como acetil, arabinosil e glucuranosil. Devido ao menor grau de cristalinidade e à menor estabilidade das ligações glicosídicas, comparando-se à celulose, os monômeros constituintes das xilanas podem ser recuperados com altos rendimentos utilizando ácidos diluídos (PEREIRA Jr., 1991; DU PREEZ, 1994; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

A composição básica dos materiais lignocelulósicos, no que diz respeito à proporção das suas frações principais, depende do vegetal de origem, do tipo de material (palha, bagaço, cascas, etc.), da variedade, região de cultivo, idade e período do ano no momento da coleta (MOSIER *et al*., 2005a). Na Tabela 2.3 apresentam-se alguns materiais lignocelulósico e sua composição básica (celulose, hemicelulose e lignina). Igualmente, a composição em glicídeos é sumarizada na Tabela 2.4, sendo esses açúcares o verdadeiro objeto de interesse para a produção de diferentes substâncias por via biotecnológica.

Tabela 2.3 Composição de alguns resíduos agroindustriais

Fonte	Composição (%)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas
Bagaço de cana	33-36	28-30	18-20	4-6	2-4,8
Palha de arroz	32-37	19-24	9-13	4-5	12-18
Sabugo de milho	34-36	16-24	15-19	2-6	2-4
Palha de trigo	30-33	22-28	14-18	3-7	3-7
Palha de sorgo	34-36	25-26	25-26	-	-
Madeiras	~50	~20	15-20	Até 10	Até 5

Fonte: SUN & CHENG (2002), PANDEY *et al.* (2000), OLSSON & HAHN-HÄGERDAL (1996)

Tabela 2.4 Constituintes básicos de alguns materiais

	Sabugo de milho	Palha de trigo	Palha de arroz	Bagaço de cana	Semente de algodão	Jornal impresso	Resíduos urbanos
Glicídeos (%)							
Glicose	39,0	36,6	41,0	38,1	20,0	64,4	40,0
Manose	0,3	0,8	1,8	n.d.	4,1	16,6	8,0
Galactose	0,8	4,4	0,4	1,1	0,1	n.d.	n.d.
Xilose	14,8	19,2	14,8	23,3	4,6	4,6	14,0
Arabinose	4,2	4,4	4,5	4,5	4,3	0,5	4,0
Outros (%)							
Lignina	15,1	14,5	9,9	18,4	17,6	21,0	20,0
Cinzas	4,3	9,6	4,4	4,8	14,8	0,4	1,0
Proteínas	4,0	4,0	n.d.	4,0	4,0	n.d.	n.d.

n.d. – medidas não determinadas
Fonte: LEE (1997)

Cabe destacar que entre os resíduos agroindustriais com maior conteúdo de hemicelulose e, consequentemente, de xilose, encontra-se o bagaço de cana, como observado nas Tabelas 2.3 e 2.4, sendo este o objeto de estudo do presente trabalho.

2.3.3 Lignina

A lignina, presente em todas as plantas superiores, é a responsável pela rigidez da parede celular em vegetais, pela sua resistência ao impacto, compressão e dobra, sendo também um agente permanente de ligação entre as

células (LEMOS, 2001). Cabe destacar que os compostos derivados da lignina, quando liberados, dificultam os processos fermentativos. Estruturalmente, é uma complexa macromolécula aromática, hidrofóbica e opticamente inativa, com numerosas ligações cruzadas (aproximadamente 10 tipos diferentes). Deriva-se da polimerização desidrogenativa de três álcoois: álcool trans-coniferílico, trans-p-cumárico e álcool trans-sinapílico (Figura 2.16) (CARAMEZ, 1999; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

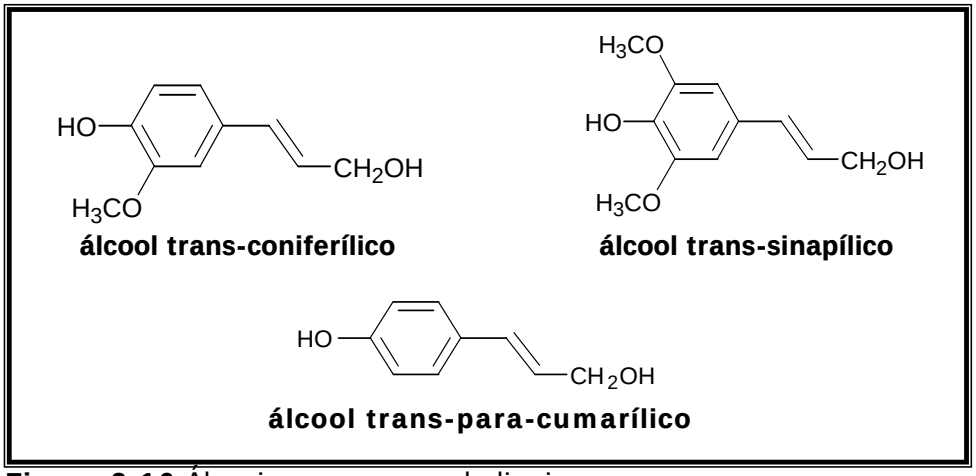


Figura 2.16 Álcoois precursores da lignina
Fonte: D'ALMEIDA (1988)

Durante o processo de formação da lignina, reações secundárias levam à formação de ligações entre a macromolécula e a hemicelulose formando uma matriz que envolve a celulose, criando um dos impedimentos para a hidrólise das estruturas polissacarídicas. Essas ligações são formadas entre as unidades de fenil-propano da lignina e os resíduos de ácido glucurônico e arabinose das xilanas (LEMOS, 2001; FAIRBANKS, 2003).

2.3.4 Potencial dos materiais lignocelulósicos dentro do conceito de biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria propõe a separação seletiva dos constituintes das diferentes frações que compõem o material lignocelulósico, utilizando processos (pré-tratamentos) com alta eficiência de extração, economicamente viáveis e pouca degradação dos compostos de interesse, para a produção de energia, *commodities* e produtos de alto valor agregado, atrelado à minimização

de resíduos e emissões de gases poluidores. No futuro, espera-se que as biorrefinarias consigam competir economicamente com as refinarias de petróleo e permitam a substituição de derivados de petróleo por produtos ambientalmente mais amigáveis (PEREIRA Jr., *et al.*, 2008; NAIK *et al.*, 2010).

A utilização de biomassas lignocelulósicas, dentro do conceito de biorrefinaria, encontra-se fundamentado em duas plataformas diferentes, sucro-química e termoquímica, ambas direcionadas à obtenção de uma diversidade de produtos. Na plataforma termoquímica o material é transformado por meio de processos que envolvem altas temperaturas em sistemas que permitam o controle de oxigênio para a produção de gás de síntese ou bio-óleos. A plataforma sucro-química fundamenta-se na transformação química e/ou bioquímica das unidades constituintes do material lignocelulósico, principalmente açúcares, previamente extraídos por meio de processos químicos ou enzimáticos.

Nas Figuras 2.17, 2.18 e 2.19, é apresentado, esquematicamente, o potencial de cada uma das frações que compõem o material lignocelulósico no contexto da plataforma sucro-química.

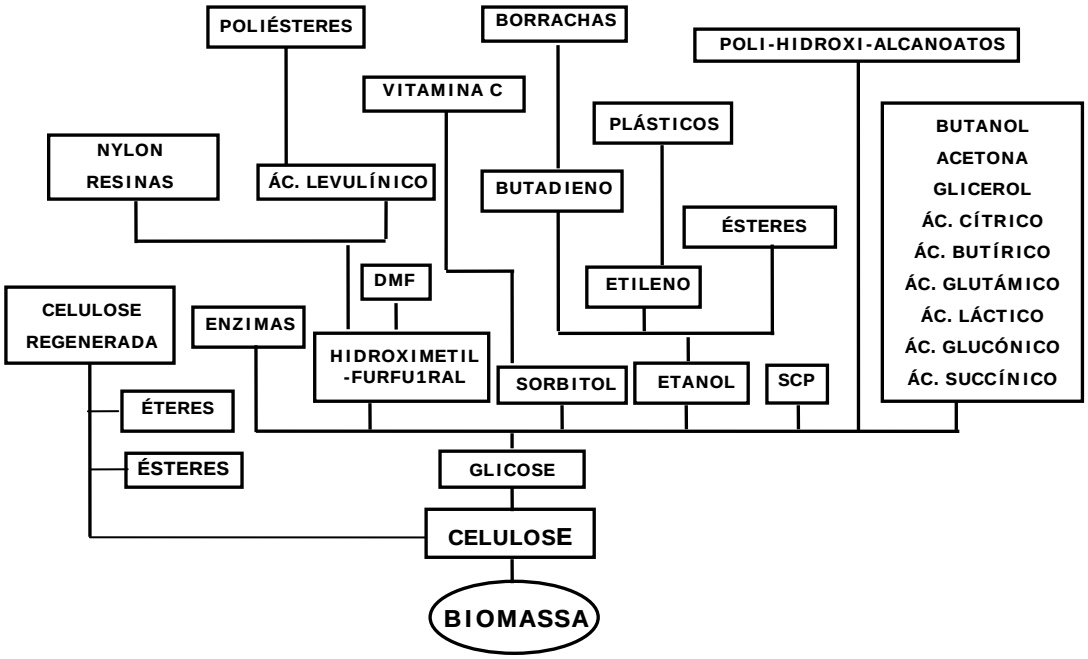


Figura 2.17 Produtos potenciais a serem obtidos da fração celulósica
Fonte: Pereira Jr. *et al.* (2008)

O êxito do desenvolvimento da plataforma sucro-química depende, como mencionado anteriormente, da extração eficiente e seletiva das unidades monoméricas que compõem as diferentes frações do material lignocelulósico

visando à produção combinada de diversos produtos em grande e pequena escala, em função do alto ou baixo valor agregado, respectivamente, em conjunto com a integração e auto-sustentabilidade energética de processos.

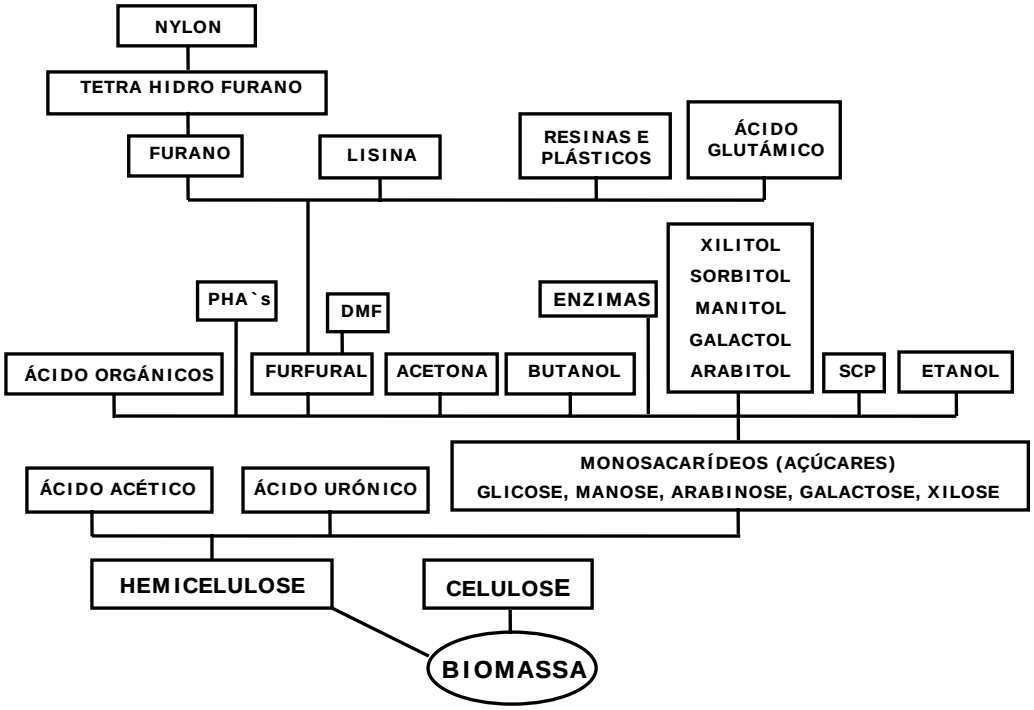


Figura 2.18 Produtos potenciais a serem obtidos da fração hemicelulósica
Fonte: Pereira Jr. *et al.* (2008)

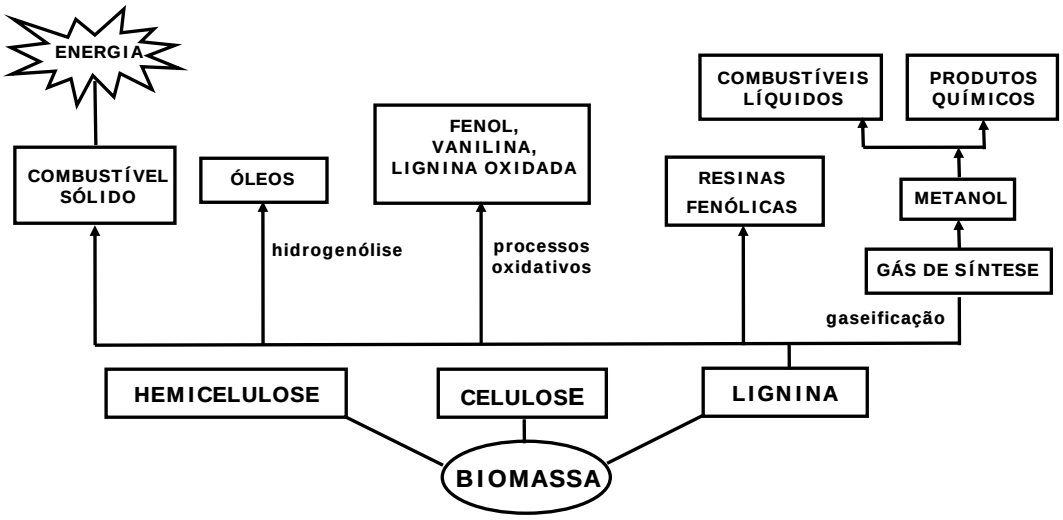


Figura 2.19 Produtos potenciais a serem obtidos da lignina
Fonte: Pereira Jr. *et al.* (2008)

Dada a importância, no contexto de biorrefinaria, dos processos para a extração dos monômeros constituintes de materiais lignocelulósicos, descrevem-

se, a seguir, os principais pré-tratamentos utilizados, especificamente, com o intuito de aproveitar as frações polissacarídicas.

2.4 PRÉ-TRATAMENTOS PARA MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os pré-tratamentos de biomassas são necessários para alterar macroscópica e microscopicamente a estrutura da matriz lignocelulósica, visando sempre a separação entre as frações constituintes e a desorganização da estrutura cristalina da celulose, para seu aproveitamento eficiente e integral (MOSIER *et al.*, 2005a). Estes pré-tratamentos podem ser classificados como físicos, físico-químicos, químicos e biológicos (ALVIRA *et al.*, 2010).

Como pré-tratamentos físicos são conhecidos os processos de trituração mecânica e a pirólise. O primeiro é caracterizado pela cominuição do material por fragmentação, moagem ou esfarelamento, enquanto no último processo o material é submetido a altas temperaturas para a formação de gás de síntese (SUN & CHENG, 2002; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009). Para ambos os processos existe uma alta demanda energética, o que se apresenta com uma desvantagem considerando-se o desenvolvimento industrial do processo (ALVIRA *et al.*, 2010).

Adicionalmente, são aplicados tratamentos térmicos ao material imerso em vapor saturado ou em água a temperaturas que variam de 170°C até 230°C e tempos que vão de alguns minutos até várias horas (LASER, *et al.*, 2002). Estes últimos, apesar de não ter adição externa de catalisadores, podem ser incluídos nos processos físico-químicos devido aos diferentes fenômenos químicos naturalmente ocorrentes durante o processo.

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados, principalmente, para separar seletivamente a fração hemicelulósica e aumentar a susceptibilidade do material lignocelulósico a futuros processos enzimáticos. Os principais processos incluem o uso de ácidos, água (líquido ou vapor) e solventes orgânicos ou alcalinos, sendo estes dois últimos não seletivos na separação de hemicelulose por remover também lignina. Entre os pré-tratamentos deste tipo destacam-se:

- ✓ **Explosão com vapor (*steam explosion*) ou auto-hidrólise:** Neste processo o material é rapidamente aquecido (a temperaturas acima de 240ºC) com vapor de alta pressão, deixado em contato com o vapor por algum tempo e, posteriormente, é submetido a uma descompressão explosiva (MOSIER *et al.*, 2005a; GÍRIO *et al.*, 2010). O processo permite a

solubilização de alguns monômeros, principalmente xilose, e de vários polissacarídeos próprios da fração hemicelulósica (xilo-oligosacarídeos), com a simultânea transformação e solubilização de uma pequena parte da lignina. Adicionalmente, o processo permite um aumento da susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática, devido à expansão gerada no sólido durante a descompressão (NAIK *et al.*, 2010). No processo é gerado também ácido acético, proveniente dos grupos acetato associados à hemicelulose, assim como, em menor grau, alguns compostos gerados da degradação de glicose e xilose devido às altas temperaturas (MOSIER *et al.*, 2005a). O processo se destaca econômica e ambientalmente por não precisar de catalisadores (GÍRIO *et al.*, 2010). No intuito de melhorar a monomerização de açúcares provenientes da fração hemicelulósica, este pré-tratamento é comumente facilitado com a impregnação do material com ácidos, principalmente sulfúrico (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

- ✓ **Expansão com amônia:** Neste caso o material é impregnado ou embebido numa solução de amônia durante o processo, tendo como princípio a alta solubilidade de hemiceluloses em ambientes alcalinos. No entanto, há que se destacar que, igualmente à hemicelulose, a lignina também tem a sua solubilidade aumentada em meio básico. É um pré-tratamento útil para materiais herbáceos e resíduos agrícolas, mas limitado para madeiras macias (*softwoods*) e duras (*hardwoods*) (MOSIER, *et al.* 2005a).
- ✓ **Explosão com CO_2:** O processo é realizado na presença de CO_2 o qual se transforma no correspondente ácido e incrementa o processo hidrolítico.
- ✓ **Pré-tratamentos com água superaquecida:** neste caso, altas pressões são utilizadas para manter a água, em fase líquida, em contato com material lignocelulósico, com características de hidrólise similares ao processo de explosão com vapor. O tempo de processo supera sempre os 15 minutos, sendo utilizadas temperaturas entre 150 e 230°C. Segundo as condições aplicadas, altos rendimentos em remoção de hemicelulose podem ser alcançados, com significativos aumentos na susceptibilidade dos sólidos ao ataque enzimático. Neste tipo de pré-tratamento, igual ao processo de explosão com vapor, a hidrólise da fração hemicelulósica é catalisada, principalmente, pelos íons hidrogênio liberados do ácido acético proveniente dos grupos acetil presentes na estrutura. Como vantagem deste processo deve-se destacar a redução de insumos necessários para a neutralização dos

hidrolisados obtidos (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; GÍRIO *et al.*, 2010). Condições mais severas, visando atingir condições críticas da água, têm sido também utilizadas no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos mostrando uma separação total de hemicelulose e aumento significativo na digestibilidade das fibras (KIM & LEE, 2006; MOSIER *et al.*, 2005b).

No caso dos pré-tratamentos químicos as características de cada processo são variadas. Alguns desses processos são descritos a seguir:

- ✓ **Hidrólise ácida:** É um dos pré-tratamentos mais empregados no aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Neste processo são utilizados ácidos como catalisadores do rompimento das ligações entre as frações e suas próprias ligações internas, em condições que variam desde as mais drásticas, para hidrólise de celulose, até moderadas para a solubilização seletiva da fração hemicelulósica (MOSIER *et al.*, 2005a).
- ✓ **Ozonólise:** O alto poder oxidativo do ozônio é utilizado neste processo para retirar a lignina do material lignocelulósico, deixando-o mais acessível ao ataque enzimático e sem a formação de inibidores. Porém, o uso de ozônio em escala industrial apresenta-se economicamente inviável (ALVIRA *et al.*, 2010).
- ✓ **Pré-tratamento alcalino:** A presença de álcalis durante o pré-tratamento permite a saponificação de ligações éter e éster, ocorrentes entre xilanas e entre xilana e lignina, permitindo a solubilização eficiente destas frações, ao mesmo tempo em que é reduzida a cristalinidade das fibras. Geralmente, o processo demanda condições menos drásticas com tempos de exposição maiores, gerando irreversivelmente sais a partir dos catalisadores (MOSIER *et al.*, 2005a; GÍRIO *et al.*; 2010). Neste processo, os monômeros de hemicelulose são facilmente degradados, impossibilitando seu uso para produção de etanol (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009;). Os processos mais comuns envolvem o uso de hidróxido de sódio ou cálcio (*Lime*).
- ✓ **Pré-tratamento oxidativo:** Neste caso, ao material lignocelulósico embebido em água é adicionado um agente oxidante (peróxido de hidrogênio ou ácido peracético), visando a remoção de hemicelulose e lignina, mas com perdas de celulose e formação de inibidores (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009). Em condições mais brandas, enzimas peroxidases são utilizadas para biodegradar a lignina em presença de H_2O_2, aumentando a susceptibilidade das fibras a posteriores processos de hidrólises.

- ✓ **Processo *organosolv*:** Uma mistura de ácido e solvente orgânico (geralmente etanol por ser facilmente recuperado por destilação) é utilizada neste processo para a solubilização da lignina e da hemicelulose, porém esta última é parcialmente solubilizada. A faixa de temperatura normalmente empregada está entre os 180ºC e 200ºC e tem como desvantagem a formação de quantidades significativas de furfurais, imposibilitando alta recuperação de pentoses (GÍRIO *et al.*, 2010).

Na Tabela 2.5 são destacadas características qualitativas comparativas dos principais pré-tratamentos aplicados para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos e, na sequência, são sumarizados os resultados apresentados por vários autores para pré-tratamentos de diferentes materiais lignocelulósicos (Tabela 2.6).

Novos pré-tratamentos direcionados ao uso de sólidos super-ácidos e líquidos iônicos vêm sendo documentada na literatura. Porém, além de processos dependentes de produtos derivados do petróleo, apresentam uma complexidade técnica ainda inviável para sua aplicação industrial (ZAVREL *et al.*, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010; GÍRIO *et al.*, 2010).

Os pré-tratamentos biológicos envolvem o uso, principalmente, de fungos degradadores de hemicelulose e lignina pela ação de enzimas como peroxidases e lacases. Estes processos caracterizam-se por ser prolongados (10 dias ou mais) e complementados com outros pré-tratamentos (ALVIRA *et al.*, 2010).

Cabe destacar que qualquer pré-tratamento utilizado deve estar direcionado à separação e redução das moléculas constituintes do material, à minimização na geração de inibidores, ao aumento da susceptibilidade dos sólidos, à alta fermentabilidade de hidrolisados e à redução da demanda energética e dos custos do processo (MOSIER *et al.*, 2005a; GÍRIO *et al.*, 2010). Nesse sentido, os principais fatores a se considerar no pré-tratamento de materiais são (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008):

- √ **Tempo-Temperatura:** Esta sinergia deve ser estabelecida para favorecer uma alta separação e hidrólise das frações que compõem a matriz sólida, mas minimizando a formação de inibidores, assim como o custo do processo;

Tabela 2.5 Vantagens e desvantagens para diferentes pré-tratamentos aplicados em materiais lignocelulósicos

Característica desejada	Ácido concentrado	Ácido diluído	Explosão com vapor	Auto-hirólise	*Organosolv*	Sólidos super-ácidos	Alcalino	Líquidos Iônicos	Condições super-críticas
Solubilização de hemicelulose	++	++	++	++	+	+	+	++	+
Produção de monômeros provenientes de hemcelulose	++	++	0	-	-/0	+	-/0	0/+	-
Baixa formação de xilo-oligosacarídeos	+	+	++	-	-/0	+	-/0	0/+	-
Recuperação de celulose	++	++	+	++	-	++	+	+	++
Aumento na digestibilidade da celulose	++	++	0/+	+	-	+	++	+	0/+
Alta recuperação da lignina	-	-	0	+	+	-/0	-	+	+
Reciclo de solventes	-	-	0	n.r.	-	+	-/0/+	+	n.r./+
Baixa formação de inibidores	-	-	0	0	+	0	+	-	0
Poucos problemas de corrosão	-	-	0	0	-	0	-	-/0	-/0
Baixa demanda por insumos	-	-	0	++	-	0/+	-/0	+	++
Baixos requerimentos para neutralização	-	-	0	n.r.	+	-/0	-/0	0	n.r.
Baixos custos de investimento	+	+	-	+	0	0	0/+	+	-
Baixos custos operacionais	-	0	++	+	-	0	-/0	-	-
Baixa demanda de energia	0	-	0	0	0	+	+	++	+

+, vantagem; -, desvantagem; 0, neutro; n.r., não relevante. Fonte: Gírio *et al.* (2010)

Tabela 2.6 Resultados e características reportadas na literatura para alguns pré-tratamentos aplicados a materiais lignocelulósicos

Pré-tratamento	Condições	Fração hemicelulósica	Fração celulósica	Referência
Explosão com vapor (bambu)	Relação S:L 1:60 (g:mL) e pré-tratamento (35 atm, 5 min)	1g de xilose e 17 de xilo-oligosacarídeos para cada 100 g de material	88 g de glicose/100 g de material após hidrólise enzimática	Asada *et al.*, 2005
Explosão com vapor catalisada com ácido (Pino)	Serragem impregnada com SO_2 (2,5% m/m) e tratadas a 210ºC, 20 min.	Solução de xilose 11,6 g/L. Açúcares totais 89,0 g/L	91% de glicose recuperada após hidrólise enzimática	Bertilsson *et al.*, 2009
Explosão com vapor catalisada com ácido (Palha de trigo)	30% de massa seca, 0,2% H_2SO_4, 190ºC, 10 min.	96% de xilose	100% de glicose após hidrólise enzimática	Linde *et al.*, 2008
Expansão com vapor em presença de amônia (AFEX) (resíduos de milho)	Tratamento térmico a 90ºC, 5 min de material com 60% de umidade e misturado 1:1 (amônia:biomassa)	18,5 g de xilose e 1,2 g de arabinose por cada 100 g de material, após de hidrólise enzimática utilizando xilanases celulases e pectinases	88,5 g de glicose para cada 100 g de material, após hidrólise enzimática utilizando xilanases celulases e pectinases	Teymouri *et al.*, 2005
Expansão com vapor em presença de amônia (AFEX) (grama)	Tratamento térmico a 150ºC, 5 min de material com 233% de umidade e misturado 2:1 (amônia:biomassa)	81% de hidrólise de xilanas após hidrólise enzimática utilizando xilanases celulases e pectinases	95% de hidrólise de glucanas após hidrólise enzimática utilizando xilanases celulases e pectinases	Numan *et al.*, 2007
Água superaquecida (*liquid hot water*) (resíduos de milho)	15% de material sólido 190ºC, 15 min sob controle de pH	81% de hidrólise de xilose 18 g/L de xilose	90% de hidrólise utilizando 15 FPU/g-glucana. 82,5 g/L de glicose	Mosier *et al.*, 2005b
Água superaquecida com pH alcalino (Bagaço de cana)	60g sólido:1L de água 195ºC, 15 min e pH 10 (inicial)	93% de hemicelulose solubilizada (xilo-oligômeros)	75% de hidrólise após utilização de enzimas	Martín *et al.*, 2007

Tabela 2.6 Resultados e características reportadas na literatura para alguns pré-tratamentos aplicados a materiais lignocelulósicos (continuação)

Pré-tratamento	Condições	Fração hemicelulósica	Fração celulósica	Referência
Ácido diluído	150-220°C De minutos a segundos	100%, com a geração de furfural	Hidrólise total via aplicação de enzimas (20FPU/g) em processos de até 7 dias	Mosier *et al.*, 2005b.
Ácido diluído (Bagaço de cana)	1 g material:2mL de ácido sulfúrico 3,5% (v/v) 121ºC, 40 minutos	100% de hidrólise de hemicelulose (120 g/L de açúcares fermentáveis)	85% de hidrólise de celulose após pré-tratamento alcalino e uso de celulases	Betancur 2005; Maeda *et al.*, 2010
Ácido diluído (Palha de arroz)	150 g de material para 1 L de solução de ácido sulfúrico 0,5% 15 bar, 10min	80,8% de hidrólise de hemicelulose monomerizada	28,9 g/ Kg de sólido Digestibilidade do sólido residual não reportada	Karimi *et al.*, 2006;
Ácido diluído (Palha de trigo)	7.88%(m/v) de sólido em solução de ácido sulfúrico 0,75% (v/v) 121ºC, 1 h	108mg xilose/g material e após hidrólise enzimática aumenta para 198 mg xilose/g material	16g glicose/g material que após hidrólise enzimática aumenta para 313 g glicose/g material	Saha *et al.*, 2005
Alcalino (bagaço de cana)	2 g material:50 mL de solução NaOH 1M 40ºC, 18 horas	52,1% de hemicelulose hidrolisada, mas não monomerizada	Digestibidade de sólidos não reportada	Xu *et al.*, 2006
Água superaquecida e posterior pré-tratamento alcalino com amônia (resíduo de milho)	Pré-tratamento com água superaquecida a 190ºC, 30 min Pré-tratamento com amônia 170ºC, solução 15% (NH_3), 60 minutos	89% de xilanas solubilizadas 75% de lignina removida	94% da celulose hidrolisada após ação de enzimas (60 FPU/g-glucana)	Kim & Lee, 2006
Alcalino (Palha de trigo)	20 g: 160mL de solução 1% de NaOH, 60 min, 100ºC Auxiliado com micro-ondas com tempo de 25 min	76% de hemicelulose solubilizada 81% de lignina removida Quando auxiliado com micro-ondas 84% de hemicelulose solubilizada 86% de lignina removida	Após hidrólise enzimática a concentração de glicose obtida passa de 40,2 g/L para 42,9 g/L se aplicadas micro-ondas	Zhu *et al.*, 2006

Tamanho de partícula: a maior parte dos pré-tratamentos é favorecida quando o tamanho de partícula é menor. Porém, os processos aplicados para reduzir o tamanho de partícula apresentam uma alta demanda energética e, consequentemente, encarecem o processo;

- √ **Estrutura da celulose:** o grau de cristalização da celulose apresenta-se como um limitante da hidrólise desta estrutura. Assim, quanto menor o grau de cristalização da celulose maior sua digestibilidade;
- √ **Poder iônico do meio:** a acidez ou alcalinidade do meio são determinantes para favorecer a separação entre as frações que compõem a matriz sólida e, inclusive, a monomerização das mesmas;
- √ **Umidade:** a presença de água no pré-tratamento diminui a temperatura de degradação da lignina, facilitando sua remoção da fibra, assim como determina a concentração de carboidratos removidos.

A eficiência do pré-tratamento não pode ser determinada pelo efeito independente das variáveis do processo. Assim, destaca-se o sinergismo ente a temperatura, tempo e acidez do meio, utilizadas para definir um parâmetro adimensional denominado "grau de severidade", o qual tem sido associado com a eficiência dos processos e a formação de inibidores (SCHELL *et. al.*, 2003).

2.4.1 Pré-tratamento ácido

Esta técnica é especialmente útil na separação e solubilização da fração hemicelulósica. O pré-tratamento ácido pode ser dividido em dois tipos: ácido concentrado a baixa temperatura e ácido diluído a alta temperatura. O ácido sulfúrico é amplamente empregado neste tipo de pré-tratamento, sendo também reportado o uso de ácido clorídrico, nítrico, fosfórico e trifluoroacético. Seja qual for a concentração de ácido utilizada, uma desvantagem do processo é a necessidade de neutralizar os hidrolisados, gerando-se uma grande quantidade de resíduo (GÁMEZ *et al.*, 2006; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; GÍRIO *et al.*, 2010).

Os processos utilizando ácidos concentrados permitem a hidrólise tanto de hemicelulose quanto de celulose, com a vantagem de condução do processo em condições moderadas de temperatura e a independência do uso de enzimas. Porém, há uma grande corrosão de equipamentos e degradação de açúcares,

sendo, adicionalmente, necessária a recuperação dos ácidos para viabilizar o processo (GÍRIO *et al.*, 2010).

Quando realizada com ácidos diluídos, permite, igualmente, aumentar a susceptibilidade da celulose para futuros processos de hidrólise, sem afetar, notavelmente, sua estrutura base. Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros glicídios. No pré-tratamento com ácido diluído é utilizado, preferencialmente, ácido sulfúrico em faixas entre 0,5% e 1,5% com temperaturas que variam entre 121ºC e 160ºC (GÍRIO *et al.*, 2010).

Durante a hidrólise ácida, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. Com a clivagem dos polímeros são liberadas diversas substâncias, sendo majoritária a presença de xilose, glicose e arabinose (AGUILAR *et al.*, 2002; SUN & CHENG, 2002; CUZENS & MILLER, 1997; RODRÍGUEZ-CHONG *et al.*, 2004; MOSIER *et al.*, 2005a).

Processos de hidrólise ácida têm sido investigados em escala piloto para obter glicídeos fermentáveis a partir de bagaço de cana. No Brasil, tem-se desenvolvido um processo denominado DHR (Dedini Hidrólise Rápida), no qual o bagaço é misturado em contracorrente com uma solução aquecida de água, ácido sulfúrico e etanol. A solução aquosa separada da mistura é posteriormente resfriada e neutralizada com cal, precisando ser misturada com melaço de cana para sua fermentação. A lignina é separada e o etanol recirculado ao processo (FAIRBANKS, 2003).

2.4.2 Inibidores do processo de fermentação gerados durante os pré-tratamentos

Como uma desvantagem do uso de pré-tratamentos, destaca-se a formação de inibidores do crescimento celular e da fermentação. Por exemplo, a presença de hexoses como manose, galactose e glicose, e/ou de pentoses, pode promover uma diminuição na utilização da xilose, por preferência metabólica por esses glicídeos, ou a inibição das enzimas responsáveis pelo metabolismo ou transporte desta pentose. Contudo, o consumo de xilose é restabelecido quando

esgotados esses glicídeos fermentáveis (DU PREEZ, *et al.* 1986b; AGBOGBO *et al.* 2006; RUNQUIST *et al.* 2010).

Outros tipos de inibidores podem limitar, e até impedir, o consumo do substrato e/ou reduzir a cinética de crescimento, prejudicando o desempenho da fermentação. A inibição pode também ser resultado da sinergia entre as várias substâncias presentes no hidrolisado. Entre os inibidores mais comuns tem-se:

a) **Ácido acético:** este ácido é gerado a partir dos grupos acetil presentes na estrutura hemicelulósica. Tem-se reportado concentrações de até 16,7 g/L em hidrolisado de bagaço de cana, dependendo das condições nas quais é realizada a hidrólise ácida (PARAJÓ *et al*., 1998). O ácido, na forma não dissociada prevalente no pH ótimo de fermentação (5,5 – 6,0), pode-se difundir ao citoplasma da célula, se dissociar e reduzir o pH intracelular, prejudicar o transporte de nutrientes através da membrana e gerar problemas para a produção de energia, aumentando o requerimento energético da célula (SREENATH & JEFFRIES, 2000). Adicionalmente, o ácido acético inibe a atividade de enzimas como endolases, fosfogliceromutase, aldolases e triosefosfato isomerase (PAMPULHA & LOUREIRO, 1990; FERRARI *et al.*, 1992). Todos esses fatores desencadeiam em fermentações com uma drástica diminuição na concentração e produtividade volumétrica de etanol e na taxa de consumo do substrato (FERRARI *et al.*, 1992).

A assimilação do ácido pelas leveduras depende, principalmente, da sua concentração e do pH do meio, fatores chave na dissociação do ácido, assim como do nível de aeração do meio. Mecanismos semelhantes de inibição têm sido reportados para o acetaldeído (FERRARI *et al.*, 1992);

b) **Furfural:** é um aldeído com natureza aromática formado durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos que contêm pentoses (GUTIÉRREZ *et al.*, 2002). Este tipo de substância reduz o crescimento celular, a formação de ATP e a produção de etanol (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Segundo o tipo de microrganismo, pode causar a morte da célula ao interferir com a respiração e a fosforilação oxidativa. Para se proteger da ação do furfural, algumas leveduras conseguem reduzir este furano a compostos menos tóxicos como furan-metanol e furan-dimetanol em reações dependentes do co-fator NAD(P)H. Em *S. cerevisiae*, modificada para utilização de xilose, foi comprovado que o furfural induz ao acúmulo de

espécies reativas de oxigênio que, consequentemente, gera danos em mitocôndrias (o que interfere no processo respiratório), vacúolos, citoesqueleto de actina e a cromatina nuclear (ALLEN *et al.*, 2010);

c) **Hidroximetilfurfural (HMF):** com um mecanismo de ação similar ao descrito para o furfural, o HMF é assimilado em taxas menores, tendo o efeito de aumentar a fase lag de crescimento das células, principalmente por inibir enzimas como triose-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase, mas numa intensidade menor ao furfural (MODIG *et al.*, 2002; PETERSSON *et al.*, 2006). Esta substância é gerada pela degradação de hexoses durante o processo de hidrólise (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Adicionalmente, Petersson *et al.* (2006) demonstraram que a redução do HMF é dependente dos co-fatores NADH e NADPH;

d) **Compostos Fenólicos:** Estes compostos são gerados nos processos de degradação da lignina. As substâncias fenólicas atuam debilitando as membranas celulares, o que diminui a capacidade de proteção e produção enzimática das células. Adicionalmente, tem sido reportada a inibição do metabolismo de crescimento e produção de enzimas, assim como do consumo de xilose na presença de alguns compostos fenólicos de baixa massa molecular. Entre as substâncias fenólicas geradas na degradação da lignina encontram-se: ácido p-hidroxibenzóico, ácido m-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, cinamaldeído, p-hidroxicinamaldeído, álcool coniferílico e álcool 3,5-dimetoxi-4-hidroxinamílico. Cabe destacar que os ácidos aromáticos são menos tóxicos que seus aldeídos e que os ácidos graxos de baixa massa molecular (entre 6 e 9 carbonos) são mais inibidores que aqueles de alta massa molecular (em torno de 16 carbonos), embora o mecanismo de inibição não tenha sido elucidado (PALMQVIST *et al.*, 1999. PARAJÓ *et al.*, 1998; PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Adicionalmente, os compostos fenólicos apresentam diferentes graus de inibição sob xilanases, celulases e β-glicosidase, enzimas utilizadas na hidrólise de material lignocelulósico pré-tratado (BERLIN *et al.*, 2006).

Além de substâncias provenientes da degradação das frações do material lignocelulósico, alguns íons de metais gerados pela corrosão de equipamentos podem ser inibidores. Por exemplo, os íons Zn^{2+}, Cd^{2+} e Co^{2+} são inibidores da

enzima xilose desidrogenase, de destacada importância no metabolismo da xilose (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Adicionalmente, deve-se ressaltar que o efeito inibitório de algumas das substâncias enumeradas é potencializado pela presença de outras, como no caso do ácido acético e furfural (PALMQVIST *et al.*, 1999), e pode ser diminuído com altas concentrações iniciais de biomassa (LARSSON *et al.*, 1998; BETANCUR, 2005).

Diferentes processos têm sido propostos para diminuir a concentração de inibidores em hidrolisados hemicelulósicos. Entre os mais conhecidos encontram-se: mudanças de pH com CaO, $Ca(OH)_2$, H_2SO_4, utilização de carvão ativo, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos e até enzimas (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; POUTANEN *et al.*, 1990; HAHN HÄGERDAL *et al.*, 1991 e 1998).

Outra estratégia utilizada para minimizar o efeito inibitório refere-se à aclimatação do microrganismo ao meio, utilizando uma metodologia de cultivos sucessivos em meios que contenham, gradativamente, maiores concentrações de substâncias inibidoras (BETANCUR, 2005). Essa metodologia tem permitido aumentos na concentração de etanol, produtividade e rendimento, em fermentações de resíduos de madeira pela levedura *Pichia stipitis* (NIGAM, 2001a). A aclimatação apresenta-se, portanto, como uma metodologia que permite prescindir de etapas de destoxificação, as quais representam custos elevados no processo global de produção de etanol a partir de hidrolisados.

2.5 APROVEITAMENTO DE CELULOSE

Para o aproveitamento da fração celulósica é necessária a clivagem da ligação β(1,4)-glicosídica da molécula de celulose. Com isto, podem ser produzidas moléculas, com grau de polimerização menor, afetando as propriedades físico-químicas do meio. Ao começar a hidrólise enzimática a celulose é segmentada em celudextrinas, de no máximo seis unidades de glicose, que, ao se solubilizarem, fazem com que a densidade e a viscosidade da fase líquida variem, influenciando os fenômenos de transferência de massa. Entre os diferentes tipos de hidrólise distinguem-se a química e a enzimática.

Na química podem ser empregados meios ácidos ou alcalinos, sendo a hidrólise ácida a mais comum. Em meio ácido a degradação é dependente do pH, sendo necessárias condições severas para uma hidrólise total, seja de alta concentração de ácido com temperatura e pressão moderadas ou concentração moderada de ácido com altas temperatura e pressão. Porém, os processos de hidrólise ácida da celulose geram compostos derivados da glicose (hidroximetilfurfural), os quais são inibidores microbiológicos, impossibilitando as etapas de bioconversão e fermentação microbiológica desejadas em processos posteriores, como mencionado anteriormente (BADGER, 2002; D´ALMEIDA, 1988).

A hidrólise enzimática de celulose só é possível pela ação de um conjunto de enzimas denominadas celulases que clivam as ligações β(1,4) da celulose e podem ser produzidas por uma ampla gama de fungos. As celulases são enzimas que atuam sinergicamente como um sistema multicomponente na degradação do homopolímero, sob condições brandas de pressão, temperatura e pH, e com uma especificidade que elimina a possibilidade de formação dos componentes tóxicos que dificultam os processos subsequentes (LYND *et al*., 2005, LYND *et al*., 2002; BHAT & BHAT, 1997).

O consórcio enzimático utilizado na hidrólise da celulose é denominado complexo celulásico, e as enzimas constituintes podem ser classificadas como Endoglucanases, Exoglucanases e ß-glucosidases, segundo suas características de atuação no substrato celulósico (LYND *et al*., 2002; HENRISSAT, 1991).

As endoglucanases, com nome sistemático 4-(1,3;1,4)-ß-D-glucana 4-glucanohidrolase (segundo International Union of Biochemistry and Molecular Biology), também encontram-se referenciadas na literatura como endo-1,4-ß-D-glucanases, ß-1,4-glucanases, ß-1,4-endoglucana hidrolases, álcali celulases e celodextrinases. Tais enzimas clivam, randomicamente, as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, consequentemente, novos terminais, sendo um redutor e outro não redutor (LYND *et al*., 2002). As endoglucanases são as enzimas responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização), devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (KLEMAN-LEYER *et al*., 1996).

O grupo das exoglucanases é constituído pelas celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). As GHs (nome sistemático 1,4-ß-D-glucana-

glucanohidrolases) também podem ser denominadas exo-1,4-ß-glucosidases, exocelulases, exo-ß-1,4-glucosidases, exo-ß-1,4-glucanases, ß-1,4-ß-glucanases e exo-1,4-ß-glucanase. Estas enzimas, embora pouco relatadas, possuem característica de hidrolisar as fibras liberando glicose diretamente dos terminais do polímero (LYND *et al*., 2002). As CBHs (nome sistemático 1,4-ß-D-glucana-celobiohidrolases) são também conhecidas como exo-celobiohidrolases, ß-1,4-glucana celobiohidrolases, ß-1,4-glucana celobiosilhidrolases, 1,4-ß-glucana celobiosidases, exoglucanases, avicelases, C1 celulases, exo-ß-1,4-glucana celobiohidrolases e celobiosidases. Estas enzimas participam da hidrólise primária da fibra, sendo responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente. Porém, sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, ocasionando uma desestratificação das fibras pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas ao processo de hidrólise enzimática (ZHANG & LYND, 2004; LYND *et al*., 2002). Essas enzimas, geralmente, sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (LAUREANO-PEREZ *et al*., 2005).

As enzimas ß-glucosidases englobam as enzimas ß-glucosidásicas, ou ß-glucosídeo glucohidrolases (nome sistemático). Outras denominações podem ser gentiobiase, celobiase, emulsina, elaterase, aril-ß-glucosidase, ß-D-glucosidase, ß-glicosídeo glucohidrolase, arbutinase, amigdalinase, p-nitrofenil ß-glucosidase, primeverosidase, amigdalase, limarase e salicilinase (LYND *et al*., 2005; LAUREANO-PEREZ *et al*., 2005). As ß-glucosidases têm a capacidade de catalisar a hidrólise da celobiose e dos oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose. Assim como as celobiohidrolases, estas também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise, com algumas exceções (RIOU *et al*., 1998).

2.6 APROVEITAMENTO DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA

Como mencionado anteriormente, a hemicelulose compõe-se, principalmente, da pentose denominada xilose, a qual possui diversas aplicações industriais. Uma vez que esta pesquisa está direcionada à produção biotecnológica de etanol aproveitando esta pentose, será abordado, a seguir, a rota metabólica para a produção de etanol a partir da xilose, especificamente.

2.6.1 Catabolismo da xilose

A conversão estequiométrica de xilose em etanol, esboçada na Figura 2.20, indica que para cada 3 moles de xilose pode-se produzir, como máximo teórico, 5 moles de etanol, acompanhado do desprendimento do mesmo número de moles de CO_2. Em outras palavras, o rendimento máximo teórico do processo é de 0,51 g de etanol para cada 1,00 g de xilose. Na realidade, este rendimento não pode ser alcançado porque parte do substrato precisa ser desviado para o crescimento e manutenção da célula e para formação de outros subprodutos intrínsecos ao metabolismo e, no caso específico de xilose, existe adicionalmente um forte requerimento energético para o transporte da pentose através da membrana celular (GÍRIO *et al*., 2010).

$3\ C_5H_{10}O_5$	$\Rightarrow$	$5\ C_2H_5OH$	+	$5\ CO_2$
1g		0,51g		0,489g

Figura 2.20 Reação global de conversão de D-xilose a etanol

A D-xilose pode ser utilizada como substrato potencial por diferentes tipos de microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As bactérias degradadoras de D-xilose possuem a enzima xilose-isomerase capaz de converter essa pentose em D-xilulose, que é, posteriormente, fosforilada pela enzima xiluloquinase em D-xilulose-5-fosfato, um intermediário comum no metabolismo de células eucarióticas e procarióticas.

No caso de leveduras, a primeira reação do metabolismo da D-xilose (Figura 2.21) é a sua redução em xilitol, catalisada pela enzima xilose redutase (XR), tendo como co-fator NADPH ou NADH, dependendo da linhagem. O xilitol pode ser, posteriormente, oxidado a D-xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase (XDH) a qual requer a coenzima NAD+. Subsequentemente, a fosforilação até D-xilulose-5-fosfato é catalisada pela enzima xilulose quinase com o consumo de ATP (JEFFRIES *et al*., 2007; MATSUSHIKA, *et al*. 2008).

Através da via Embdem-Meyerhof-Parnas, o gliceraldeído-3-fosfato e a frutose-6-fosfato são convertidos em piruvato, com geração de NADPH necessário em outras etapas metabólicas. Em condições anaeróbias, ou de baixa oxigenação, o piruvato é convertido em etanol através da catálise com duas

enzimas (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase) e a reoxidação de NADH. Em condições de aerobiose, o piruvato é oxidado por meio do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Krebs) na cadeia respiratória (fosforilação oxidativa) (BRITO, 2000; BRÜINENBERG *et al.*; 1984, MATSUSHIKA, *et al*. 2008).

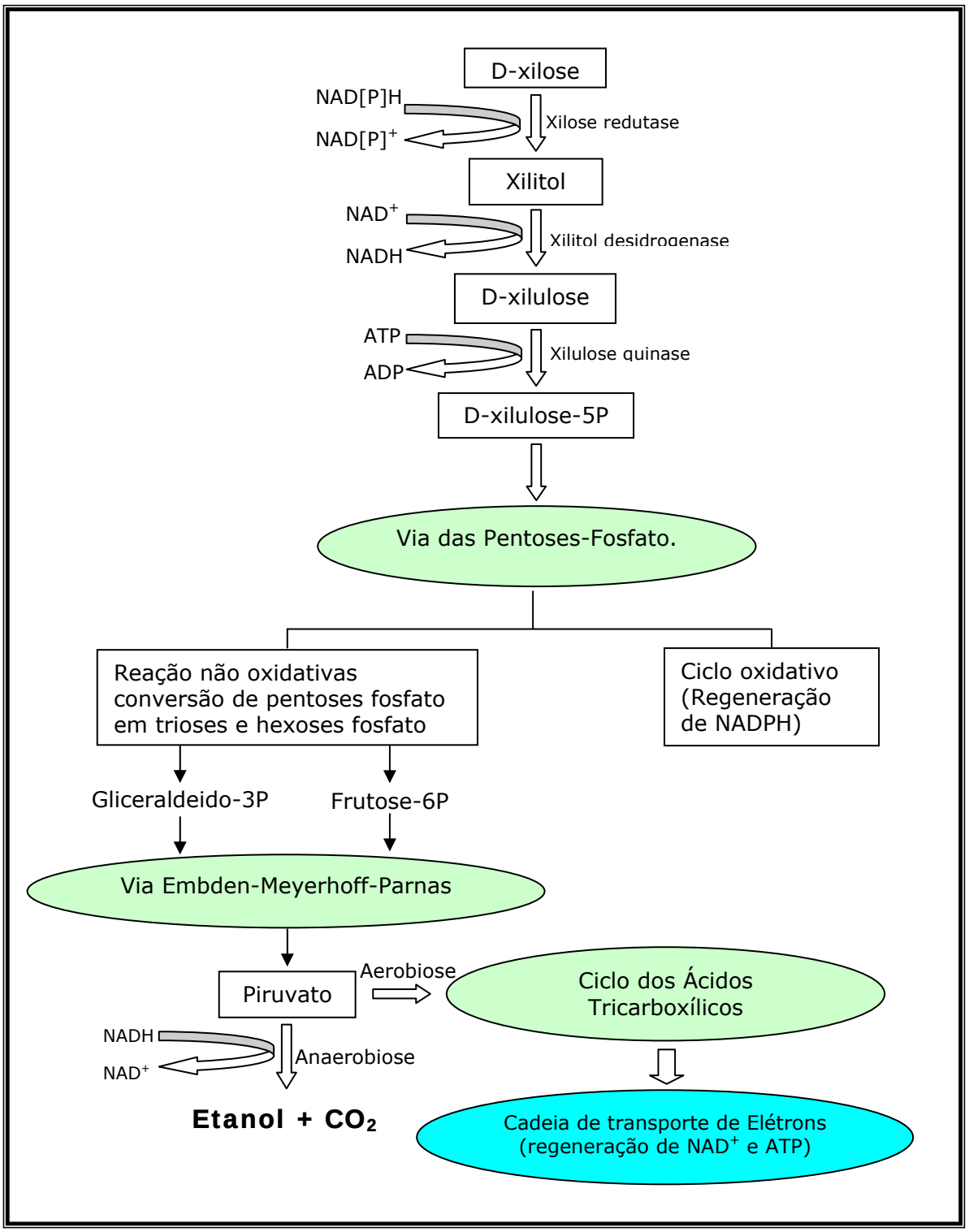


Figura 2.21 Metabolismo de D-xilose em leveduras
Fonte: Adaptado de PARAJÓ et al. (1998)

Sob condições de anaerobiose estrita ou de limitação de oxigênio, algumas leveduras degradadoras de D-xilose, com XR dependente tanto de NADH como de NADPH, podem regenerar o NAD+ consumido na segunda reação do metabolismo. Esta dupla especificidade permite balancear o potencial redox em NAD+/NADH da XDH alterado pelo bloqueio da cadeia respiratória devido à ausência de oxigênio. Nestes casos, nos quais se inclui a levedura *Pichia stipitis*, tem-se maior produção de etanol com um acúmulo de xilitol desprezível (MUSSATO & ROBERTO, 2002). A dupla especificidade da enzima, própria desta levedura, também foi observada por Sá (1993); Antunes (1997) e Leal (1998).

As enzimas XR e XDH são apresentadas como catalisadores-chave no metabolismo de xilose, sendo altamente dependentes de co-enzimas, cuja regeneração está ligada ao processo respiratório celular. Desta forma, é importante determinar um nível de oxigênio que permita altas taxas de produção de etanol, concomitante com baixo crescimento celular, sem prejuízo da viabilidade e capacidade produtora da célula (JEFFRIES *et al*., 2007). Adicionalmente, Matsushika *et al*. (2008) determinaram como relevante a presença da xilose quinase para aumentar a produção de etanol em detrimento do acúmulo de xilitol.

2.6.2 Microrganismos para produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos

A produção de etanol a partir dos açúcares constituintes da fração hemicelulósica é essencial para o sucesso econômico do aproveitamento de materiais lignocelulósicos. D-xilose, principal açúcar da fração hemicelulósica, pode ser utilizada para a produção de etanol por diferentes tipos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, naturalmente ocorrentes e/ou recombinantes. (OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996; MATSUSHIKA, *et al.* 2008; GÍRIO *et al.*, 2010).

No caso de leveduras, naturalmente ocorrentes, as mais eficientes fermentadoras de xilose são *Pachysolen tannophylus*, *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* (BARNETT *et al.*, 1983). Para melhorar o desempenho dessas linhagens, quanto à produção de etanol, diferentes autores recomendam controlar a produção de xilitol e a assimilação do etanol, como no caso de *Pachysolen*

tannophilus, em processos intimamente ligados com o controle rigoroso de oxigenação (LIGTHELM *et al.*, 1988; LOHMEIER-VOGEL *et al.*, 1989; SKOOG *et al.*, 1992).

A tendência nas pesquisas sinaliza os microrganismos *E. coli*, *Z. mobilis. S. cerevisiae e P. stipitis* como os que possuem maior potencial para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Na Tabela 2.7 são sumarizadas algumas vantagens e desvantagens para cada um destes microrganismos.

Tabela 2.7 Características mais relevantes dos principais microrganismos utilizados na fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Característica	Microrganismo			
	E. coli	*Z. mobilis*	*S. cerevisiae*	*P. stipitis*
Fermenta D-glicose	+	+	+	+
Fermenta outras hexoses	+	-	+	+
Fermenta pentoses	+	-	-	+
Utiliza diretamente hemicelulose	-	-	-	f
Fermenta em anaerobioses	+	+	+	-
Formação de co-produtos	+	f	f	f
Produtividade em etanol	-	+	+	f
Tolerância ao etanol	f	f	+	f
Tolerância a inibidores lignocelulósicos	f	f	+	f
Osmotolerância	-	-	+	f
Tolerância a amplo pH	-	-	+	f
Microrganismo reconhecido como seguro	-	+	+	+

+, positivo, -, negativo; f, fraco

Fonte: GÍRIO *et al.* (2010)

Considerando-se as características próprias de cada tipo de microrganismo para a produção de etanol a partir de xilose, fica claro que entre os microrganismos naturalmente ocorrentes a levedura *Pichia stipitis* destaca-se por ser uma das melhores produtoras de etanol a partir desta pentose, ao se verificar um melhor balanceamento na dupla especificidade das enzimas XR e XDH. Adicionalmente, sua característica floculante apresenta-se altamente vantajosa para sua aplicação para processos em escala industrial (PEREIRA Jr., 1991; BETANCUR, 2005; GÍRIO *et al.*, 2010).

2.6.3 Microrganismos geneticamente modificados visando à produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

Na literatura observam-se numerosos esforços para desenvolver microrganismos, mediante técnicas de melhoramento genético ou evolução direcionada, principalmente, visando se obter um agente biológico que supere as características da *P. stipitis* na fermentação de pentoses e, simultaneamente, apresente um desempenho comparável ao da *S. cerevisiae* durante a fermentação de hexoses (GÍRIO *et al.*, 2010; NAIK *et al.*, 2010).

A bactéria *E. coli* foi modificada para expressar as enzimas próprias do metabolismo de *Z. mobilis* próprias da produção de etanol, sendo necessário aplicar técnicas de evolução direcionada para aumentar a tolerância ao etanol e resistência a aldeídos (entre eles o furfural e hidroximetilfurfural). Porém, estes microrganismos apresentaram um grau de instabilidade do fenótipo, sendo inadequadas para fermentações sequênciais ou em contínuo (YOMANO *et al.*, 2008; GÍRIO *et al.*, 2010). Em uma outra abordagem, linhagens não recombinantes de *E. coli* tem sido modificadas por mutação e evolução direcionada para produzir etanol por fermentação de xilose e glicose, alcançado um rendimentos de até 80% do teórico (YOMANO *et al*., 2008; CHEN *et al.*, 2010).

Quando utilizada a bacteria *Z. mobilis*, as estratégias para modificação do microrganismo apontam a inserção de enzimas que permitam a fermentação de uma ampla gama de carboidratos além da glicose, com destaque para xilose e arabinose, sendo possível atingir até 86% do rendimento teórico. Para alcançar esta finalidade, tem se inserido em *Z. mobilis* a capacidade de expressão de enzimas como xilose isomerase, xilulosequinase, transaldolase, transquetolase, L-arabino isomerase, entre outras, observando um rendimento de até 96% do rendimento teórico quando utilizado um único substrato, mas com baixas taxas de produção de etanol. Quando inserida a dupla capacidade de fermentação (xilose e arabinose) a co-fermentação de açúcares tem atingido rendimentos de 84% do teórico e uma ordem preferencial no consumo, primeiro glicose, depois xilose e por último arabinose (MOHAGHEGHI *et al.*, 2002).

No caso de *Saccharomyces cerevisiae* diferentes abordagens têm sido realizadas. Em alguns casos procurou-se pela expressão de enzimas próprias para a hidrólise de celulose e hemicelulose. Neste contexto, tem sido reportada a

expressão de celulases, β-glicosidase, xilanases e β-xilosidases, entre outras, já com algumas aplicações industriais (FUJITA *et al*., 2004; DEEN HAAN *et al*., 2007). Entretanto, a expressão de múltiplas enzimas em um mesmo microrganismo tem gerado uma diminuição na capacidade fermentadora da levedura.

Em uma outra abordagem tem-se procurado aumentar a capacidade da levedura *S. cerevisiae* para metabolizar xilose. Inicialmente, investigaram-se processos na presença da enzima xilose isomerase. Esta enzima transforma a pentose em xilulose, que pode ser facilmente consumida por esta levedura. Porém, existe uma incompatibilidade entre a temperatura e pH de atuação da enzima e do microrganismo (GONG *et al.*, 1981; OLSSON & HAHN-HÄGERDAL, 1996). Como uma alternativa, e destacando-se como uma das mais pesquisadas, encontra-se a inserção de genes para expressão de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), oriundos de *Pichia stipitis*, mas os resultados mostraram-se pouco promissores pelo acúmulo de xilitol em detrimento da produção de etanol (KÖTTER & CIRIACY, 1993). Já quando inserido o gene para a super-expressão de xilulose quinase, visando diminuir o acúmulo de xilitol, a levedura *S. cerevisiae* consegue um melhor desempenho, mas com altos requerimentos de fontes de nitrogênio e baixo crescimento celular (MATSUSHIKA, *et al.* 2008). Uma das alternativas mais promissoras refere-se à inserção da expressão de XR e XDH modificando-se a especificidade dos co-fatores (NADH ou $NADP^+$) (BENGTSSON *et al*., 2009). Adicionalmente, Runquist *et al.* (2010) demonstraram que *S. cerevisiae*, modificada para expressar XR e XDH, melhora seu desempenho na fermentação de xilose quando introduzida, adicionalmente, a expressão heteróloga de transportadores específicos para xilose (próprios de *P. stipitis*), porém só em concentrações de pentose abaixo de 15 g/L de xilose e concentrações de glicose baixas.

A inserção da capacidade de consumo de arabinose tem sido uma outra abordagem para modificação da levedura *S. cerevisiae*. Neste contexto, tem sido reportada a expressão de L-arabinose isomerase (de *B. subtilis*) e a super-expressão de transportadores específicos para este substrato (BECKER & BOLES, 2003). Em outros casos, tem sido registrada a expressão em *S. cerevisiae* de todas as enzimas fúngicas responsáveis pelo catabolismo de arabinose (WISSELINK *et al*., 2007).

As pesquisas mais recentes apontam ao desenvolvimento de uma linhagem de *S. cerevisiae*, proveniente de processos industriais, que além de fermentar glicose, xilose e arabinose, apresente alta resistência aos inibidores encontrados em hidrolisados provenientes do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL *et al*., 2007; BETTIGA *et al*., 2008; GÍRIO *et al*., 2010).

Em *P. stipitis* tem-se procurado, via engenharia genética e evolução direcionada, o melhoramento na eficiência na fermentação de xilose, a inserção da capacidade de fermentar em condições de anaerobiose e aumentar a tolerância a diferentes inibidores próprios de hidrolisados hemicelulósicos (NIGAM, 2001c; JEFFRIES *et al*., 2007). Em outra abordagem, visando a utilização desta levedura em processos consolidados (fermentação simultânea de diferentes carboidratos e produção de enzimas hidrolíticas), tem sido inserida a expressão heteróloga de xilanases para conversão de xilanas e xilo-oligosacarídeos em etanol (DEN HAAN & VAN ZYL, 2003). Os estudos do genoma e as características de transcrição da levedura *P. stipitis* têm aberto novas perspectivas para o desenvolvimento de linhagens visando o melhoramento dos processos de fermentação, quando utilizado hidrolisado hemicelulósico (JEFFRIES & VAN VLEET, 2009).

2.6.4 Fatores ambientais que afetam a fermentação de xilose

Além de escolher um microrganismo apropriado para o processo de fermentação, é de crucial importância determinar a composição do meio favorável ao processo e as condições da fermentação que permitam obter os melhores resultados. Nesse sentido, são apresentados, a seguir, alguns parâmetros mais relevantes ao processo de fermentação alcoólica a partir de xilose.

a) Grau de aeração

O suprimento de oxigênio pode ser destacado como um dos fatores ambientais mais importantes na fermentação alcoólica de xilose por leveduras, influenciando o crescimento celular, o rendimento e a produção de etanol, assim como a formação de produtos. Isto indica que a taxa de aeração é determinante na quantidade de carbono utilizada pela célula para crescimento celular ou

formação de etanol, existindo um nível de oxigenação que levaria ao alto rendimento e produtividade em etanol, coincidentes com baixo rendimento em biomassa (SCHNEIDER, 1989; RIZZI *et al.*, 1989, FERRARI *et al.*, 1992; JEFFRIES *et al.*, 2007).

Este comportamento foi confirmado para *Pichia stipitis* quando Guebel *et al.* (1991) e Ferrari *et al.* (1992) verificaram a impossibilidade de otimizar a produção de biomassa e a formação de produto com um único valor de taxa de transferência de oxigênio (OTR), sendo apropriado um processo aeróbio para o crescimento celular e condições microaeróbias para maximizar a produtividade em etanol. Esses pesquisadores indicam que, para meios sintéticos, a taxa de transferência de oxigênio para produção de etanol deve variar entre 0,7 e 8,5 mmol/L.h, dependendo da concentração de substrato e da concentração do inóculo. Adicionalmente, tanto para a levedura mencionada como para *Pachysolen tanhophilus* e *Candida shehatae*, tem se reportado baixo requerimento de oxigênio para obter uma máxima produção de etanol e, em caso contrário, acúmulo de xilitol ou reassimilação do mesmo (HANH-HÄGERDAL *et al.*, 1991).

A oxigenação, como discutido anteriormente, é necessária para manter o balanço redox nas diferentes reações envolvidas na degradação de xilose e na manutenção do microrganismo. Além disso, publicações sinalizam como necessária uma oxigenação adequada para o transporte eficaz de xilose e para algumas funções mitocondriais (SKOOG *et al.*, 1992).

b) pH

Os rendimentos em etanol são fortemente afetados pelas variações de pH. No caso da levedura *Candida shehatae* CBS 2779 tem sido reportado uma produtividade volumétrica máxima utilizando um intervalo de pH entre 4 e 5 (DU PREEZ *et al.*, 1986a). Para *Pichia stipitis* CBS 716, o intervalo está entre 4,5 e 6, sendo este último valor de pH o mais apropriado (SLININGER *et al.*, 1990). No caso de *Pachysolen tannophilus* altas produtividades são possíveis numa faixa de 2,5 a 5,0 (SLININGER *et al.*, 1985).

É importante ressaltar que o pH ótimo para o crescimento e/ou produção de etanol é função direta do microrganismo estudado. Porém, as discrepâncias no comportamento do microrganismo os valores ótimos para produção de etanol, reportados na literatura, podem ser atribuídos a outras condições de processo,

ao tipo de controle de pH e/ou à metodologia empregada para o cálculo de parâmetros comparativos (DU PREEZ, 1994; KASTNER *et al.*, 1996).

c) Temperatura

Tem-se demonstrado que, em um intervalo de temperatura entre 30°C e 32°C, obtém-se a concentração de etanol máxima em fermentação com *Pichia stipitis* CBS 7126 (SLININGER *et al.*, 1990). Tanto em fermentações empregando *P. stipitis* como *Candida shehatae* CBS 2779 reporta-se uma acentuada diminuição na formação de produto com o aumento de temperatura a valores acima do ótimo (30°C), assim como diferentes intervalos ótimos de produção para etanol e xilitol, sendo a formação dessa última substância mais sensível aos aumentos de temperatura (BARBOSA *et al.*, 1990). Cabe destacar que a temperatura ótima do processo não só depende da linhagem, mas também do substrato utilizado (glicose e/ou xilose), sua concentração e da presença de outros compostos.

d) Concentração de substrato

O consumo de xilose é fortemente influenciado pela concentração inicial desta pentose em fermentações realizadas com *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*. Em investigações realizadas com *P. stipitis* Y 7124, encontrou-se que o rendimento em etanol permanecia constante entre 20 e 110 g/L. Embora não tenha sido verificado acúmulo de xilitol em concentrações acima dos 110 g/L, tem-se reportado rendimentos gradativamente menores (LAPLACE *et al.*, 1991). Segundo Roberto *et al.* (1991), em investigações com *P. stipitis*, a levedura sofre inibição em fermentações com concentrações iniciais entre 76 e 99 g/L, sendo o rendimento em etanol afetado para concentrações acima de 145 g/L.

Adicionalmente, existem pesquisas nas quais se afirma que o acúmulo de xilitol, durante fermentações com leveduras, obedece mais às condições ambientais, como a disponibilidade de oxigênio e alta densidade celular, do que à concentração inicial de substrato (DU PREEZ *et al.*, 1986b).

Outros autores reportam que a levedura *Pichia stipitis* CBS 5773 apresenta uma queda no seu rendimento em etanol de 0,41 para 0,39 g/g, quando a concentração de xilose é aumentada de 50 para 200 g/L (SLININGER *et al.*, 1985). No caso da linhagem *P. stipitis* CBS 5774, concentrações entre 80 e 100 g/L de xilose foram reportadas como as melhores para a fermentação de xilose

em etanol, mas constatou-se uma diminuição drástica nos valores dos parâmetros de fermentação para concentrações acima de 150 g/L (ANTUNES, 1997).

e) Concentrações de etanol

A tolerância das leveduras ao etanol é de vital importância para alcançar altos níveis de produção e viabilizar a destilação do meio fermentado. Essa tolerância difere para cada linhagem de levedura, sendo afetada pelas condições de cultivo, especialmente pela temperatura (DU PREEZ *et al.*, 1987).

Em fermentações realizadas com várias linhagens de *Candida shehatae* e com *Pichia stipitis* Y633 (CBS 7126), conduzidas em batelada alimentada com baixo nível de oxigenação, o crescimento celular foi sensível ao efeito inibitório do etanol adicionado. As linhagens *P. stipits* Y633 (CBS 7126), *C. shehatae* CSRI Y633 e *C. shehatae* CSRI Y492, apresentaram-se como as melhores produtoras, alcançando concentrações entre 44 e 47 g/L de etanol (DU PREEZ *et al.*, 1987).

Em investigações realizadas com *Pichia stipitis* NRRL Y7124, encontrou-se uma tolerância ao etanol dependente do substrato (glicose ou xilose). Esta relação entre a tolerância e o substrato foi estudada a partir do crescimento e a atividade da ATPase presente na membrana plasmática para cultivos com glicose ou xilose, sendo melhores as atividades apresentadas em processos realizados utilizando a hexose (MEYRIAL *et al.*, 1995). Nessa mesma linhagem, em estudos realizados para avaliar o efeito do etanol, observou-se que, com o aumento da concentração deste produto no meio, foi gerado um aumento linear no rendimento em xilitol, soluto compatível ao efeito inibidor e, consequentemente, ocorreu uma diminuição proporcional no rendimento em etanol (DELGENES *et al.*, 1988).

Existem diferentes pesquisas focadas na liberação da xilose que constitui a fração hemicelulósicos, pela utilização de diversos tipos de pré-tratamentos para vários materiais lignocelulósicos. Porém, poucos trabalhos reportam as características fermentativas de tais hidrolisados. Na Tabela 2.8 sumarizam-se alguns dos trabalhos mais relevantes nesta temática, indicando-se o tipo de material empregado, o pré-tratamento aplicado e os resultados de fermentação do hidrolisado hemicelulósico.

Tabela 2.8 Uso de *Pichia stipitis* na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos

Linhagem de *P. stipitis*	S_0 (g/L)	P (g/L)	t_f (h)	Material lignocelulósico	Condições de pré-tratamento	Referência
NCIM 3498	18,3	7,1	24	Madeira de *Prosopis juliflora* (*planta nativa do México*)	Ácido sulfúrico 3% (v/v), 120ºC e 30 min e uma relação S:L de 10% (m/v), com posterior destoxificação por *overliming*	Gupta *et al.*, 2009
NRRL Y-7124	45,0	19,1	60	Palha de trigo	Ácido sulfúrico 1,85% (m/v), 90ºC por 18 h e uma relação S:L de 20:1, com posterior destoxificação por ebulição (100ºC/15 min), *overliming* e concentrado a vácuo.	Nigam, 2001b
NRRL Y-7124	54,0	18,0	100	Biomassa de *Eichhornia crassipes* (*planta aquática*)	Ácido sulfúrico 1% (v/v), 90ºC por 7 h e uma relação S:L de 8:1, com posterior destoxificação por ebulição (100ºC/15 min), *overliming* e concentrado a vácuo.	Nigam, 2002
KCCM 12009	27,8 xilose 57,0 glicose	28,7[a]	48	Madeira (*Yellow poplar*) (Biomassa da plantação de tulipas)	Pré-tratamento alcalino para remoção de grupos acetil (0,5% NaOH/60ºC/60 min para uma relação de 1:5 S:L) e posterior hidrólise ácida em duas etapas (2 g sol:3,2 mL de H_2SO_4 24N/30ºC/1 h e, após adição de 12,8 mL de água, 105ºC/1 h)	Cho *et al.*, 2010
NRRL Y-7124	48,0	11,0	100	Casca de semente de girasol	Pré-tratamento ácido (1 g sol:5 mL de H_2SO_4 0,7 M/90ºC/3,5 h) e posterior *overliming* com adição de sulfito de sodio	Telli-okur & Eken-Saraçoglu, 2008
68784	50,0	20,5	120	Madeira (*sugar maple*) (árvore nativa dos EU)	Pré-tratamento (1 g sol:4 mL de água /165ºC/2 h), posteriormente, diluído em água (30:70) e suplementado com xilose	Xu & Liu, 2009

[a] Xilose residual no processo próxima aos 24 g/L

2.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A inserção do etanol de primeira geração no mercado dos combustíveis mostra ser uma excelente alternativa para a diminuição da dependência por combustíveis fósseis, especialmente para o transporte automotivo, e tendo como exemplos o Brasil, com um histórico que data da década dos 70, e os Estados Unidos, que nos últimos anos tornou-se o maior produtor de etanol e com grandes investimentos na área visando a um aumento expressivo na produção local. Porém, a expansão de cultivos dedicada à produção de energia, especialmente etanol de primeira geração, tem sido fortemente criticada por competir com a produção de alimentos, ora pela destinação do produto, como é o caso do milho, ora pela ocupação de regiões agricultáveis.

Como alternativa para aumentar a produção de etanol, sem cair nas problemáticas sinalizadas para o etanol de primeira geração, destaca-se a produção de etanol a partir de biomassas residuais, etanol de segunda geração. Neste contexto, além de se produzir etanol sem a necessidade de ampliação de áreas de cultivo, valoriza-se um resíduo situando-o como matéria-prima, com as vantagens de ser abundante e barato. Entre as biomassas residuais, destacam-se os materiais lignocelulósicos pelo seu teor de frações polissacarídeas e por ser uma das biomassas mais abundantes no planeta.

O aproveitamento de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, por via biotecnológica, apresenta-se como uma das tecnologias mais promissoras para suprir a crescente demanda mundial por este biocombustível e, adicionalmente, permitirá o desenvolvimento industrial sob o conceito de biorrefinaria. Este conceito fundamenta-se no aproveitamento integral das biomassas para a obtenção de produtos de interesse industrial de alto e baixo valor agregado. No caso dos materiais lignocelulósicos, no conceito de biorrefinaria, o aproveitamento integral das frações que compõem o material (celulose, hemicelulose e lignina), a integração energética e a sustentabilidade ambiental são fundamentais para viabilizar os processos e permitir um desenvolvimento em nível industrial.

Porém, ainda não tem sido alcançado o amadurecimento de cada uma das etapas que envolvem o aproveitamento de materiais lignocelulósicos, especialmente os pré-tratamentos que permitam a separação seletiva das frações e disponibilização dos monômeros constituintes de cada uma das frações,

sendo necessários grandes esforços para estabelecer o pré-tratamento mais apropriado, e as condições utilizadas nesse pré-tratamento, para cada tipo de material lignocelulósico.

No caso da separação seletiva de hemicelulose, o pré-tratamento com ácido diluído perfila-se como o mais apropriado por permitir uma eficiente separação seletiva, com um alto grau de monomerização. Contudo, as condições aplicadas para este tipo de pré-tratamento devem ser determinadas, criteriosamente, para minimizar a formação de compostos que possam agir como inibidores de processos enzimáticos, no caso da hidrólise enzimática de outras frações, ou fermentativos, como a ação de leveduras fermentadoras de xilose durante a obtenção de etanol.

No que diz respeito ao processo de fermentação dos açúcares em etanol, especialmente da xilose, as pesquisas apontam para o desenvolvimento de novos processos combinados, como a co-fermentação com glicose ou os denominados processos consolidados, onde se destaca a necessidade do desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados para a utilização desta pentose. No entanto, os processos reportados utilizando-se hidrolisado hemicelulósico com a aplicação desses microrganismos geneticamente modificados ainda não apresentam altas eficiências no aproveitamento de xilose ou requerem uma alta carga de insumos, principalmente fontes de nitrogênio, o que torna o processo economicamente inviável. Já entre os microrganismos naturalmente ocorrentes, a levedura *Pichia stipitis*, que apresenta uma tolerância superior aos inibidores próprios de hidrolisados hemicelulósicos, tem se mostrado apropriada para se obter altas eficiências de conversão na fermentação de xilose.

No Brasil, um dos países com o maior potencial para o desenvolvimento da indústria dentro do conceito de biorrefinaria, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta-se como um dos resíduos lignocelulósicos mais apropriados para aplicação na produção de etanol de segunda geração. Neste contexto, percebe-se a necessidade de desenvolver um pré-tratamento eficiente para este material, visando à separação seletiva da fração hemicelulósica, assim como se estabelecer condições que permitam o desdobramento do processo até alcançar uma escala industrial.

Adicionalmente, devem-se estabelecer as melhores condições de fermentação de hidrolisados hemicelulósicos, assim como o potencial real da

levedura *Pichia stipitis* que, como citado anteriormente, tem se destacado na fermentação de pentoses provenientes da fração hemicelulósica.

Em resumo, todos os novos desenvolvimentos direcionados à produção de etanol de segunda geração, a partir de material lignocelulósico, devem visar o aproveitamento de todas as frações constituintes do material, a sustentabilidade ambiental dos processos, a integração energética e a viabilidade econômica. Nesse contexto, novos processos devem atingir níveis que permitam ao etanol de segunda geração competir economicamente com combustíveis fósseis e, inclusive, etanol de primeira geração.

CAPÍTULO 3

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 JUSTIFICATIVA

O fornecimento de energia é fundamental para o desenvolvimento da sociedade, envolvendo aspectos desde o bem-estar até o desempenho industrial, tendo uma relação direta com a oferta e demanda características de cada região. Sendo os combustíveis fósseis a principal matéria-prima para a geração da energia consumida no mundo, as alterações no seu suprimento e seu preço, assim com as regulamentações políticas mundiais relacionadas com a produção e uso desta fonte, repercutem no normal desenvolvimento de todo o planeta e, nos últimos anos, tem gerado uma forte instabilidade nos preços dos combustíveis tradicionais, assim como em outros produtos derivados do petróleo, com uma tendência global de aumento. Esta problemática tem aumentado notavelmente o interesse pela substituição dos combustíveis tradicionais por biocombustíveis, na procura de uma independência às problemáticas associadas ao petróleo e, assim, diminuir seu uso. Neste contexto, destaca-se o esforço de setores econômicos, acadêmicos, industriais e governamentais para o desenvolvimento e implementação do etanol como combustível, sendo esta uma das alternativas mais promissoras.

Neste contexto, o uso de etanol como combustível, além de se mostrar como alternativa tecnicamente apropriada, também, possui importância ambiental por ser este um combustível cujo processo de combustão gera baixas emissões de poluentes e, levando-se em consideração a característica renovável das matérias-primas utilizadas para sua produção, não contribuindo para o desbalanceamento no ciclo do carbono. Adicionalmente, considerando-se que as matérias-primas podem ser geradas segundo as características de cada região, a implementação da produção de etanol permite a descentralização da produção e incentiva o desenvolvimento de áreas menos desenvolvidas.

No Brasil, segundo maior produtor mundial de etanol e detentor da tecnologia de produção de menor custo, utiliza-se o suco extraído da cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção do biocombustível. Este processo encontra-se acompanhado pela geração de grandes quantidades de material lignocelulósico, o bagaço, que pode ser empregado para a produção de etanol se desenvolvidos processos que permitam a extração integral dos açúcares constituintes, como proposto dentro do conceito de "Biorrefinaria". Com a implementação deste tipo de processo, além de se valorizar um material considerado como resíduo, estabelece-se que a produção de etanol no Brasil possa ser duplicada, sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo da cana-de-açúcar.

Sob esta panorâmica, faz-se evidente a importância do desenvolvimento de processos de produção de etanol a partir do bagaço de cana, que envolvam baixos custos e altas produtividades. É neste contexto que se realiza esta tese, visando estudar o aproveitamento eficiente de uma das frações do bagaço, a hemicelulose, para produção de etanol. Com isto, dá-se continuidade aos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ (BRITO, 2000; FOGEL, 2004; BETANCUR, 2005; VÁSQUEZ, 2007).

3.2 OBJETIVOS

A presente pesquisa de doutorado objetivou a otimização do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar visando à obtenção de um hidrolisado hemicelulósico que permita a produção eficiente de etanol de segunda geração por fermentação.

Para alcançar o objetivo descrito, foram formulados os objetivos específicos:

i. Caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar a ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento do trabalho quanto a sua composição química básica;

ii. Aperfeiçoar a técnica para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e determinar a possível influência do tamanho de partícula no processo hidrolítico;

iii. Aprimorar os processos de propagação celular para a realização de fermentações com hidrolisados hemicelulósicos;

iv. Investigar como as condições utilizadas no pré-tratamento com ácido diluído influenciam na eficiência de hidrólise da fração hemicelulósica do bagaço de cana;

v. Estabelecer as características dos hidrolisados produzidos, quanto ao teor de açúcares e compostos inibidores do processo fermentativo;

vi. Avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados e sua relação com as condições utilizadas no pré-tratamento com ácido diluído e a concentração de inibidores;

vii. Avaliar a reutilização de células na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para produção de etanol;

viii. Investigar a viabilidade da realização de co-fermentação de glicose e xilose provenientes das frações celulósica e hemicelulósica, respectivamente.

CAPÍTULO 4

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa, assim como as diferentes metodologias aplicadas nos experimentos realizados. São estabelecidas: as condições e metodologia para obtenção do hidrolisado, manipulação dos microrganismos utilizados, características dos processos avaliados, assim como a metodologia analítica empregada.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A caracterização do material lignocelulósico (bagaço de cana e sólido resultante do pré-tratamento ácido – celulignina) foi realizada seguindo os protocolos descritos por Ververis *et al.* (2007) e Sluiter *et al.* (2008). Na metodologia, os extrativos foram determinados pelo uso de sistema *Soxhlet*, utilizando um refluxo de água, seguido de refluxo de etanol durante 24 horas cada, com 6 ciclos por hora. Os extrativos foram determinados por gravimetria.

Para a quantificação das frações constituintes dos sólidos, uma massa de 200 a 300 mg de bagaço (livre de extrativos) foi hidrolisada com 3,0 mL de ácido sulfúrico (72% m/m) em um tratamento a 30ºC por uma hora. Posteriormente, o

ácido foi diluído até 4% e um novo tratamento foi aplicado (121ºC/1 hora) visando monomerizar totalmente os açúcares constituintes das frações polissacarídeas a serem quantificados na fração líquida após neutralização. A fração sólida (contendo lignina e cinzas) foi quantificada por gravimetria e, posteriormente, calcinada para quantificação de cinzas.

4.2 APRIMORAMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO PARA A OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado para o desenvolvimento desta pesquisa foi fornecido pela usina Costa Pinto de Piracicaba (SP) por intermédio da FERMENTEC. Inicialmente, o material foi submetido a secagem a 60ºC, com o objetivo de garantir uma estocagem sem perigo de contaminação com fungos. Cabe ressaltar que o processo de secagem é utilizado como uma etapa prática no trabalho de laboratório, não sendo uma etapa obrigatória para o aproveitamento do material lignocelulósico em nível piloto ou industrial.

O pré-tratamento ácido do bagaço inicialmente foi realizado com base nas condições reportadas por Betancur (2005), sendo mantidas as condições de pressão e tempo (1 atm/40 minutos), assim como a relação sólido:líquido (proporção de 1 g de bagaço:2 mL de solução ácida) e, apenas, modificada a concentração da solução de ácido sulfúrico de 3,5%(v/v) para 1%(v/v), visando diminuir a demanda de ácido no processo e, consequentemente, a quantidade de base utilizada para o ajuste de pH dos hidrolisados, assim como reduzir a geração de inibidores ao processo de fermentação dos açúcares monomerizados.

Três estratégias de mistura para a realização do pré-tratamento do material foram avaliadas:

- Estratégia (A): Sólido embebido em solução ácida seguido de remoção de excedente

Considerando-se a relação sólido:líquido (S:L) a ser utilizada no processo de hidrólise (1:2), utilizou-se um volume correspondente ao dobro da quantidade requerida (relação 1:4), verificando a total imersão do sólido na solução ácida. Após um minuto, metade do volume da solução ácido foi retirado, deixando a mistura na relação S:L desejada.

- Estratégia (B): Umidificação do sólido por dispersão da solução ácida

Neste caso, o bagaço seco foi aspergido com solução ácida, utilizando-se um “borrifador” manual. Realizou-se, cuidadosamente, o procedimento para garantir a maior homogeneidade possível na mistura sólido-líquido.

- Estratégia (C): Contato direto por 24 horas

Neste caso, o bagaço foi deixado imerso na solução ácida por um período de 24 h antes do tratamento térmico (BETANCUR, 2005; FOGEL, 2004), assumindo que este período era suficiente para a difusão homogênea do líquido na matriz sólida.

Para cada uma das estratégias, o tratamento térmico foi realizado em duplicata com frascos cônicos de 500 mL utilizando-se autoclave. Após a determinação da melhor estratégia, a obtenção de hidrolisados em quantidades maiores, necessárias nos experimentos subsequentes, foi realizada em um reator projetado para este propósito (Figura 4.1). Este equipamento permite, após o tratamento térmico da mistura sólido:líquido, a separação de fases por aplicação de pressão hidráulica com um alto grau de recuperação de líquidos (hidrolisado). Este equipamento foi construído em aço inox, tendo uma capacidade volumétrica de 3,5 L (Patente PI 0505299-8A).

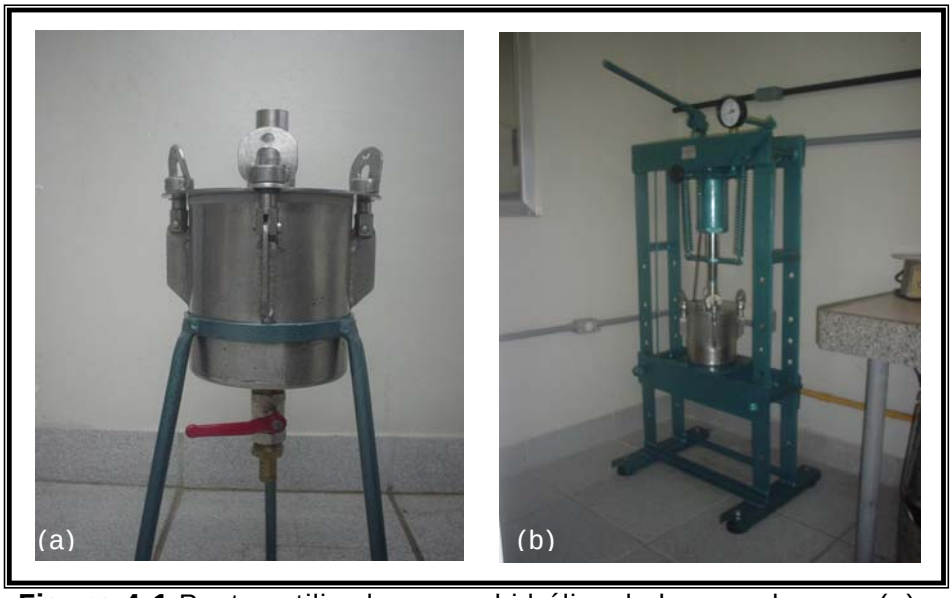


Figura 4.1 Reator utilizado para a hidrólise de bagaço de cana (a) e prensa hidráulica para extração do hidrolisado (b)

Após o processo térmico e a separação da matriz sólida, o hidrolisado teve seu pH ajustado até 6 mediante a adição de $Ca(OH)_2$, sob banho de água com gelo para evitar aquecimento da solução com o calor gerado durante a reação ácido-base. Após ajuste de pH, a suspensão foi filtrada a vácuo, para retirar o precipitado formado, e estocada para ser utilizada como base do meio de fermentação nos experimentos realizados na pesquisa.

Sendo o bagaço um material caracterizado por uma distribuição granulométrica diversa, e com o intuito de se avaliar a influência do tamanho de partícula no pré-tratamento ácido, foi realizada adicionalmente, uma classificação granulométrica utilizando peneiras com os tamanhos de partícula apresentados na Tabela 4.1, escolhidos segundo alguns processos de classificação realizados em trabalhos anteriores (BETANCUR, 2005; PEDRO *et al*., 2005).

Amostras de cada um dos grupos granulométricos selecionados (Tabela 4.1) foram submetidas ao pré-tratamento ácido seguindo os procedimentos descritos anteriormente, com experimentos realizados em duplicata.

Tabela 4.1 Peneiras de classificação utilizadas para determinar a distribuição granulométrica para o bagaço de cana

Número de peneira segundo classificação MeshTaylor	Tamanho de partícula (mm)
4	>4,75
8	4,75 - 2,36
14	2,36 - 1,18
28	1,18 - 0,60
Fundos	< 0,60

4.2.1 Otimização do pré-tratamento ácido sob condições moderadas

Com o objetivo de diminuir a concentração de ácido utilizada durante o pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar, um planejamento central composto com triplicata do ponto central foi realizado, considerando como variáveis independentes (fatores) a relação sólido:líquido, a concentração do ácido e o tempo, nos níveis apresentados na Tabela 4.2. A pressão (variável relacionada com a temperatura do tratamento térmico – 121°C) foi mantida

constante no valor de 1 atm por ser este o valor limite de trabalho do equipamento empregado para a realização do processo térmico.

Tabela 4.2 Variáveis e níveis do planejamento experimental

Fatores	- α	Nível inferior	Ponto Central	Nível superior	+ α
S:L (g:mL)	1:4,6	1:4	1:3	1:2	1:1,4
H_2SO_4 (% v/v)	0,50	0,75	1,13	1,50	1,75
Tempo (min)	27	40	60	80	93

Na Tabela 4.3 estão apresentados todos os ensaios correspondentes ao delineamento central composto completo, incluindo os pontos fatoriais (ensaios 1 a 8), os axiais ou estrela (ensaios 9 a 14) e as três repetições do ponto central (ensaios 15 a 17) necessárias para determinar o erro experimental e realizar uma análise estatística mais aprimorada.

Tabela 4.3 Planejamento central composto, em valores codificados, realizado para avaliar a hidrólise com ácido diluído da hemicelulose presente no bagaço

Ensaio	Concentração de Ácido	Rel. Sol:Liq	Tempo
1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1
3	-1	-1	-1
4	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1
6	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1
8	+1	-1	+1
9	-α	0	0
10	+α	0	0
11	0	+α	0
12	0	-α	0
13	0	0	-α
14	0	0	+α
15(c)	0	0	0
16(c)	0	0	0
17(c)	0	0	0

(c) réplicas do ponto central

Para todos os ensaios, utilizou-se uma massa inicial fixa de bagaço, sendo adicionada à solução ácida na proporção indicada para cada experimento. Como variável de resposta principal foi considerada a concentração de xilose, estando

esta característica diretamente relacionada com a obtenção de altas concentrações de etanol quando o hidrolisado fosse utilizado para fermentação. Adicionalmente, foram consideradas como variáveis de resposta a eficiência de hidrólise (calculada a partir da quantidade de xilose em relação ao teor de hemicelulose do bagaço) e a quantidade de hidróxido de sódio necessário para o ajuste de pH dos hidrolisados. Esta última variável de resposta foi considerada com intuito de se estimar as condições que permitissem diminuir a quantidade deste insumo e, adicionalmente, verificar como a presença de radicais acetato, provenientes da estrutura hemicelulósica, poderiam influenciar na acidez do hidrolisado.

Baseados na análise dos resultados do planejamento preliminar (Tabela 4.3), um novo planejamento foi desenhado e realizado, como apresentado no capítulo 5, considerando-se como variáveis de resposta, além da concentração de xilose no hidrolisado e a eficiência de hidrólise, a concentração de inibidores como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e compostos fenólicos, a fim de se aprimorar a otimização do pré-tratamento ácido visando a utilização dos hidrolisados para a produção de etanol.

Em cada um dos ensaios, desse segundo planejamento experimental, foi preparada uma quantidade de hidrolisado suficiente para se avaliar a sua fermentabilidade. Assim, foi realizada uma análise estatística considerando-se as concentrações finais de etanol e xilitol, assim como os rendimentos para cada um desses produtos e a relação etanol/xilitol.

Adicionalmente, procurou-se determinar a relação entre a severidade global do pré-tratamento ácido e cada uma das varáveis já enunciadas. Para isto, utilizou-se a expressão definida por Schell *et. al*. (2003) apresentada na equação 4.1.

$$Grau\ de\ severidade = \mathrm{Log}_{10}\left(tempo.\exp\left[\frac{Temperatura - 100}{14{,}75} \right] \right) - pH \qquad \textbf{Equação 4.1}$$

4.3 MICRORGANISMOS

Em todos os ensaios relacionados à fermentação de xilose, assim como em alguns realizados com glicose como fonte carbono, utilizou-se a linhagem floculante da levedura *Pichia stipitis* CBS5774, proveniente do banco de

linhagens holandês “Central Bureau voor Schimmelcultures-CBS”. Esta levedura foi previamente selecionada como o microrganismo mais adequado para conversão de D-xilose a etanol (PEREIRA Jr., 1991). Na Figura 4.2 é apresentada uma microfotografia das células mencionadas, onde se pode verificar claramente a formação de agregados, devido à sua característica floculante.

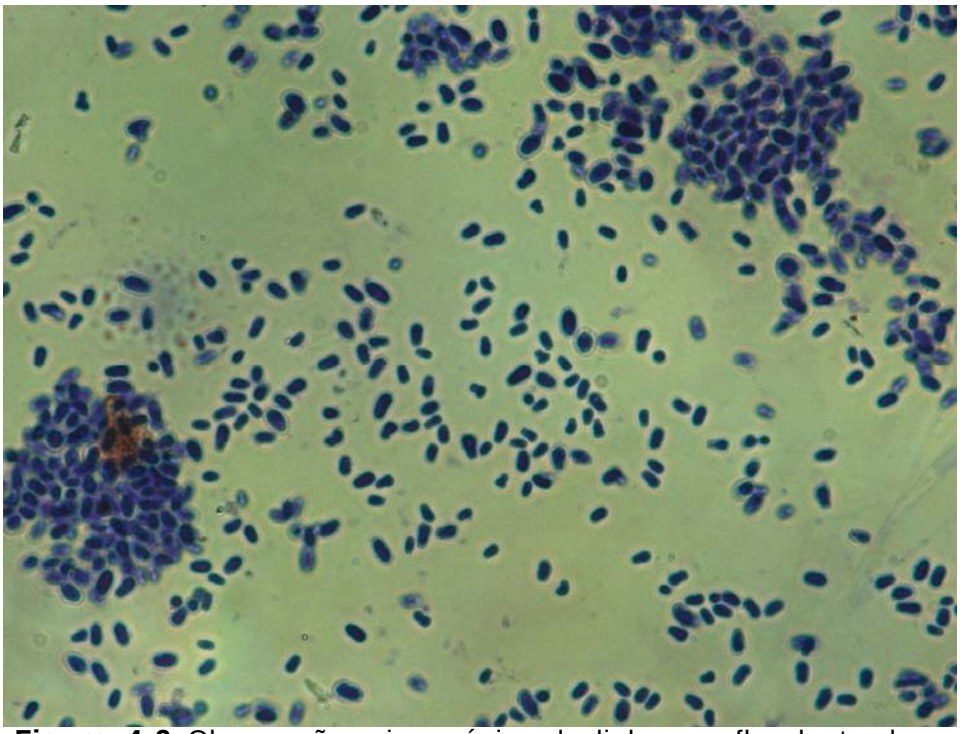


Figura 4.2 Observação microscópica da linhagem floculante de *Pichia stipitis* CBS 5774 (aumento de 1000 vezes)

Quando testada a fermentabilidade de meios ricos em glicose, com e sem suplementação de hidrolisado hemicelulósico, foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann) como microrganismo padrão de comparação.

4.3.1 Manutenção do microrganismo

A manutenção das células de *P. stipitis* foi realizada como recomendado por Pereira Jr. (1991). A cultura estoque foi conservada em meio agarizado, cuja composição está descrita na Tabela 4.4, deixando-se incubar durante três dias a uma temperatura controlada de 30°C para, posteriormente, ser estocada a 5°C. Com o intuito de manter células ativas para a realização dos diferentes experimentos, repiques, a partir do cultivo original, foram realizados a cada

quinze dias em câmara asséptica, sendo descartados aqueles com mais de um mês. Para cada repique o estado de pureza foi verificado segundo a técnica de GRAM.

Tabela 4.4 Meio de manutenção

Componente	Concentração (g/L)
D-xilose	5,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	2,0
Ágar-ágar	30,0

(PEREIRA Jr., 1991)

4.4 MEIOS EMPREGADOS PARA ATIVAÇÃO, PROPAGAÇÃO E FERMENTAÇÃO

Considerando-se as características do inóculo como uma variável altamente influente na eficiência do processo de fermentação, diferentes estratégias de propagação foram empregadas para a obtenção das células utilizadas como inóculo. Os meios formulados para este propósito e para a fermentação dos hidrolisados, são descritos na sequência.

4.4.1 Meio de ativação

O meio utilizado para a ativação das células (primeira etapa da propagação) foi o mesmo empregado por Pereira Jr. (1991) e sua composição está apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Composição do meio utilizado para ativação das células

Componente	Concentração
D-xilose	20,0 g/L
Uréia	1,25 g/L
KH_2PO_4	1,1 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
Solução de sais minerais e ácido cítrico	40,0 mL/L

(PEREIRA Jr., 1991)

A solução de sais minerais e ácido cítrico, referida na Tabela 4.5, é uma solução concentrada de oligoelementos utilizada para suplementar todos os meios (ativação, propagação e fermentação). A composição dessa solução pode ser observada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico

Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
$MgSO_4.7H_2O$	12,5	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$CaCl_2.2H_2O$	1,25	$CoCl_2.6H_2O$	0,025
Ácido cítrico	12,5	$NaMoO_4.2H_2O$	0,035
$FeSO_4.7H_2O$	0,9	H_3BO_3	0,050
$MnSO_4$	0,19	KI	0,009
$ZnSO_4.7H_2O$	0,30	$Al_2(SO_4)_3$	0,0125

(PEREIRA Jr., 1991)

A fim de se evitar reações indesejadas entre a xilose e outros componentes do meio, foram preparadas e esterilizadas (0,5 atm/20 min), separadamente, uma solução contendo a pentose e outra com os demais componentes, de modo que a primeira solução representasse 25% do volume total. Para cada solução, o pH foi ajustado próximo de 6,0 utilizando-se solução de NaOH (2 mol/L) ou HCl (2 mol/L), conforme necessário.

4.4.2 Meios para propagação celular

O processo de propagação celular, para obtenção do inóculo, foi realizado utilizando duas ou três etapas, para cada uma das quais se utilizaram meios diferenciados, como descritos na sequência.

Quando utilizadas três etapas, após o cultivo de ativação, as células foram propagadas em meio contendo a mesma proporção de oligoelementos e nutrientes descritos na Tabela 4.5. Porém, a solução de xilose foi substituída por hidrolisado, esterilizado durante 10 minutos a 0,5 atm, numa proporção de 25% do volume total na segunda etapa e 50% na terceira (BETANCUR, 2005). Quando utilizadas duas etapas o uso de cultivo de ativação foi eliminado como descrito no item 4.5.

4.4.3 Meios de fermentação

Quando avaliado o comportamento da levedura *P. stipitis* durante fermentação em meio sintético, foi mantida a composição de meio descrita para o cultivo de ativação (Tabela 4.5), mudando-se apenas a concentração de xilose ou glicose, segundo os valores estabelecidos para cada experimento.

Nas fermentações utilizando hidrolisado, foram mantidas as proporções de oligoelementos e fontes de nitrogênio descritas na Tabela 4.5. Nesse sentido, misturaram-se as fontes de nitrogênio e de fosfato ao volume de solução de sais a ser adicionado, sendo a mistura esterilizada por filtração em membrana com porosidade de 0,22 μm. O hidrolisado foi esterilizado, separadamente, como descrito anteriormente (0,5 atm/10 min) ou utilizado diretamente para o processo de fermentação.

Para ensaios de propagação celular de *Pichia stipitis*, visando a co-fermentação de xilose e glicose, assim como as fermentações em meio sintético com ambos dos substratos, o meio sintético descrito na Tabela 4.5 foi corrigido para manter uma concentração inicial do carboidrato utilizado em 20 g/L.

4.5 METODOLOGIAS DE PROPAGAÇÃO CELULAR

Com o objetivo de se aprimorar a metodologia de propagação celular, para a obtenção do inóculo utilizado na fermentação alcoólica de xilose, foram avaliadas duas técnicas verificando-se a necessidade da etapa de ativação realizada com xilose comercial. Desta forma, as células foram inicialmente, ativadas em meio sintético ou incubadas diretamente na primeira etapa de aclimatação, como descrito a seguir: do repique em meio de manutenção foi retirada uma alçada de células para um frasco cônico de 500 mL contendo 200 mL de meio de ativação, ou meio para a primeira aclimatação, e posteriormente incubado a 30°C em agitador rotatório utilizando uma velocidade de agitação de 250 rpm, pelo tempo necessário para que se alcançasse a concentração celular desejada (3 g/L). Posteriormente, para ambos os casos, uma alíquota de 10 mL foi utilizada como inóculo para a etapa seguinte, como esquematizado na Figura 4.3.

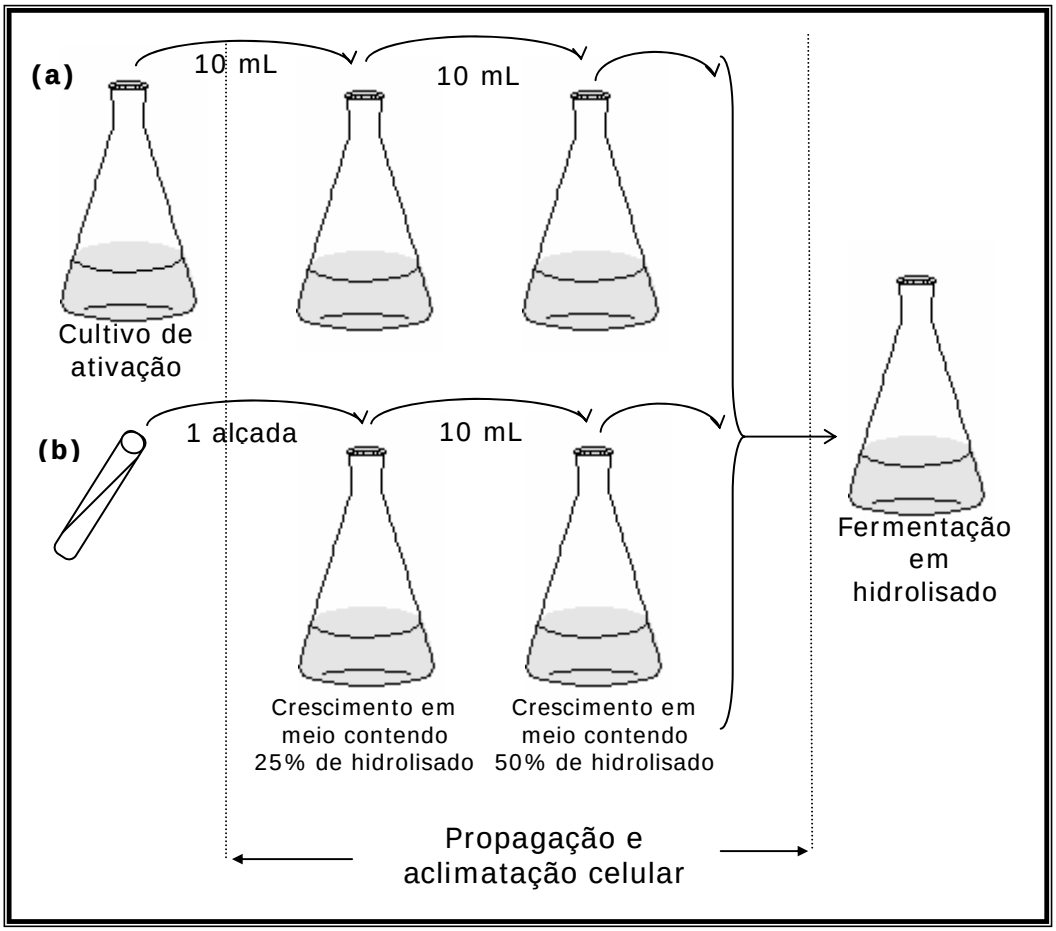


Figura 4.3 Esquema representativo das metodologias utilizadas para propagação celular. (a) propagação com cultivo de ativação; (b) propagação sem cultivo de ativação

Cada uma das etapas utilizadas para a propagação celular foi conduzida seguindo as condições descritas anteriormente. Quando finalizada a segunda etapa de aclimatação, realizada em um número de frascos que garantisse a obtenção do inóculo para fermentação, o volume total foi reunido ao final do processo e centrifugado (3000 rpm/10 min) para separar a massa celular a ser utilizada como inóculo nos ensaios de fermentação. As células centrifugadas foram, posteriormente, re-suspensas no meio de fermentação assepticamente.

4.6 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO

4.6.1 Experimentos em frascos cônicos

Nos experimentos em frascos cônicos (500 mL) foi utilizado um volume de trabalho de 200 mL e condições de incubação de 30°C, 250 rpm e um pH inicial

6,0 (BETANCUR, 2005). Estas condições de operação foram utilizadas para os experimentos realizados em meio sintético, assim como para os ensaios de fermentabilidade dos hidrolisados obtidos nas condições do planejamento apresentadas na seção 4.1.

Para determinar uma estratégia apropriada para a propagação da levedura *P. stipitis*, visando à fermentação de meios contendo glicose e xilose, foram avaliados diferentes meios sintéticos contendo glicose, xilose ou a mistura de ambos substratos (em uma concentração inicial de 20 g/L), com incubação sob condições de livre e limitada transferência de oxigênio. Para todos os experimentos, as condições de volume do meio, temperatura, pH inicial e agitação foram as mesmas reportadas anteriormente. A condição de transferência limitada de oxigênio foi aplicada utilizando fermentômetros, enquanto a livre transferência de oxigênio foi realizada com o uso de rolhas de espuma (poliuretano).

4.6.2 Fermentações em biorreator instrumentado

Para a realização dos ensaios de fermentação, sob condições controladas, foi utilizado o biorreator BIOSTAT B fabricado pela B. Braun Biotech International, com um volume nominal de 1,5 litros e um volume de trabalho de 0,8 litros (Figura 4.4), dotado de controle de temperatura, pH (eletrodo interno de referência de prata/cloreto de prata, METLER TOLEDO), porcentagem de oxigênio dissolvido (eletrodo polarográfico prata/platina, INGOLD) e espuma (sensor de condutividade com terminação metálica). Todos os sensores foram conectados a uma interface para o controle proporcional-integral-derivativo (PID) utilizando as configurações de sintonia recomendadas pelo fabricante. O reator possui sistema de agitação mecânica que consta de 2 turbinas de 3,5 cm de diâmetro, com 6 pás em cada e o vaso reacional comporta quatro chicanas. O ar, devidamente esterilizado por membranas de 0,2 μm (MILLIPORE), é fornecido ao meio através de um dispersor de metal, localizado na parte inferior do biorreator. A vazão de ar foi monitorada por um medidor de vazão volumétrica acoplado ao biorreator.

Todas as fermentações em biorreator foram realizadas a uma temperatura de 30ºC, agitação de 250 rpm, taxa específica de aeração de 0,02 vvm e controle de pH 6,0, mediante a adição de NaOH (2 mol/L) ou HCl (2 mol/L). Na maioria

dos casos, a concentração celular inicial utilizada foi próxima de 10 g/L (BETANCUR, 2005).

Figura 4.4 Biorreator BIOSTAT B para fermentação de hidrolisado, com capacidade para 1,5 L

As características particulares das fermentações desenvolvidas para a realização deste trabalho foram:

- Fermentações com hidrolisado obtido em condições brandas não otimizadas. Neste caso o hidrolisado foi obtido segundo as condições térmicas e relação sólido:líquido estabelecidas por Betancur (2005), com uma concentração de ácido de 1% ácido, sendo avaliados dois tamanhos de inóculo (4 g/L e 10 g/L);
- Fermentação conduzida nas condições normais (30ºC, 250 rpm, pH 6, 0,02 vvm), e com hidrolisado obtido como citado anteriormente, realizada para validar as modificações na obtenção de inóculo como descrito no item 4.4;

- Para a validação de condições otimizadas de pré-tratamento ácido, como descrito no item 4.1.1, foi realizada uma fermentação em condições normais (30ºC, 250 rpm, pH 6, 0,02 vvm) com o hidrolisado obtido;
- Como complemento à validação da fermentabilidade de hidrolisado obtido em condições otimizadas, foram realizadas fermentações sequênciais para determinar a viabilidade da reutilização das células, sem qualquer processo de reativação da levedura. Entre cada fermentação, as células foram separadas por centrifugação (3000 rpm) e re-suspensas em meio para fermentação direta;
- Fermentações sequênciais aplicando a técnica de Melle-Boinot (KAVANAGH & WHITTAKER, 1994; STANBUK *et al.*, 2008) foram realizadas para determinar a eficiência desta técnica, tradicionalmente utilizada para *S. cerevisiae*, quando o agente de fermentação fosse a levedura *P. stipitis*. Neste caso, antes de cada fermentação, as células foram tratadas com uma solução de ácido sulfúrico diluído (pH de 2) durante 1 hora e, posteriormente, recuperadas por centrifugação para dar início ao processo;
- A tolerância da levedura *P. stipitis* ao etanol produzido foi avaliada, inicialmente, com duas fermentações conduzidas em batelada simples com meio sintético, utilizando uma concentração inicial de células de 5 g/L e de substrato de 150 g/L. Em uma das fermentações utilizou-se glicose como substrato e na outra xilose;
- Mais duas fermentações em meio sintético, uma com glicose e outra com xilose como substrato, foram realizadas em batelada alimentada por pulsos. Em cada pulso, realizado assim que o carboidrato era esgotado, procurou-se atingir uma concentração de substrato de 30 g/L, mantendo o processo até observação da estabilização das variáveis (concentração de substrato ou produto);
- Visando eliminar qualquer possível inibição da levedura nos processos descritos anteriormente, uma fermentação em batelada alimentada continuamente foi realizada, numa vazão que não gerasse uma concentração acima de 5 g/L de xilose até a estabilização da concentração de etanol no meio.

4.6.3 Processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

Para os ensaios realizados aplicando o processo SSF foram utilizados fermentômetros de 500 mL com um volume de trabalho variado, dependendo do objetivo do experimento, sob as condições propostas por Vasquez (2007). Estas condições estabeleceram o emprego do formulado enzimático Multifect CX (Genencor Int.) com uma carga enzimática de 26 FPU (filter paper units)/g de sólido. Os experimentos foram em tampão citrato (pH 4,8) e iniciados com uma pré-hidrólise enzimática, a uma temperatura de 47ºC, durante um período de tempo entre 8 e 12 horas. Após este tempo, o sistema era ajustado a 37ºC e a levedura *S. cerevisiae* adicionada ao sistema, dando-se, assim, andamento ao processo SSF.

Quando utilizada a levedura *P. stipitis* no processo SSF, após a pré-hidrólise enzimática, a temperatura do processo foi ajustada em 30ºC e não foram utilizados os fermentômetros, para assim favorecer a ação deste microrganismo.

Para determinar o efeito dos nutrientes utilizados para suplementar o hidrolisado hemicelulósico sob o processo SSF, assim como do próprio hidrolisado, três variáveis independentes foram definidas: fontes de nitrogênio (uréia + extrato de levedura), oligoelementos (KH_2PO_4 + solução de sais e ácido cítrico) e hidrolisado. Como nível inferior foi definido a ausência dos componentes e, como nível superior a concentração do nutriente comumente empregada para suplementar os hidrolisados hemicelulósicos para sua fermentação, como apresentado na Tabela 4.7. Deve-se destacar que, para se completar o diluente, nos casos em que indicado hidrolisado em 0% e 50%, foi utilizado tampão citrato.

Na Tabela 4.8 é apresentado o planejamento fatorial completo, em valores codificados, dos experimentos realizados. A produção de etanol foi acompanhada por pesagem de cada um dos experimentos, realizados em um sistema denominado fermentômetro, para determinar a redução de peso causada pela liberação de CO_2, característica da fermentação alcoólica. A concentração de etanol equivalente foi determinada a partir da relação estequiométrica entre o CO_2 liberado e o etanol produzido (1:1 molar) na fermentação de glicose.

Tabela 4.7 Variáveis e níveis escolhidos para determinar o efeito dos componentes da fermentação de hidrolisado hemicelulósico no processo SSF

Fatores	Nível superior (+1)	Ponto Central (0)	Nível inferior (-1)
Hidrolisado (%)	100	50	0
Fontes de Nitrogênio			
Uréia (g/L)	1,25	0,62	0
Extrato de levedura (g/L)	2,00	1,00	0
Oligoelementos			
KH_2PO_4 (g/L)	1,1	0,55	0
Solução sais e Ác cit. (mL/L)	40	20	0

Tabela 4.8 Planejamento experimental desenvolvido para determinar o efeito dos componentes da fermentação do hidrolisado hemicelulósico no processo SSF

Ensaio	Hidrolisado	Fontes de N.	Oligoelem.
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

O efeito do hidrolisado hemicelulósico fermentado sob o desempenho da levedura *S. cerevisiae* no processo SSF foi avaliado sob as condições descritas anteriormente. Para esta finalidade, utilizaram-se proporções de hidrolisado fermentado de 0%, 30%, 70% e 100% em tampão citrato, como fase líquida. Estes experimentos foram realizados em duplicata.

4.7 AMOSTRAGEM

Nos experimentos realizados utilizando-se *P. stipitis* para fermentar a xilose contida em hidrolisado, foram retiradas alíquotas de 2 mL a 3 mL com auxílio de pipetas. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, sendo o sobrenadante destinado à quantificação de açúcares e

produtos, após filtração em membrana de celulose com uma porosidade de 0,22 μm. O sedimentado foi lavado duas vezes com água destilada e novamente centrifugado, nas mesmas condições descritas anteriormente, para promover a desfloculação das células e retirar qualquer componente do meio que interferisse na quantificação de massa celular. Em todos os procedimentos de amostragem foi observado o máximo rigor asséptico. Na Figura 4.5 encontra-se esquematizada a metodologia utilizada para o processamento das amostras.

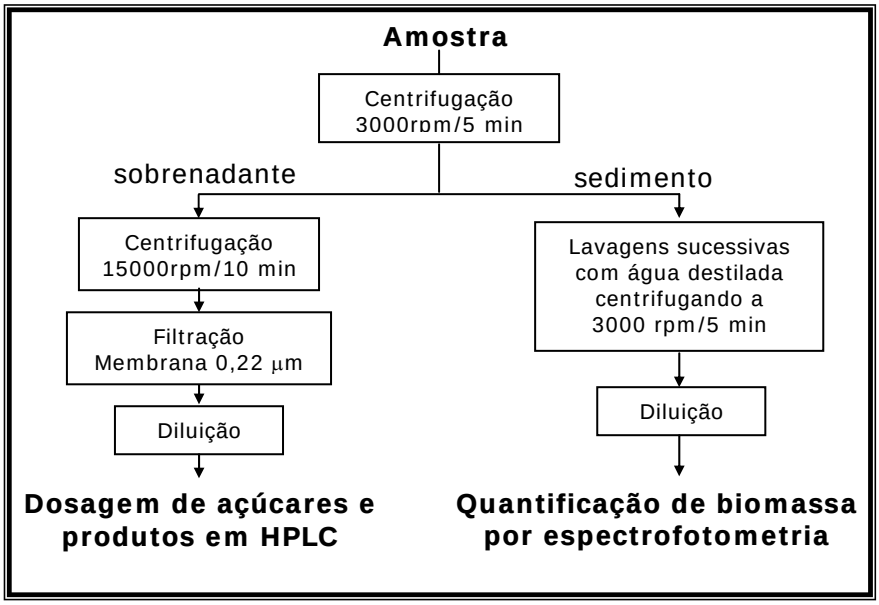


Figura 4.5 Diagrama para o processamento das amostras.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.8.1 Determinação da massa celular

A quantificação celular foi realizada por correlação de massa seca e absorvância a 570 nm para *P. stipitis* (LEAL, 1998). Para tal, foi construída, previamente, uma curva padrão relacionando a massa seca das células com a absorvância (Figura 4.6). As células utilizadas na construção da curva padrão foram cultivadas em frascos cônicos de 500 mL contendo 200 mL de meio de ativação, a 30°C em agitador rotatório a 250 rpm. Após 48 horas de incubação, as células foram colhidas, lavadas e ressuspensas em água destilada, de modo a se obter uma suspensão concentrada. A determinação da concentração das células foi realizada filtrando-se 20 mL da suspensão, em triplicata, utilizando-se membranas de éster de celulose com 0,22 μm de porosidade. Posteriormente, as

membranas foram submetidas a secagem durante 24 horas, a uma temperatura de 80ºC e, mantendo-se as condições de secagem, acompanhou-se a massa das membranas até se obter um valor constante.

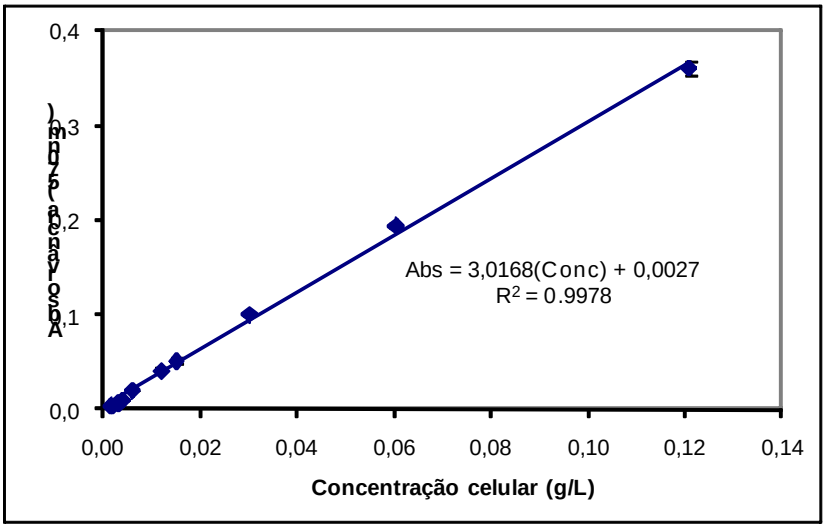


Figura 4.6 Curva de calibração para quantificação de massa celular

4.8.2 Determinações quantitativas

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, etanol e xilitol, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo 'Waters' (Sistema de bombeamento modelo 510, injetor Rheodyne, detector de diferencial de índice de refração –DIR- modelo 410), acoplado a uma coluna de troca catiônica Aminex HPX-87P, fabricada pela Bio-Rad. As condições operacionais utilizadas para as análises encontram-se especificadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Condições operacionais do cromatógrafo para quantificação de açúcares e metabólitos principais

Fase móvel:	Água MilliQ desgaseificada
Vazão de fase móvel:	0,6 mL/min
Pressão máxima:	2000 psi
Volume de amostra:	5 μL (amostra)
$T_{externa}$:	85ºC (forno)
$T_{interna}$:	40ºC (detector)

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas por comparação com padrões externos de concentração conhecida (10 g/L para açúcares e xilitol, 15 g/L para etanol), com áreas cromatográficas calculadas pelo próprio equipamento. A equação 4.2 foi utilizada para o cálculo das concentrações das amostras. Um cromatograma típico para o padrão externo pode ser observado na Figura 4.7.

$$\text{Concentração da amostra} = \frac{\text{Área da amostra} \cdot \text{concentração do padrão}}{\text{Área do padrão}} \cdot \text{diluição}$$

Equação 4.2

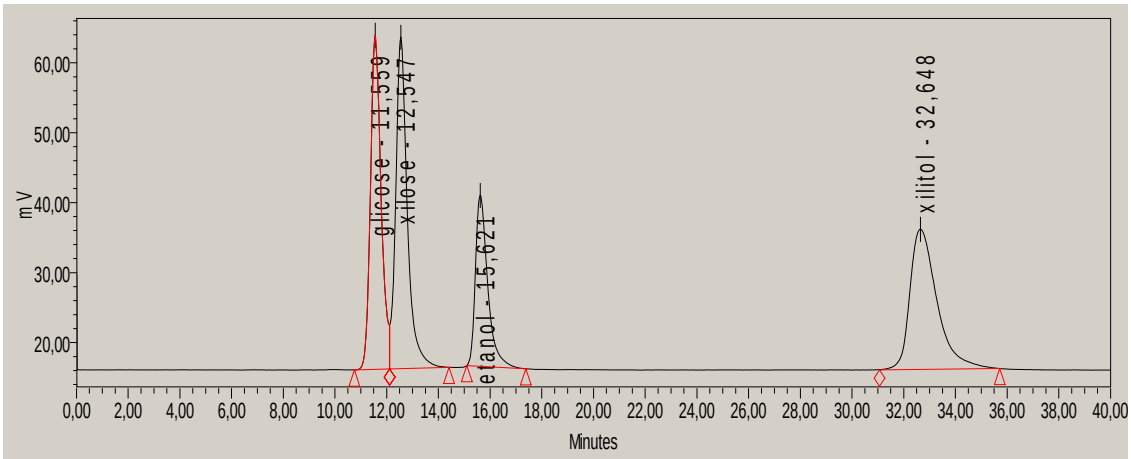


Figura 4.7 Cromatograma da solução padrão indicando os tempos de retenção dos compostos mais relevantes na fermentação de hidrolisado hemicelulósico.

No caso da quantificação de furfural e hidroximetilfurfural, assim como alguns ácidos alifáticos, foi seguida uma metodologia análoga à descrita anteriormente. Porém, dadas as características destes compostos, foi utilizada uma coluna C18 da Shodex nas condições indicadas na Tabela 4.10, acoplada a detector UV (*Ultraviolet*).

A concentração de compostos fenólicos nos hidrolisados foi quantificada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (QUEIROZ *et al.*, 2002), utilizando-se ácido tânico como padrão para a construção de curva de calibração (Figura 4.8).

Tabela 4.10 Condições operacionais do cromatógrafo para quantificar furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético

Fase móvel:	Metanol:água (80/20)
Vazão de fase móvel:	1,0 mL/min
Pressão máxima:	2000 psi
Volume de "looping":	20 μL (amostra)
Cumprimento de onda	285 nm

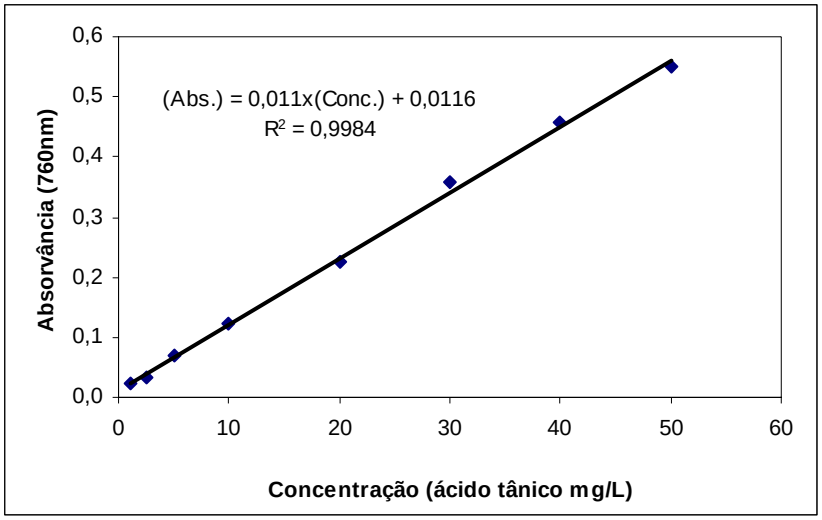


Figura 4.8 Curva de calibração para quantificação de compostos fenólicos

4.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Como recurso para a realização dos ensaios utilizou-se planejamentos experimentais, mais especificamente a metodologia de superfície de resposta (RSM), baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por G.E.P. Box (BARROS NETO *et al*., 1995) nos anos um mil novecentos e cinquenta e, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO *et al*., 1995; MONTGOMERY, 2001).

A metodologia de superfície de resposta é constituída por duas etapas, modelagem e deslocamento, as quais são repetidas quantas vezes forem necessárias, até alcançar uma região desejada da superfície investigada. A modelagem é feita normalmente, ajustando modelos lineares ou quadráticos às respostas experimentais obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos

fatoriais ampliados. No caso do estudo das condições de pré-tratamento, o modelo pode ser estruturado como indicado na Equação 4.3.

$$\begin{aligned} \textit{Variável de Resposta} = \; & \beta_0 + \beta_1(\text{Concentração de ácido}) + \beta_{11}(\text{Concentração de ácido})^2 \\ & + \beta_2(\text{Relação sólido:líquido}) + \beta_{22}(\text{Relação sólido:líquido})^2 \\ & + \beta_3(\text{Tempo}) + \beta_{33}(\text{Tempo})^2 \\ & + \beta_{12}(\text{Concentração de ácido})(\text{Relação sólido:líquido}) \\ & + \beta_{13}(\text{Concentração de ácido})(\text{Tempo}) \\ & + \beta_{23}(\text{Relação sólido:líquido})(\text{Tempo}) \end{aligned}$$

β : Coeficientes determinados empiricamente

Equação 4.3

Depois de ter encontrado a área apropriada há de se validar a necessidade de utilização de um modelo quadrático para descrever o comportamento dos resultados encontrados com o planejamento experimental. Para isto, é necessária a construção do planejamento chamado “Planejamento em Estrela”. Este planejamento consiste em acrescentar ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém, girado 45 graus em relação à orientação de partida. (BARROS NETO *et al*. 2001).

Para estimar matematicamente o ponto ótimo de um fenômeno, no qual foram definidas diversas variáveis de resposta, é utilizada a função *desirability* (Equação 4.4) proposta por Derringer & Suich (1980). No caso do pré-tratamento ácido, esta função foi utilizada para determinar as condições que permitiram maximizar a concentração de substrato e minimizar a concentração de inibidores no hidrolisado, assim como alcançar uma alta fermentabilidade do mesmo.

$$D = (d_1(Y_1) \times d_2(Y_2) \times \ldots \times d_k(Y_k))^{1/K}$$

Equação 4.4

D: Parâmetro a ser maximizado
Y_i: Variável de resposta
$d_i\,(Yi)$:Função individual para cada uma das variáveis
k: Número de variáveis de resposta

As funções individuais (di) para cada variável obedecem ao objetivo alvo de cada uma, maximizar ou minimizar, como expressado nas Equações 4.5 e 4.6. Nestas expressões um peso (s) com um valor superior à unidade (1), deve ser dado à função individual que represente uma variável na qual desejasse dar uma ênfase maior, em caso contrario (s<1) a importância será menor com

respeito às outras funções individuais. Neste trabalho todos os pesos foram considerados iguais à unidade (1), conferindo uma importância igual para todas as variáveis de resposta.

Maximizar:

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\dfrac{y - L}{T - L}\right)^s & L \le y \le T \\ 1 & y > T \end{cases}$$ **Equação 4.5**

L: Menor valor aceitável
T: Maior valor aceitável (valor alvo)
S:Peso

Minimizar:

$$d = \begin{cases} 1 & y < T \\ \left(\dfrac{y - L}{T - L}\right)^s & T \le y \le U \\ 0 & y > U \end{cases}$$ **Equação 4.6**

T: Menor valor aceitável (valor alvo)
U: Maior valor aceitável
S:Peso

No presente trabalho foram utilizados os software STATISTICA 6.0 (STATSOFT Inc., 2002) e Design-Expert 6.0.6 (Stat-Ease ® Software, 2000) para o desenho dos diferentes planejamentos experimentais, a análise estatística de resultados, a obtenção e validação de modelos empíricos, assim como para a etapa de otimização das condições do pré-tratamento ácido utilizando a função *desirability*.

4.10 VARIÁVEIS DE RESPOSTA

Os parâmetros utilizados para avaliar o pré-tratamento ácido ou os processos de fermentação que foram considerados como variáveis de resposta, em alguns dos experimentos, encontram-se definidos na sequência.

a) Eficiência de hidrólise de hemicelulose (%)

$$\text{Eficiência de hidrólise} = (S_x . V)/(M . X_x).100$$ **Equação 4.7**

Tal que:

S_x: Concentração de xilose no hidrolisado (g/L)

V: Volume de hidrolisado obtido (L)

M: Massa de bagaço hidrolisada (g)

X_x: fração de xilose no bagaço (g/g)

b) Fator de rendimento em etanol (g/g)

$$Y_{P/S} = -(\Delta P/\Delta S) = (P - P_o)/(S_o - S)$$ **Equação 4.8**

Tal que:

P: Concentração final de etanol (g/L)

P_o: Concentração inicial de etanol (g/L)

S: Concentração final de substrato (g/L)

S_o: Concentração inicial de substrato (g/L)

c) fator de rendimento em massa celular (g/g)

$$Y_{X/S} = -(\Delta X/\Delta S) = (X - X_o)/(S_o - S)$$ **Equação 4.9**

Tal que:

X: Concentração final de biomassa (g/L)

X_o: Concentração inicial de biomassa (g/L)

S: Concentração final de substrato (g/L)

S_o: Concentração inicial de substrato (g/L)

d) Produtividade volumétrica (g/L.h)

$$Q_P = (P - P_o)/t_f$$ **Equação 4.10**

Tal que:

P: Concentração final de etanol (g/L)

P_o: Concentração inicial de etanol (g/L)

t_f: Tempo de fermentação (h)

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões decorrentes da realização deste trabalho. Inicialmente é ilustrado o aprimoramento do pré-tratamento ácido de bagaço, direcionado ao modo de mistura e ao tamanho de partícula. Posteriormente são determinadas as condições que otimizam o pré-tratamento utilizando como critérios de otimização: maximização da concentração de xilose e eficiência de hidrólise, minimização da concentração de inibidores e, durante a fermentação do hidrolisado, a maximização da relação etano/xilitol e a minimização do acúmulo de xilitol. Na sequência são apresentados ensaios relacionados com o uso de hidrolisado obtido sob condições ótimas em fermentações sequênciais e processos SSF e SSCF. Adicionalmente, apresentam-se experimentos que permitiram verificar o potencial da levedura *Pichia stipitis* para produção de etanol em meio sintético e para a fermentação de diferentes misturas glicose-xilose.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Na Tabela 5.1 apresenta-se a composição do bagaço de cana-de-açúcar, segundo a metodologia aplicada para caracterização do material. Destaca-se o teor de hemicelulose que se encontra abaixo do reportado para este material (28-30%) (SUN & CHENG, 2002). Porém, deve-se considerar que a metodologia utilizada determina apenas o teor de carboidratos para cada fração, sendo desprezado o aporte de radicais ácidos comumente encontrados nesta estrutura (SUN & TOMKINSON, 2003). Contudo, o teor quantificado desta pentose, como único constituinte de hemicelulose, é consistente com o teor em xilose reportado por Lee (1997) (23,3%) e Gámez *et al.* (2006) (20,6%).

Tabela 5.1 Composição básica do bagaço de cana-de-açúcar

Fração	Teor (%) ± DP
Celulose	38,74 ± 0,98
Hemicelulose	22,98 ± 1,83
Lignina	22,77 ± 0,23
Cinzas	1,13 ± 0,19
Extrativos	4,06 ± 0,83

DP: desvio padrão.
Porcentagens reportadas em massa seca de material

Considerando-se como base de calculo uma tonelada de bagaço, contendo 387,4 Kg de celulose e 229,8 Kg de hemicelulose, pode-se estimar a disponibilização de 678,9Kg de açúcares totais, se alcançada uma hidrólise com 100% eficiência (fator de hidrólise de 1,1). Estes açúcares têm um potencial estequiométrico de produção de etanol de 344,2 Kg (436 L), sendo 37% correspondente ao aproveitamento da fração hemicelulósica.

5.2 APRIMORAMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO PARA A HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

5.2.1 Metodologias para a mistura de fases

A metodologia desenvolvida em trabalhos anteriores (FOGEL *et al.*, 2005; BETANCUR, 2005) para a realização do pré-tratamento ácido, visando à obtenção de altas concentrações de xilose no hidrolisado, considerava um tempo de

repouso de 24 horas da mistura sólido e solução ácida. Esta etapa mostrou-se contraposta à necessidade de se estabelecer uma técnica rápida e eficiente que permitisse desdobramentos industriais.

Para superar a referida problemática, duas novas estratégias para misturar o bagaço e a solução ácida foram idealizadas e avaliadas, considerando-se a homogeneidade da mistura e a redução do tempo total do processo. Na Figura 5.1 podem ser observados os resultados obtidos, representados como gráfico de barras, para cada uma das metodologias de mistura aplicadas como etapa preliminar ao tratamento térmico proposto para o pré-tratamento ácido do bagaço de cana.

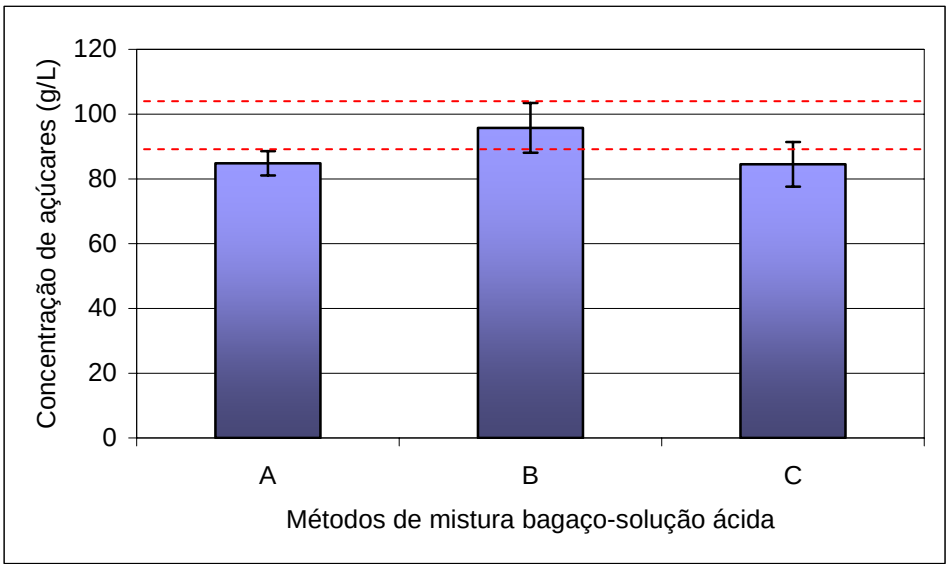


Figura 5.1 Concentração final de açúcares após pré-tratamento ácido (1atm/40 minutos com uma relação de 1 g de bagaço:2 mL de solução H_2SO_4 1% v/v) aplicando diferentes metodologias de mistura bagaço-solução ácida
(A) Embebido em solução ácida seguido de remoção de excedente;
(B) Sólido aspergido com solução ácida;
(C) Contato direto por 24 horas.

A estratégia denominada como B (sólido aspergido com solução ácida) permitiu obter a maior concentração de açúcares fermentáveis (glicose e xilose) no hidrolisado (Figura 5.1), correspondendo a 95,8 g/L, com um intervalo de confiança de ± 7,6 g/L. Porém, este valor médio não se mostrou marcadamente superior aos obtidos com as outras metodologias, ao se considerar o desvio padrão de cada um dos experimentos.

Embora as concentrações de açúcares para as metodologias avaliadas estejam próximas, considerando-se o tempo de cada um dos processos, foi possível substituir a metodologia utilizada até o momento (bagaço em contato com a solução ácida durante 24 horas) por qualquer uma das outras metodologias avaliadas. Desta forma, a impregnação do bagaço com a solução ácida, além de permitir a obtenção de uma concentração de açúcares ligeiramente superior no hidrolisado, apresentou-se como a estratégia mais apropriada quando considerada aplicação industrial, ao serem necessárias menos etapas para se obter a mistura desejada, sem comprometer a concentração de açúcares.

Em resumo, a impregnação do bagaço com a solução ácida (aspergido) permitiu uma redução no tempo necessário para a obtenção do hidrolisado, de mais de 26 horas (incluindo o tratamento térmico e extração) para menos de 4 horas, resultando em uma concentração de açúcares fermentáveis no hidrolisado ligeiramente superior. Considerando-se estes resultados, para a realização dos experimentos posteriores, foi adotada a estratégia de dispersar por aspersão para se obter a mistura bagaço - solução ácida.

5.2.2 Tamanho de partícula

Sendo o bagaço proveniente de moendas das usinas um material caracterizado pela sua variada distribuição granulométrica, foi realizada uma análise que permitisse quantificar esta distribuição e determinar a possível influência do tamanho do material particulado sobre a eficiência do pré-tratamento ácido do material.

Na Figura 5.2 observa-se a marcada presença de partículas menores de 0,6 mm no material proveniente das moendas, correspondendo a 38% da massa total. As frações restantes do material distribuem-se de forma mais proporcional, sendo somente 7,5% partículas maiores que 4,75 mm. Cabe destacar que 63% do material apresentou um tamanho de partícula menor que 1,18 mm.

Quando hidrolisada cada uma das frações separadamente, segundo a distribuição granulométrica, os hidrolisados obtidos apresentaram diferentes concentrações de açúcares fermentáveis totais. Porém, foi possível observar que as concentrações de açúcares, para algumas frações, encontraram-se próximas,

como mostra a Figura 5.3, sendo que as concentrações de glicose foram similares para os diferentes hidrolisados.

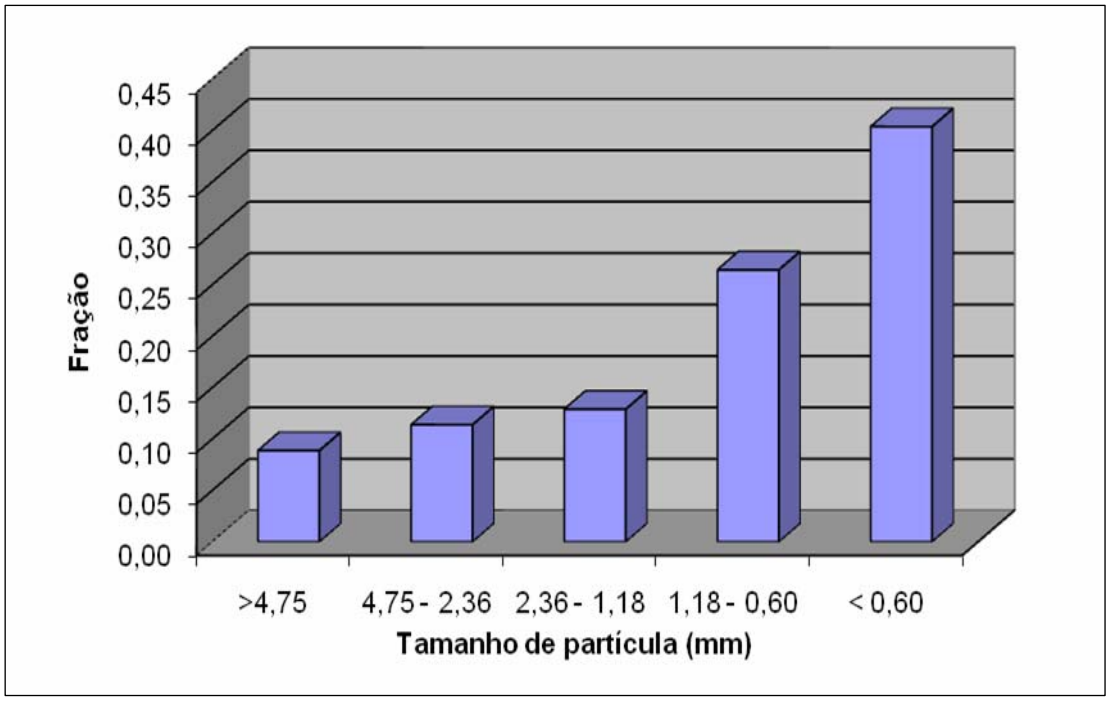


Figura 5.2 Distribuição granulométrica do bagaço de cana utilizado para hidrólise ácida

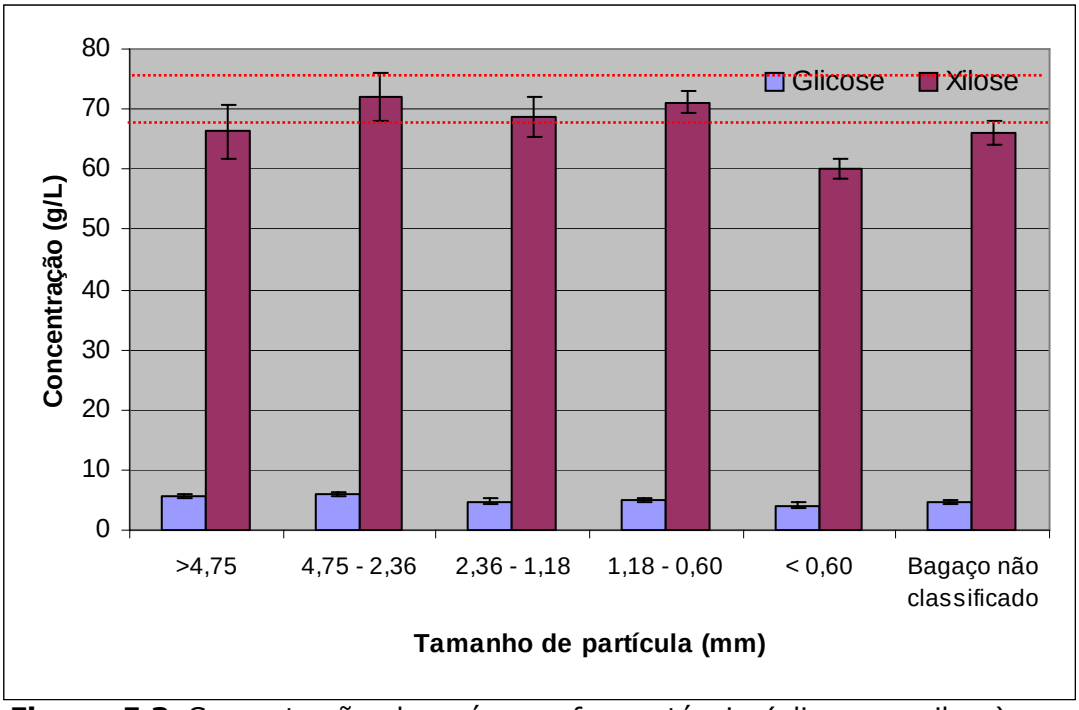


Figura 5.3 Concentração de açúcares fermentáveis (glicose e xilose) em hidrolisados obtidos a partir de sólido com diferente tamanho de partícula

Adicionalmente, a concentração máxima de xilose (72 g/L), alcançada com um tamanho de partícula entre 4,75 e 2,36 mm, encontrou-se no intervalo de confiança de resposta para todas as granulometrias avaliadas, exceto para aquela menor de 0,6 mm, ao contrário do que poderia ser esperado, devido ao aumento na área de contato com a utilização de partículas de menor tamanho. Este comportamento pode estar relacionado com a capacidade de absorção do material, que diferentemente de madeiras, permite a permeação da solução aquosa no interior das fibras, fazendo com que seja indiferente a área superficial para o contato entre o sólido e o líquido em faixas granulométricas relativamente amplas (ZENG *et al.*, 2007). No caso das partículas menores de 0,6 mm, a menor concentração de açúcares observada pode estar relacionada à maior dificuldade para se garantir a homogeneidade da mistura, devido à alta relação sólido:líquido aplicada (1:2) complementada com a maior capacidade de absorção do bagaço quando utilizadas partículas tão pequenas. Esta dificuldade foi evidenciada, durante a realização do experimento, pela presença de sólido seco e umedecido quando misturados o sólido e a solução ácida, apesar do criterioso cuidado de se obter uma maior homogeneidade.

Considerando-se que os hidrolisados obtidos do pré-tratamento ácido de sólidos com tamanhos de partícula menores de 4,75 e maiores de 0,6 mm não apresentaram diferenças significativas na concentração de xilose e, adicionalmente, que o processo de separação de partículas menores que 0,6 mm resultaria no aumento de custo em uma escala industrial, deu-se continuidade ao trabalho utilizando-se bagaço não classificado, sendo, apenas, separadas as partículas com um tamanho maior que 4,75 mm.

5.3 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA FERMENTABILIDADE DE HIDROLISADO OBTIDO COM ÁCIDO 1% (v/v)

Sendo um dos interesses desta pesquisa a utilização de condições brandas durante o pré-tratamento ácido do bagaço de cana, conduziu-se o processo com uma concentração de ácido de 1% (v/v), diminuindo, consideravelmente, a concentração utilizada originalmente (3,5% v/v) para maximizar a concentração de xilose (BETANCUR *et al.*, 2005). Para isto, realizaram-se diferentes fermentações com hidrolisado obtido com ácido 1% (v/v), sem modificar as

condições térmicas do pré-tratamento (1 atm/121ºC/45 min) e mantendo-se a relação sólido:líquido de 1:2 (g:mL).

O perfil cinético da primeira fermentação, realizada em biorreator com uma concentração inicial de células de 4,3 g/L, apresenta-se na Figura 5.4. Nesta figura, observa-se que a máxima concentração de produto (21,0 g/L) foi alcançada em um tempo de 60 horas, ainda com a presença de xilose no meio (16,2 g/L). Estes valores correspondem a uma produtividade volumétrica em etanol e um fator de rendimento de substrato em produto de 0,35 g/L.h e 0,36 g/g, respectivamente (Figura 5.4b).

Durante o processo observou-se um consumo preferencial da glicose durante as primeiras 2 horas de fermentação, apresentando uma taxa de consumo de 1,28 g/L.h, enquanto a xilose foi consumida com uma taxa de 0,30 g/L.h (Figura 5.4a). Tal comportamento pode estar relacionado com a repressão do consumo de xilose na presença de glicose, como observado por Agbogbo *et al.* (2006) ou decorrente do sistema de transporte específico para cada um dos carboidratos, sendo constitutivo para glicose e indutivo para a xilose, como proposto por Antunes (1997) para esta mesma linhagem de *P. stipitis*. A seletividade no sistema de transporte é também reportada por Krahulec *et al.* (2010) em *S. cerevisiae* geneticamente modificada.

Após as primeiras 2 horas de fermentação, ambos os carboidratos foram consumidos simultaneamente, com taxas de 1,21 e 1,64 g/L.h para glicose e xilose, respectivamente, até o esgotamento da glicose, observado na sétima hora de processo (Figura 5.4a). Este aumento na taxa de consumo de xilose, quando a glicose começa a ser esgotada, foi também reportado por Krahulec *et al.* (2010) para uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae*.

Deve-se destacar que após 60 horas de fermentação, observa-se uma concentração residual de xilose de 11,0 g/L (Figura 5.4b). Este substrato residual representaria um gargalo para um processo industrial, pois resultaria em um ineficiente aproveitamento da xilose disponível. Krehulec *et al.* (2010) atribuíram esta diminuição no consumo de xilose com o tempo, à ineficiente regeneração dos co-fatores da enzima xilose redutase, embora em experimentos realizados com *S. cerevisiae* recombinante. Adicionalmente, uma carência nutricional poderia, igualmente, estar associada à presença de xilose residual.

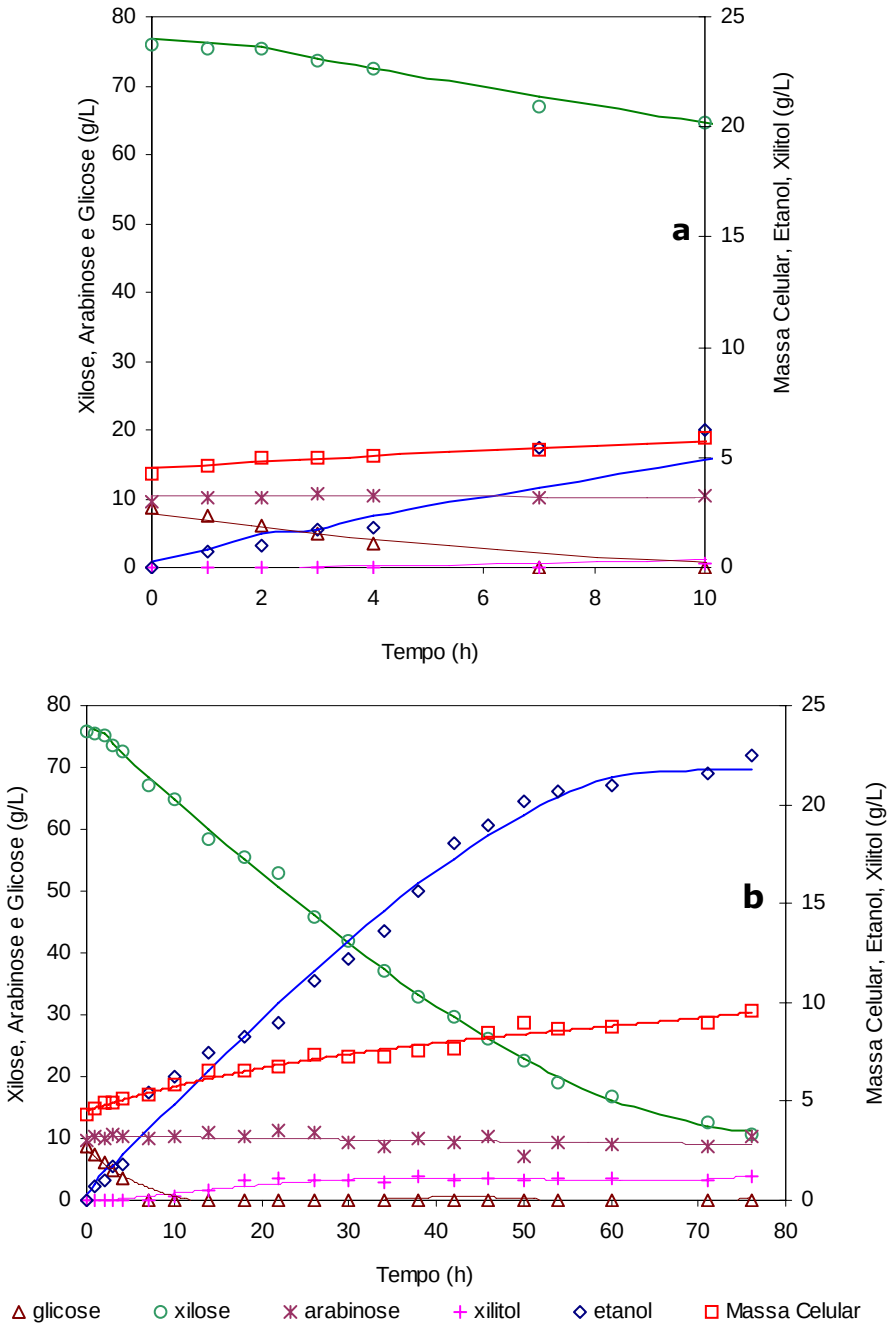


Figura 5.4 Cinética de fermentação do hidrolisado obtido com uma solução de ácido 1% (v/v), realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm), utilizando-se uma concentração inicial de células de 4,3 g/L. (a) Primeiras 10 horas de processo; (b) Comportamento até 75 horas de processo

Quando analisado o comportamento da concentração celular, é possível notar um crescimento moderado do microrganismo, sendo alcançada uma concentração final de 9,6 g/L, correspondente a um fator de rendimento de substrato em massa celular de apenas 0,07 g/g (Figura 5.4b). Este crescimento, não reportado em fermentações realizadas com uma concentração celular inicial

de 10 g/L sob as mesmas condições de aeração, pode estar relacionado com a maior massa de oxigênio dissolvido disponível por massa celular, ao se reduzir o tamanho do inóculo para 4 g/L e se manter a condição de aeração.

Durante a fermentação (Figura 5.4b) foi possível, adicionalmente, constatar a incapacidade da levedura por consumir arabinose, como reportado por Betancur (2005). Da mesma forma foi observado ao acúmulo de xilitol, intermediário do metabolismo da xilose, como é característico para esta linhagem.

Outra condição de inóculo foi avaliada (10 g/L) com o propósito de verificar a influência desta variável sobre a produtividade do processo, estando o perfil cinético deste experimento apresentado na Figura 5.5. De forma similar à fermentação iniciada com 4,3 g/L de células, verificou-se um consumo simultâneo da glicose e da xilose, sendo a hexose consumida totalmente nas primeiras horas do processo (10 h), enquanto a xilose não foi esgotada totalmente, apresentando uma concentração residual de 8,1 g/L após 60 horas de fermentação.

Durante essa fermentação (Figura 5.5) foi observado um menor crescimento celular, quando comparado à fermentação anterior (Figura 5.4), resultando em um fator de rendimento de substrato em massa celular de 0,04 g/g, para um tempo de processo de 50 horas, 10 horas menor que o processo realizado com uma concentração inicial de células de 4,3 g/L (Tabela 5.2). Este menor crescimento da levedura denota a importância da disponibilidade de oxigênio para direcionar o metabolismo da levedura, como discutido anteriormente, e como também reportado por Jeffries *et al.* (2007) para esta mesma levedura quando foi utilizada xilose como fonte de carbono e para *S. cerevisiae* geneticamente modificada para assimilar esta pentose. Adicionalmente, descarta-se uma possível carência de nutrientes ao se observar patamares similares em processos utilizando inóculos diferentes (Figuras 5.4 e 5.5). Neste sentido, em caso de uma carência de nutrientes, o processo conduzido com um inóculo maior, teria apresentado resultados de fermentação marcadamente inferiores, em função de uma demanda maior por nutrientes.

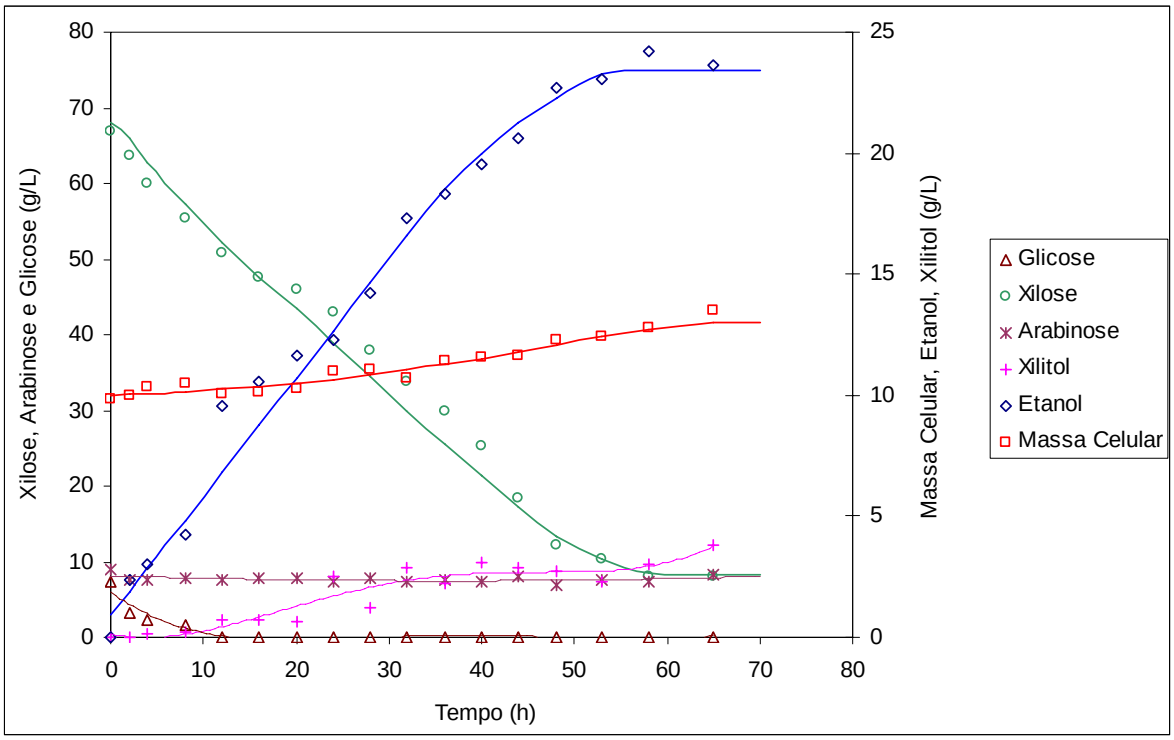


Figura 5.5 Cinética de fermentação do hidrolisado obtido com uma solução de ácido 1% (v/v), realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm), utilizando-se uma concentração inicial de células de 10 g/L.

Tabela 5.2 Influência da concentração celular inicial na fermentação de hidrolisado obtido com solução ácida 1% (v/v)

Massa Celular Inicial (g/L)	Tempo (h)	P (g/L)	Massa Celular (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/L)	μ_X (h^{-1})	Q_P (g/L.h)
4,3	60	21,0	9,6	0,36	0,07	0,013	0,35
10,0	50	23,1	12,4	0,37	0,04	0,004	0,46

Diferente do observado na fermentação com menor concentração inicial de células (4,3 g/L), na fermentação apresentada na Figura 5.5 (X_0 = 10 g/L), a produtividade volumétrica mostrou-se maior, alcançando o valor de 0,46 g/L.h, com um rendimento de substrato em produto similar (0,37 g/g) e uma concentração de produto de 23 g/L. Adicionalmente, observou-se um acúmulo de xilitol ligeiramente superior (2,7 g/L). Da mesma forma, quando utilizado um inóculo mais robusto (10 g/L) apresentaram-se melhores resultados no diz

respeito ao tempo (10 horas a menos), à xilose residual (2 g/L a menos), fator de rendimento de substrato em biomassa (0,03 g/g a menos) e um fator de rendimento em produto levemente superior (0,01 g/g a mais). Adicionalmente, observou-se um acúmulo de xilitol levemente superior, alcançando 2,7 g/L para fermentação com inóculo de 10 g/L, em contraste aos 2,0 g/L observados com inóculo de 4,3 g/L, decorrente da menor oferte de substrato e nutrientes quando utilizada uma maior densidade celular.

5.4 APRIMORAMENTO DO PROCESSO DE PROPAGAÇÃO CELULAR

O procedimento para a obtenção do inóculo é extremamente importante para a produção de células que permitam uma fermentação bem sucedida. Considerando isto, avaliou-se a obtenção de células pela propagação sequencial em meio suplementado com hidrolisado, eliminando a etapa de ativação celular em meio sintético e, consequentemente, diminuindo em 24 horas o tempo para a obtenção de um inóculo apropriado para fermentação. Desta forma, modificou-se a metodologia de propagação das células, como descrito no capítulo de materiais e métodos, começando o processo diretamente na primeira etapa de aclimatação (com um percentual de 25% do hidrolisado hemicelulósico).

Na Figura 5.6 contrastam-se os perfis cinéticos para o cultivo de ativação em meio sintético e para células inoculadas, diretamente de meio sólido, em meio contendo 25% de hidrolisado. Ao se comparar os resultados de ambos os processos podem ser observados comportamentos similares nos perfis para o consumo de substrato, produção de etanol e crescimento celular. Porém, destaca-se o processo realizado em meio sintético, que ocorreu em um tempo menor, como esperado, devido à ausência dos inibidores próprios do hidrolisado.

Considerando-se como tempo final de fermentação o momento no qual se estabiliza a concentração de etanol, sendo 32 horas para cultivo de ativação utilizando xilose comercial e 40 horas quando utilizado hidrolisado, torna-se evidente a diferença entre os processos como verificado nas variáveis apresentadas na Tabela 5.3. Entre estas variáveis de resposta, destaca-se o maior tempo necessário para o processo realizado utilizando hidrolisado no meio de fermentação (25%) e a diminuição do fator de rendimento de substrato em produto (de 0,25 g/g no meio sintético para 0,19 g/g no meio contendo xilose proveniente de hidrolisado). Contudo, a concentração final de células e a taxa

específica de crescimento (μ_X), os parâmetros mais relevantes desta etapa, foram similares para ambos os processos e, consequentemente, o fator de rendimento de substrato em biomassa, sinalizando a possibilidade de se eliminar a etapa de ativação celular em meio sintético.

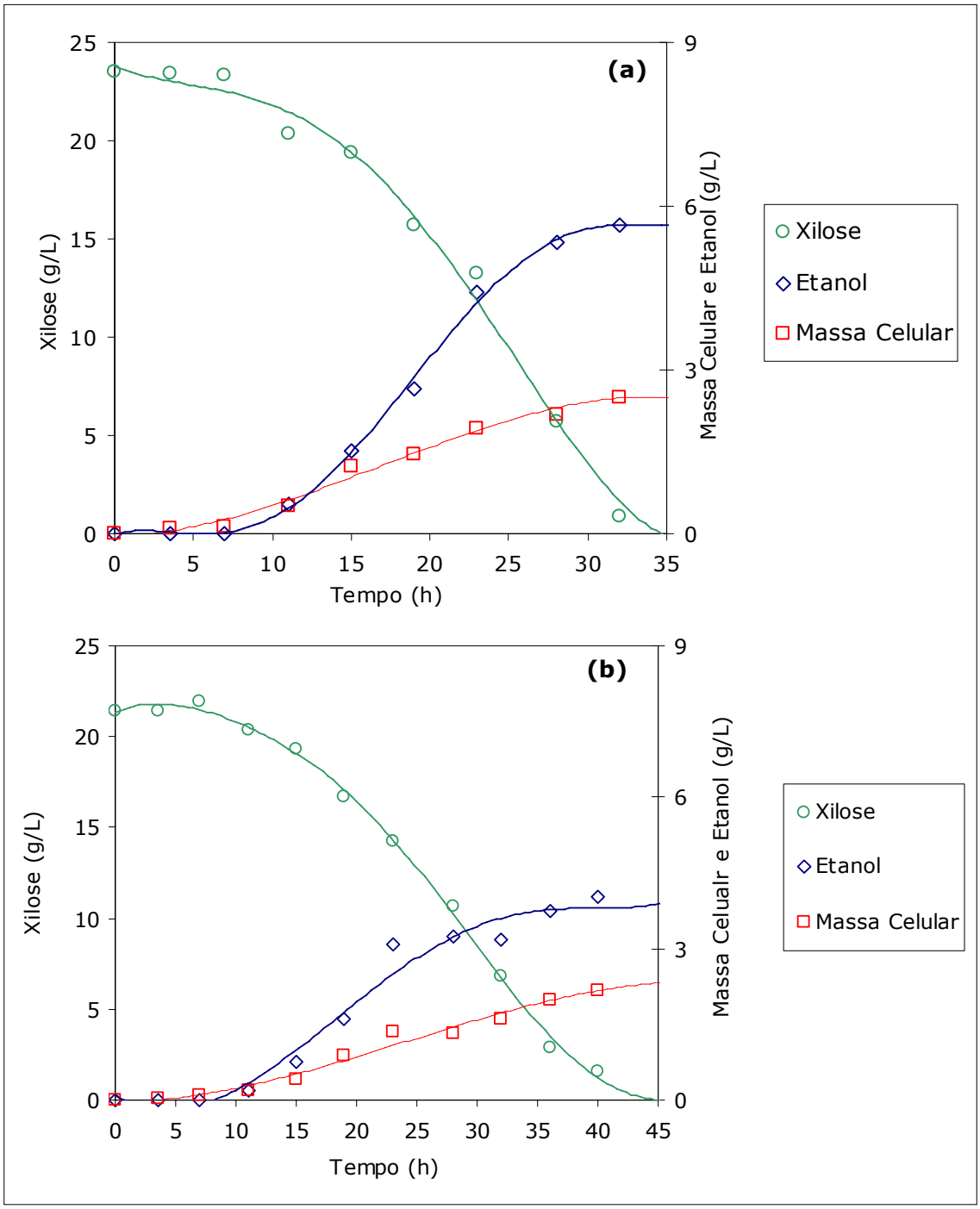


Figura 5.6 Cinética de cultivo de ativação em meio sintético (a) e em meio com 25% de hidrolisado (b)

Tabela 5.3 Parâmetros relevantes ao cultivo de ativação em meio sintético e meio com 25% de hidrolisado hemicelulósico

Cultivo de Ativação	Tempo (h)	P (g/L)	Massa Celular (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/L)	μ_X (h^{-1})
Com xilose comercial	32	5,64	2,49	0,25	0,11	0,094
Com xilose de hidrolisado	40	4,10	2,19	0,19	0,10	0,098

Porém, sendo a fermentação alcoólica a etapa mais relevante do processo para a obtenção do etanol, são as características desta etapa que possuem maior importância para comparações entre ambas as estratégias de propagação celular (com e sem a etapa de ativação em meio sintético). Assim, enquanto na Figura 5.5 observa-se o perfil cinético para a fermentação realizada utilizando células propagadas em três etapas (inicialmente cultivo de ativação, na segunda utilizando meio com 25% de hidrolisado e, na terceira, em meio com 50% de hidrolisado), na Figura 5.7 apresenta-se o perfil cinético de fermentação utilizando células propagadas em duas etapas (uma primeira com meio contendo 25% de hidrolisado e, uma segunda, na qual a proporção de hidrolisado utilizada foi aumentada para 50%). Em ambas as fermentações não foram evidenciadas diferenças marcantes, como pode ser observado tanto nos perfis cinéticos, quanto nos parâmetros apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Parâmetros relevantes às fermentações em biorreator de hidrolisado utilizando-se inóculo propagado em três (ativação, 1ª e 2ª aclimatação) ou duas (1ª e 2ª aclimatação) etapas

Preparação do Inóculo	Tempo (h)	P (g/L)	Massa Celular (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/L)	Produtividade (g/L.h)
Com Cultivo de Ativação	50	23,1	12,4	0,37	0,040	0,46
Sem Cultivo de Ativação	50	25,1	13,8	0,35	0,050	0,50

A proximidade dos parâmetros apresentados na Tabela 5.4 valida a hipótese de que o processo de fermentação independe da utilização da etapa denominada cultivo de ativação durante a obtenção do inóculo. Em outras palavras, é possível se obter um inóculo apropriado para o processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico, sem comprometer a eficiência do

mesmo, utilizando, exclusivamente, a xilose proveniente do bagaço, ao se eliminar a etapa de ativação em meio sintético. Isto permite uma diminuição de 24 horas durante o processo de propagação celular.

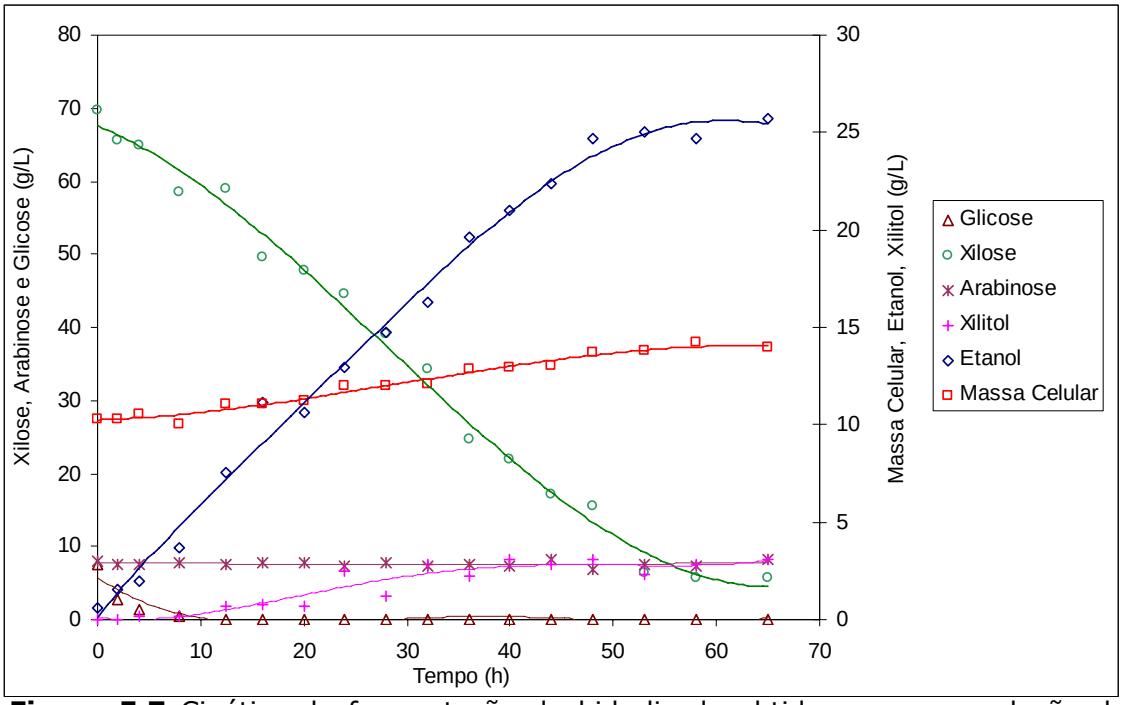


Figura 5.7 Cinética de fermentação do hidrolisado obtido com uma solução de ácido 1% (v/v), realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm, X_o=10 g/L), sem a utilização de cultivo de ativação para a preparação do inóculo

5.5 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM ÁCIDO DILUÍDO

Sendo o pré-tratamento ácido uma etapa crucial para o aproveitamento da fração hemicelulósica visando à produção de etanol via biotecnológica, apresentam-se, a seguir, os resultados dos planejamentos relacionados com a determinação das condições mais apropriadas para a obtenção de hidrolisado com boas características de fermentabilidade.

5.5.1 Planejamento preliminar

Diferentes autores reportam que a fermentabilidade de hidrolisados hemicelulósicos, seja qual for a biomassa lignocelulósica utilizada e o tipo de ácido utilizado, encontra-se diretamente relacionada com a severidade do pré-

tratamento ácido (condições de temperatura, tempo e concentração de ácido) aplicada para extrair os açúcares constituintes desta fração (SCHELL *et al.*, 2003; SUN & CHENG, 2005; GÁMEZ *et al.*, 2006; CANETTIERI *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2008). Com o intuito de se reduzir a severidade do pré-tratamento, a fim de se obterem hidrolisados com fermentabilidade aumentada, foram avaliadas novas condições de relação sólido:líquido, concentração do ácido e tempo, como descrito no capítulo 4.

A concentração de xilose, de açúcares fermentáveis (xilose + glicose), a eficiência na obtenção de xilose (eficiência de hidrólise) e a quantidade de hidróxido de cálcio necessária para o ajuste final de pH de cada um dos hidrolisados foram consideradas como variáveis de resposta para este primeiro planejamento experimental. Os resultados dos experimentos apresentam-se na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Resultados experimentais do planejamento preliminar para o pré-tratamento ácido

Ensaio	Xilose (g/L)	Açúcares fermentáveis (g/L)	Eficiência de hidrólise (%)	mg $Ca(OH)_2$ por mL de hidrolisado
1	60,2	62,6	52,4	16,1
2	68,9	72,7	60,0	13,2
3	42,8	44,7	74,5	16,6
4	44,4	47,7	77,3	16,8
5	79,5	87,5	69,2	37,1
6	84,2	92,8	73,3	37,8
7	43,2	47,0	75,2	33,7
8	43,8	48,4	76,2	48,6
9	10,7	11,2	14,0	6,9
10	59,1	64,4	77,2	43,1
11	98,2	117,4	72,6	29,0
12	39,3	44,6	73,5	26,6
13	48,3	52,0	63,1	27,0
14	60,9	67,7	79,5	32,4
15(c)	54,6	60,4	71,3	28,6
16(c)	54,9	60,6	71,7	27,9
17(c)	50,7	55,6	66,2	30,6

(c) réplicas do ponto central

Tendo a concentração de etanol na fermentação de hidrolisado uma dependência direta com a concentração de substrato, especificamente xilose, destacam-se os ensaios 5, 6 e 11 que geraram as mais altas concentrações de xilose (80 g/L, 84 g/L e 98 g/L, respectivamente), sendo superiores em mais de 10 g/L às obtidas nos outros ensaios. Estas altas concentrações da pentose

correspondem às mais altas relações sólido:líquido (1:1,3 no ensaio 11 e 1:2 nos ensaios 5 e 6) e níveis superiores da concentração de ácido (no caso dos ensaios 5 e 6) ou moderada (no ensaio 11). Observa-se, de forma preliminar, a alta influência da relação sólido:líquido e da concentração de ácido para a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose. Adicionalmente, com a concentração de açúcares fermentáveis, nota-se um comportamento completamente análogo ao observado para xilose, o que se explica por ser a xilose o açúcar fermentável marcadamente majoritário (acima de 84%) em todos os hidrolisados obtidos.

No que concerne à eficiência da hidrólise (expressa como a razão percentual entre a quantidade de xilose solubilizada no hidrolisado e o teor de hemicelulose no bagaço) é observado um comportamento diferente. A máxima eficiência de hidrólise foi alcançada no ensaio 14, correspondente ao nível central para a relação sólido:líquido e a concentração de ácido (1:4 e 1,13%, respectivamente) e o maior tempo de processo (93 min). A partir destes resultados, apresentou-se uma sequência de valores que variam entre 51,7% e 78,4% para diferentes combinações dos parâmetros avaliados. Destaca-se que, quando utilizada a menor concentração de ácido (0,5%), a eficiência de hidrólise apresentou um valor, significativamente, baixo (13,8%).

Adicionalmente, observou-se que a mais alta concentração de xilose (98,2 g/L) obtida no planejamento experimental (ensaio 11) não foi coincidente com uma maior eficiência de hidrólise. Igualmente, a maior eficiência de hidrólise (78,4% no ensaio 14) correspondeu a uma concentração média da pentose (60,9 g/L). Este comportamento está intimamente relacionado com a relação sólido:líquido, pois uma alta relação permite a obtenção de uma alta concentração de xilose e de uma baixa eficiência, enquanto uma baixa relação gera concentrações menores de xilose e favorece a eficiência do pré-tratamento. Faz-se necessário determinar condições que permitam um equilíbrio entre estas duas variáveis de resposta, concentração e extração, para atingir resultados mais adequados.

A quantidade de hidróxido de cálcio utilizada para ajustar o pH do hidrolisado, após o tratamento térmico, mostrou uma relação direta com a concentração de ácido empregada. Pode-se deduzir, dado o comportamento desta variável de resposta, que quando diminuída em um ponto percentual a concentração de ácido, a quantidade de hidróxido de cálcio adicionada diminui, em média, em 15 mg de cal por mL de hidrolisado.

É importante citar que não se evidenciou nenhuma tendência nas variáveis de resposta com respeito aos limites utilizados para o tempo, apesar da ampla faixa avaliada. Isto poderia ser um indicativo de que o nível inferior utilizado para o tempo pode ser suficiente para se obterem resultados favoráveis à hidrólise da fração hemicelulósica.

A análise estatística permitiu verificar o acentuado efeito da relação sólido:líquido e a importância da concentração de ácido sobre a concentração de xilose no hidrolisado, como observado na Figura 5.8a, sendo a magnitude do efeito linear da relação sólido:líquido quase duas vezes maior ao correspondente para a concentração do ácido. Além disto, os efeitos quadráticos para ambas as variáveis, também, apresentaram efeito significativo. O efeito linear do tempo apresentou significância marginal, apesar de mostrar uma ordem de grandeza similar à dos efeitos quadráticos.

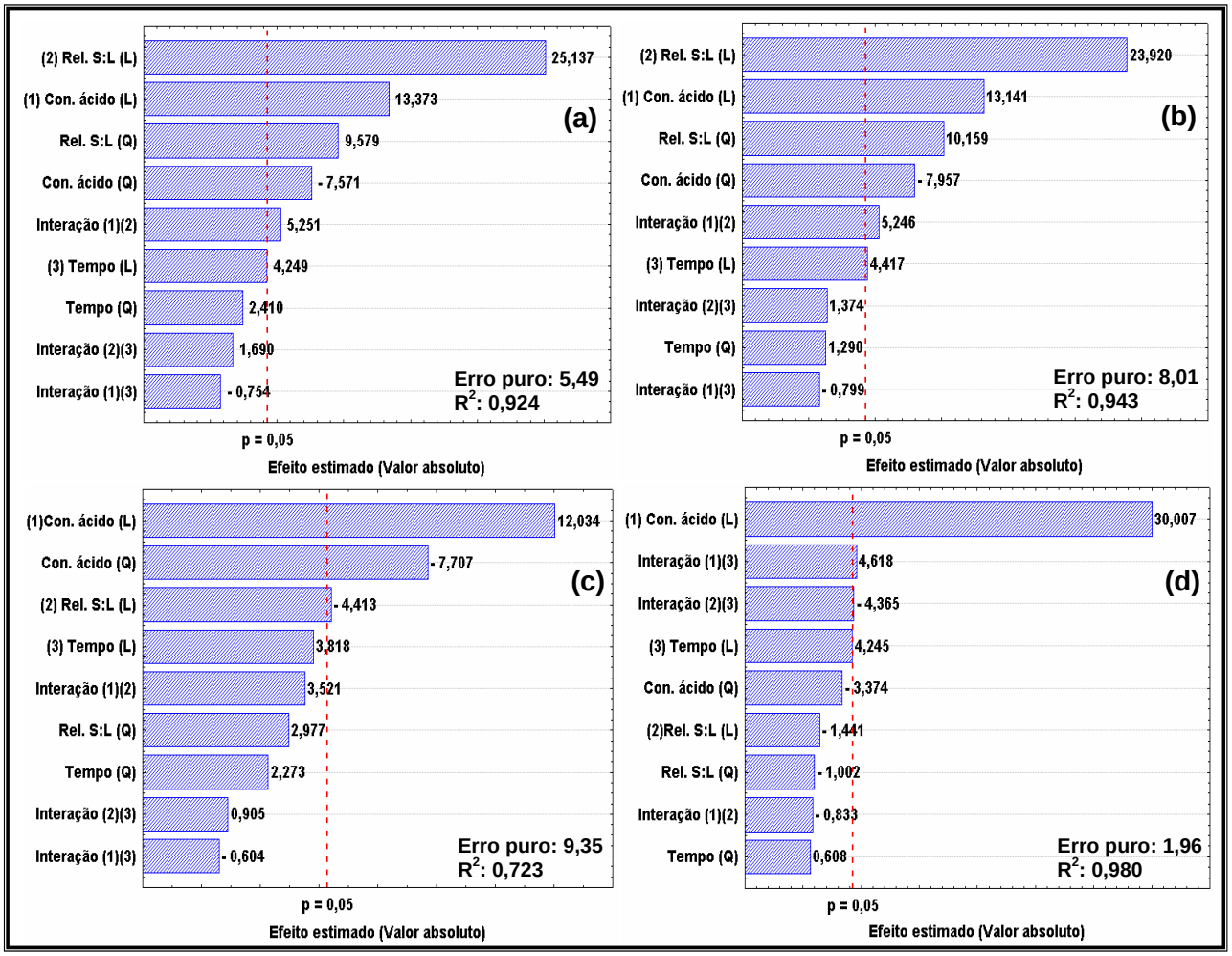


Figura 5.8 Diagramas de Pareto para concentração de xilose (a), concentração de açúcares fermentáveis (b), eficiência de hidrólise (c) e quantidade de hidróxido necessária para ajuste de pH (d)

O comportamento dos efeitos das variáveis independentes sobre a concentração de açúcares fermentáveis foi idêntico ao descrito para xilose (Figura 5.8b), como esperado ao ser esta pentose majoritária entre os açúcares fermentáveis (acima 84%) para todos os hidrolisados obtidos. Considerando-se este comportamento, novas análises relacionadas com os açúcares fermentáveis tornam-se desnecessárias sempre que considerada a concentração de xilose como variável de resposta.

No caso da eficiência da hidrólise, a influência das variáveis mudou na ordem de importância, como pode ser observado na Figura 5.8c, sendo a concentração de ácido a variável de maior importância, tanto em seu efeito linear quanto no quadrático, seguida pela relação sólido:líquido no seu efeito linear. Contudo, a relação sólido:líquido mostrou um efeito contrário ao observado para a concentração de xilose no hidrolisado. Em outras palavras, confirmou-se que uma alta relação sólido:líquido permitiu a obtenção de altas concentrações de xilose no hidrolisado, mas em detrimento da eficiência na extração da xilose contida na matriz sólida. O restante dos efeitos não apresentou significância estatística, inclusive o efeito quadrático da relação sólido:líquido.

Na análise da quantidade de hidróxido utilizada para o ajuste de pH dos hidrolisados, o diagrama de Pareto permitiu confirmar uma dependência quase única desta variável de resposta com a concentração inicial de ácido utilizada no processo (Figura 5.8d), apesar de se esperar alguma influência das outras variáveis como função da formação de ácido acético a partir dos grupos acetil liberados da estrutura hemicelulósica. Fica evidente que, para se diminuir a quantidade de hidróxido de cálcio adicionada e, consequentemente, a quantidade de sulfato de cálcio gerada durante o ajuste de pH do hidrolisado, necessita-se diminuir, apenas, a concentração de ácido. Portanto, o hidróxido utilizado para ajuste de pH dos hidrolisados pode ser excluído como variável de resposta, se for estabelecida a minimização da concentração de ácido como critério de otimização das condições do pré-tratamento.

5.5.2 Segundo planejamento incluindo a fermentabilidade dos hidrolisados

Considerando-se os resultados discutidos e objetivando aprofundar os estudos da influência das condições utilizadas no pré-tratamento ácido do bagaço, um novo planejamento foi executado. Neste, foram excluídas como variáveis de resposta a concentração de açúcares fermentáveis (por se mostrar diretamente proporcional à concentração de xilose) e a quantidade de hidróxido utilizada para ajuste de pH dos hidrolisados (por apresentar uma dependência única com a concentração de ácido). Desta forma, foram inseridas novas variáveis de resposta relacionadas com as características dos hidrolisados (concentração de inibidores) e com a fermentabilidade dos mesmos (concentração final de etanol e xilitol, rendimento e relação etanol/xilitol). Além disto, foi modificada a faixa de estudo para a relação sólido:líquido, como apresentado na Tabela 5.6, mantendo-se a distribuição padrão dos experimentos (Tabela 4.3).

Tabela 5.6 Variáveis e níveis do segundo planejamento experimental

Fatores	- α	Nível inferior	Ponto Central	Nível superior	+ α
S:L (g:mL)	1:3,3	1:3,0	1:2,5	1:2,0	1:1,7
H_2SO_4 (% v/v)	0,50	0,75	1,13	1,50	1,75
Tempo (min)	27	40	60	80	93

Os resultados experimentais, descrevendo as características dos hidrolisados obtidos, encontram-se sumarizados na Tabela 5.7. Cabe destacar que as maiores concentrações de xilose (acima de 70 g/L nos experimentos 5, 6 e 11) correspondem à utilização de elevadas relações sólido:líquido (1:3,3 e 1:3,0). Nos outros experimentos, utilizando-se as relações sólido:líquido mencionadas, a obtenção de menores concentrações de xilose é resultante da menor concentração de ácido utilizada (0,75% v/v). Consequentemente, as menores concentrações de xilose foram observadas nos experimentos em que foi aplicado o nível inferior da relação sólido:líquido (experimentos 3, 4, 7, 8 e 12) ou a combinação do ponto central deste fator com a menor concentração de ácido avaliada (experimento 9) como havia sido sinalizado anteriormente. Estes

resultados indicam a forte influência da relação sólido:líquido sobre a concentração de xilose como reportado por Cheng *et al.* (2008) em estudos com bagaço de cana, e Ballesteros (2008) na hidrólise de biomassa proveniente de cardo (*Cynara cardunculus*).

Tabela 5.7 Resultados experimentais das características do hidrolisado no segundo planejamento para a otimização do pré-tratamento ácido

Ensaio	Xilose (g/L)	Eficiência de hidrólise (%)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	Hidroximetil-furfural (g/L)	Compostos fenólicos (mg/L)
1	56,96	48,9	5,85	0,36	0,06	2,24
2	67,53	58,0	7,40	0,89	0,08	2,30
3	51,56	66,4	6,27	0,35	0,05	1,73
4	48,64	62,6	5,57	0,86	0,08	1,74
5	71,12	61,0	7,77	0,86	0,10	2,05
6	76,25	65,4	11,00	2,25	0,12	2,27
7	51,38	66,2	5,76	0,80	0,07	1,56
8	54,31	69,9	5,80	2,00	0,10	1,54
9	44,80	48,1	4,42	0,31	0,05	1,69
10	68,63	73,6	6,54	2,00	0,10	1,71
11	82,11	59,9	10,42	1,28	0,10	2,13
12	44,87	63,6	5,40	1,06	0,07	1,52
13	60,47	64,9	5,96	0,76	0,06	2,00
14	63,04	67,6	6,82	1,57	0,11	2,04
15	61,51	66,0	7,54	1,19	0,09	1,91
16	63,91	68,6	7,68	1,11	0,08	1,75
17	59,84	64,2	7,42	1,12	0,08	1,72

A eficiência de hidrólise apresentou valores entre 58,0% e 73,6%, exceto para os experimentos 1 e 9, correspondentes aos menores níveis de concentração de ácido avaliada (0,5% v/v e 0,75% v/v) e atingindo eficiências de 48,9% e 48,1%, respectivamente. Uma relação direta entre a concentração de ácido utilizada no pré-tratamento e a eficiência de hidrólise fica mais evidente ao se observar como a maior extração de xilose (73,6%) foi atingida quando utilizada a maior concentração de ácido, enquanto a menor (48,1%) correspondeu à mais baixa concentração de ácido utilizada.

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural também apresentaram uma forte dependência com a concentração de ácido utilizada. Desta forma, as maiores concentrações desses inibidores (ensaios 6, 8 e 10) foram observadas quando aplicadas altas concentrações de ácido (1,5% v/v e 1,75% v/v), enquanto baixas concentrações dos inibidores (ensaios 1, 3 e 9) corresponderam às menores concentrações de ácido aplicadas durante o pré-tratamento (0,5% v/v e 0,75% v/v).

Diferente do observado para as variáveis discutidas, a concentração de ácido utilizada durante o pré-tratamento ácido não apresentou uma marcada influência nas concentrações de ácido acético e compostos fenólicos.

Quando comparadas as características dos hidrolisados com o grau de severidade do pré-tratamento ácido (Equação 1) e agrupando os ensaios segundo a relação sólido:líquido utilizada, foi possível observar uma forte dependência da concentração de xilose, com o referido parâmetro, para os ensaios realizados com uma alta relação sólido:líquido e com o nível central definido para esta variável independente. Valores máximos de 83 g/L, em ensaios com alto teor de sólido, e 68 g/L, no nível central desta variável, foram correspondentes a graus de severidade de 1,7 e 1,8, respectivamente (Figura 5.9). Estes picos de máxima concentração de xilose são decorrentes do aumento na desidratação dos açúcares monoméricos, para a formação do respectivo furano, quando superado o grau de severidade correspondente, como descrito também por Balat *et al.* (2008) e Lloyd & Wyman (2003). No caso dos ensaios realizados nos menores níveis da relação sólido:líquido, não foi evidenciado um pico marcado para máxima concentração de xilose, o que poderia indicar que, ainda, não se atingiu um grau de severidade no qual a indesejável desidratação de xilose a furfural ocorresse de forma predominante. Contudo, as concentrações de xilose para baixas relações sólido:líquido foram menores e sem um aumento apreciável com o grau de severidade, sinalizando, mais uma vez, o maior potencial tecnológico para processos conduzidos em altas relações sólido:líquido.

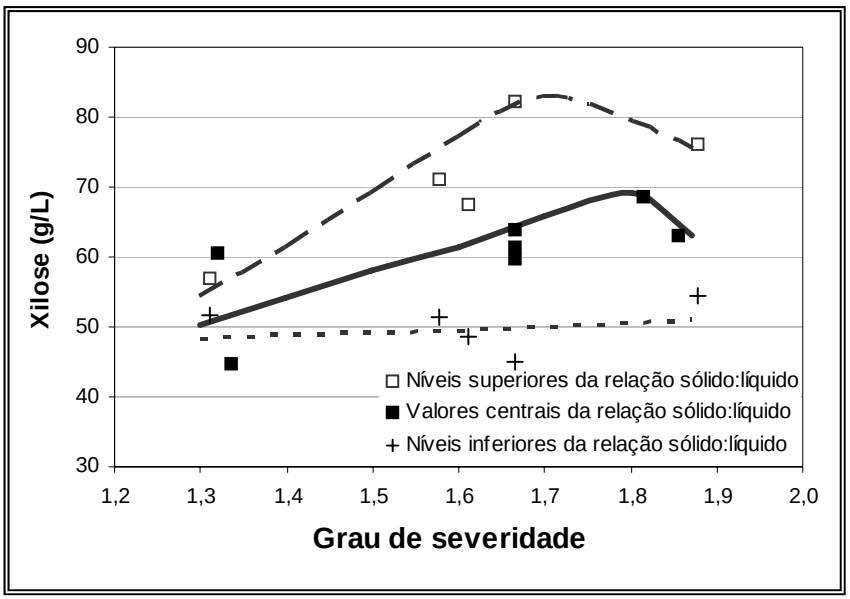


Figura 5.9 Influência do grau de severidade sobre a concentração de xilose nos hidrolisados

Cabe destacar que a reação de desidratação de carboidratos mostrou-se mais relevante no processo quanto mais drásticas as condições utilizadas, como observado na Figura 5.10, na qual a concentração de furanos aumentou em relação proporcionalmente linear com o grau de severidade no pré-tratamento.

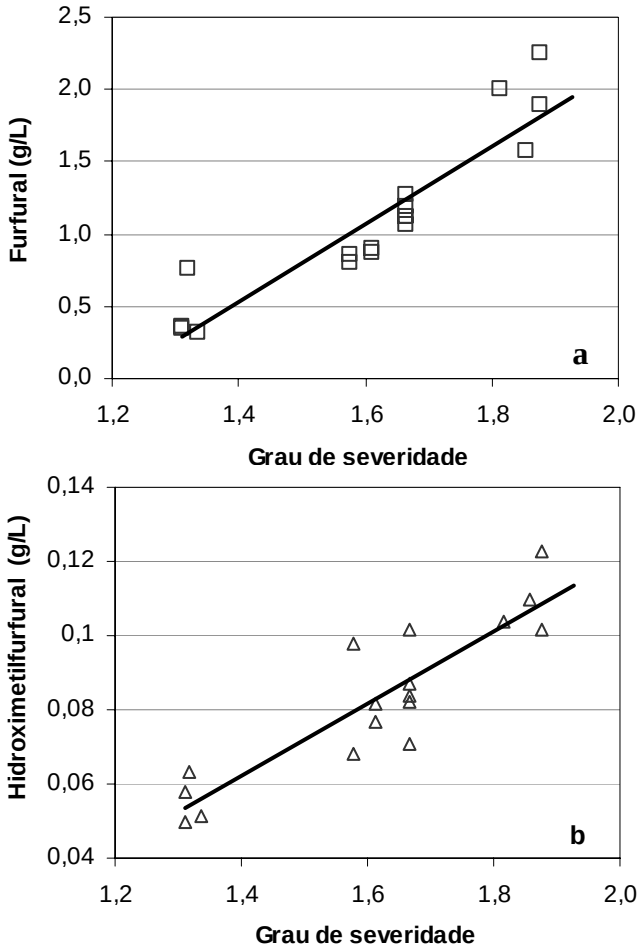


Figura 5.10 Relação entre furfural (a) e Hidroximetilfurfural (b) com o grau de severidade utilizado nos ensaios do pré-tratamento ácido

Um comportamento similar ao observado para a concentração de xilose no hidrolisado pode ser identificado para a eficiência de hidrólise (Figura 5.11), apresentando um pico de máximo próximo a 70%, para um grau de severidade de aproximadamente 1,8. O ponto de máximo apresentou-se como uma consequência da forma como foi calculada a eficiência, na qual se utilizou a

quantidade de xilose liberada como referente de hidrólise, fazendo o termo dependente da degradação do monômero.

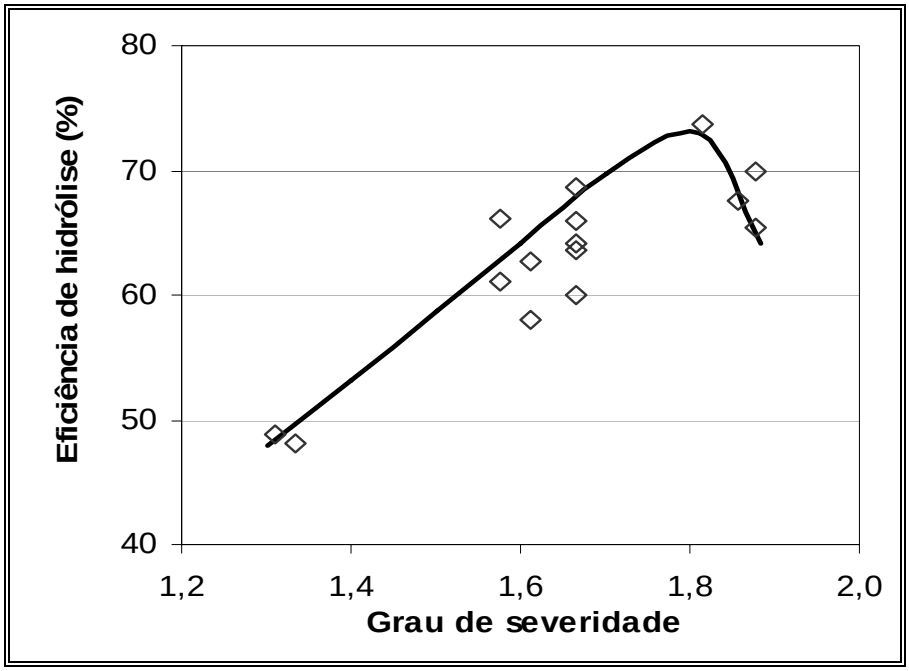


Figura 5.11 Influência do grau de severidade na eficiência de hidrólise da fração hemicelulosica de bagaço de cana durante o pré-tratamento ácido

No caso das concentrações dos compostos fenólicos, nenhuma tendência foi observada com o aumento do grau de severidade durante o pré-tratamento ácido, com valores que variaram aleatoriamente entre 1,5 mg/L e 2,3 mg/L (Figura 5.12a). No que diz respeito à concentração de ácido acético no hidrolisado, com variações entre 4,4 g/L e 11,0 g/L, observou-se um leve aumento global, sem ter uma tendência tão marcada quanto a apresentada pelos furfurais (Figura 5.12b). Em ambos os casos, deve-se destacar que os compostos fenólicos e o ácido acético fazem parte da estrutura do material lignocelulósico, diferentemente dos compostos furânicos que são derivados da desidratação dos carboidratos, sendo, portanto, mais dependente do grau de severidade do processo, na faixa de condições avaliadas, que foram suficientemente elevadas para liberar a totalidade destes compostos presentes na estrutura lignocelulósica.

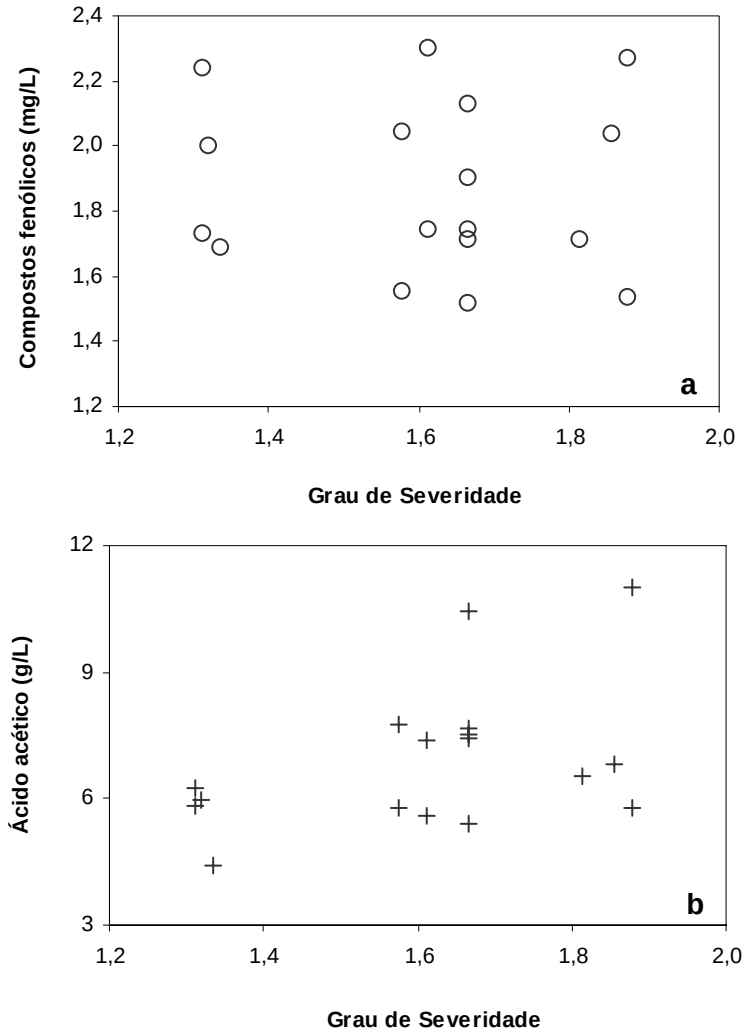


Figura 5.12 Relação entre os compostos fenólicos (a) e o ácido acético (b) com o grau de severidade utilizado nos ensaios do pré-tratamento ácido.

A análise estatística dos resultados mostrou o efeito linear da relação sólido:líquido como o mais importante na concentração de xilose, seguido do efeito linear da concentração de ácido (Figura 5.13a), sendo estes os únicos efeitos significativos para um nível de confiança de 95% (*p-level* < 0,05). Cabe destacar que o efeito linear da relação sólido:líquido, quase duas vezes maior do que o efeito da concentração do ácido, apresentou um valor positivo, confirmando a imprescindibilidade de uma alta relação sólido:líquido para a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose.

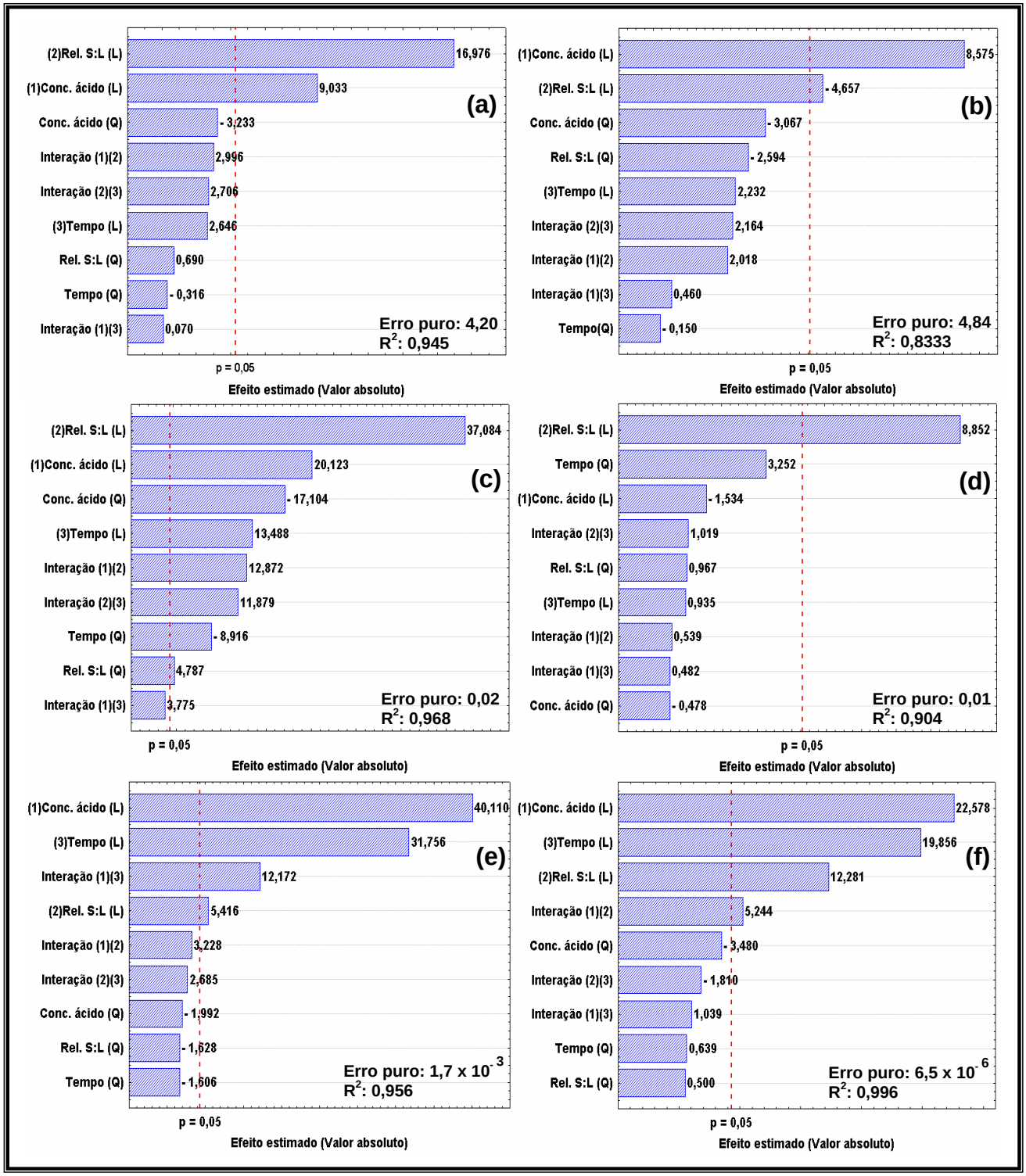


Figura 5.13 Diagramas de Pareto para concentração de xilose (a), eficiência de hidrólise (b), concentração de ácido acético (c), compostos fenólicos (d), furfural (e) e hidroximetilfurfural (f).

Neste segundo planejamento experimental foi possível constatar a mesma mudança de ordem de importância nas variáveis quando analisada a eficiência de hidrólise como variável de resposta (Figuras 5.8c e 5.13b). Assim, contrário ao observado para a concentração final de xilose, o efeito linear da concentração de

ácido apresentou-se como o mais importante, seguido do efeito linear da relação sólido:líquido, com uma ordem de grandeza quase duas vezes maior. Contudo, ambos efeitos foram os únicos que apresentaram efeito significativo sobre a eficiência de hidrólise (*p-level* > 0,05), conforme constatado para a concentração de xilose. O efeito da relação sólido:líquido mostrou-se negativo, indicando que aumentos nesta condição levariam a eficiências de hidrólise menores. Assim, a relação sólido:líquido mostra-se como uma condição com efeito contrário para a concentração de xilose e a eficiência de hidrólise durante o pré-tratamento ácido. Em outras palavras, os resultados experimentais indicaram que uma alta relação sólido:líquido favoreceu a obtenção de hidrolisados com alto teor de xilose em detrimento da eficiência da hidrólise, sendo ambos parâmetros relevantes no processo e necessários para a determinação de uma condição que permita um equilíbrio nos resultados de ambas as variáveis de resposta.

No que diz respeito à concentração de ácido acético no hidrolisado, enquanto o grau de severidade não apresentou influência marcada, a análise estatística indicou significância para todos os efeitos individuais das condições estudadas, como pode ser observado na Figura 5.13c. O efeito linear da relação sólido:líquido foi o mais importante, mostrando-se, similar ao descrito para a concentração de xilose, uma condição relevante para liberação de compostos constituintes da fração hemicelulósica.

A concentração de ácido sulfúrico mostrou-se como o fator mais importante para a concentração final de furfural e hidroximetilfurfural, como observado na Figura 5.13e e 5.13f, sendo estes compostos gerados pela degradação dos monômeros dos açúcares correspondentes (xilose e glicose). Ressalta-se que para essas variáveis de resposta, o efeito linear do tempo mostrou-se como o segundo mais importante, apresentando, também, significância estatística o efeito linear da relação sólido:líquido para ambos os furfurais. Adicionalmente, o efeito da interação entre o tempo e a relação sólido:líquido foi significativa sobre a concentração de furfural, enquanto o efeito da interação entre a concentração de ácido e a relação sólido:líquido foi significativa para a concentração de hidroximetilfurfural.

O diagrama de Pareto que mostra a influência dos efeitos sobre a concentração de compostos fenólicos (Figura 5.13d) sinalizou o efeito linear da relação sólido:líquido como único parâmetro estatisticamente significativo, confirmando-se a independência da concentração destes inibidores com as

condições térmicas e a concentração de ácido avaliadas para o pré-tratamento ácido.

Fermentabilidade dos hidrolisados

Para determinar a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos em cada uma das condições avaliadas no planejamento, foram quantificadas a concentração final de etanol e xilitol após 48 horas de fermentação (Tabela 5.8) utilizando a levedura *P. stipitis*, assim como a xilose residual. Na maior parte dos experimentos foi observado o total esgotamento do substrato principal, a xilose, apresentando-se concentrações menores que 5 g/L para os experimentos 2, 6 e 11 (2,0 g/L, 1,0 g/L e 4,8 g/L, respectivamente), que corresponderam a pré-tratamentos realizados com grau de severidade acima de 1,6 e alta relação sólido:líquido.

Tabela 5.8 Resultados experimentais para os parâmetros relacionados com a fermentabilidade dos hidrolisados após 48 h de fermentação

Ensaio	Grau de severidade	Concentração de etanol (g/L)	Concentração de xilitol (g/L)	$Y_{Etanol/S}$ (g/g)	$Y_{Xilitol/S}$ (g/g)	Etanol/xilitol (g/g)
1	1,31	17,71	5,04	0,31	0,09	3,51
2	1,61	22,46	11,91	0,34	0,18	1,89
3	1,31	18,47	2,33	0,36	0,05	7,94
4	1,61	14,85	10,47	0,30	0,21	1,42
5	1,58	19,40	15,49	0,27	0,21	1,25
6	1,88	13,73	11,72	0,18	0,15	1,17
7	1,58	18,28	4,60	0,35	0,09	3,97
8	1,88	17,48	9,71	0,32	0,18	1,80
9	1,34	18,45	3,70	0,41	0,08	4,98
10	1,81	20,88	13,64	0,30	0,19	1,53
11	1,67	16,23	14,39	0,27	0,24	1,13
12	1,67	18,69	6,09	0,41	0,13	3,07
13	1,32	20,65	7,23	0,34	0,12	2,86
14	1,86	22,55	10,61	0,35	0,16	2,13
15	1,67	18,98	8,87	0,30	0,14	2,14
16	1,67	20,31	10,16	0,31	0,16	2,00
17	1,67	20,68	9,99	0,34	0,16	2,07

A concentração final de etanol, após 48 horas de fermentação nos hidrolisados obtidos para condição do planejamento, variou entre 13,7 e 22,6 g/L, sendo evidenciada a produção de xilitol, como intermediário do catabolismo de xilose, em concentrações variando de 2,33 a 15,5 g/L. As maiores concentrações de etanol (ensaios 2, 10, 13, 14, 16 e 17) não foram coincidentes

com os hidrolisados contendo maiores concentrações de xilose (ensaios 5, 6 e 11), nos quais se observou uma maior concentração de xilitol, especialmente nos ensaios 5 e 11. Estes resultados confirmam que hidrolisados obtidos em condições severas, como no caso do ensaio 11 com um grau de severidade de 1,7, apresentaram um maior teor de xilose, mas uma deficiente produção de etanol quando utilizados como meio de fermentação. Adicionalmente, deve-se destacar que as duas melhores relações etanol/xilitol (7,94 g/g e 4,98 g/g) foram alcançadas com hidrolisados obtidos em pré-tratamentos conduzidos com um grau de severidade moderado, da ordem de 1,3 (experimentos 3 e 9).

Enquanto não foram observadas tendências na concentração final de etanol e no fator de rendimento $Y_{etanol/S}$ em relação ao grau de severidade (Figuras 5.14a e 5.14c), a concentração e o fator rendimento em xilitol apresentaram uma tendência ao aumento quando incrementado o grau de severidade do pré-tratamento (Figura 5.14b e 5.14d).

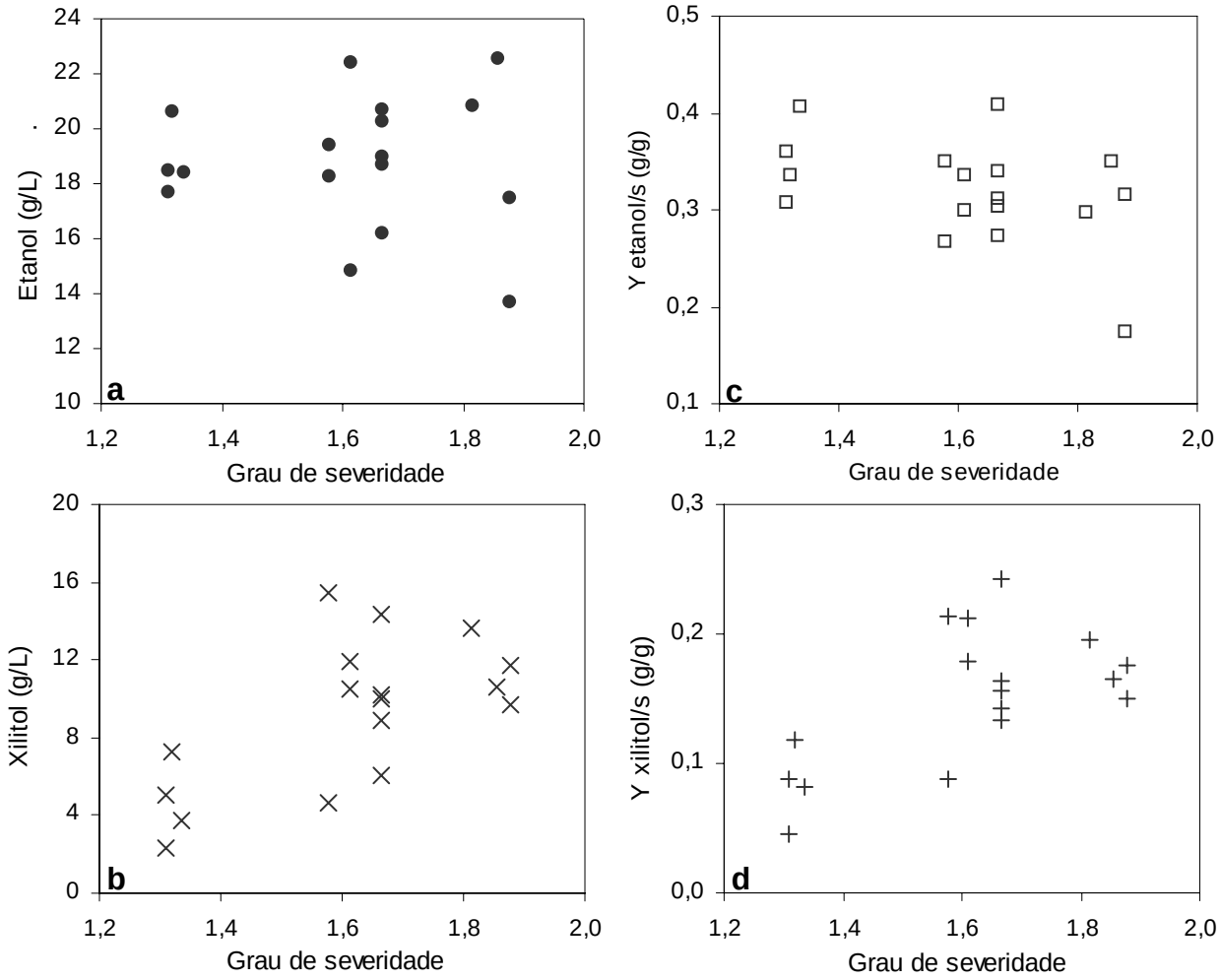


Figura 5.14 Influência do grau de severidade sobre a concentração de etanol (a), a concentração de xilitol (b), o rendimento em etanol (c) e o rendimento em xilitol (d)

No caso da relação etanol/xilitol observou-se uma diminuição drástica quando aumentado o grau de severidade (Figura 5.15). Este comportamento está relacionado com o papel do xilitol como soluto compatível em fungos (DAVIS, *et al.*, 2000), sendo comumente acumulado, durante a fermentação, em resposta das células a adversidades ambientais como o desbalanceamento do potencial redox gerado em condições restritas de oxigênio, altas concentrações de substrato ou a presença de inibidores, os quais podem ser gerados durante a etapa de pré-tratamento, particularmente em condições severas.

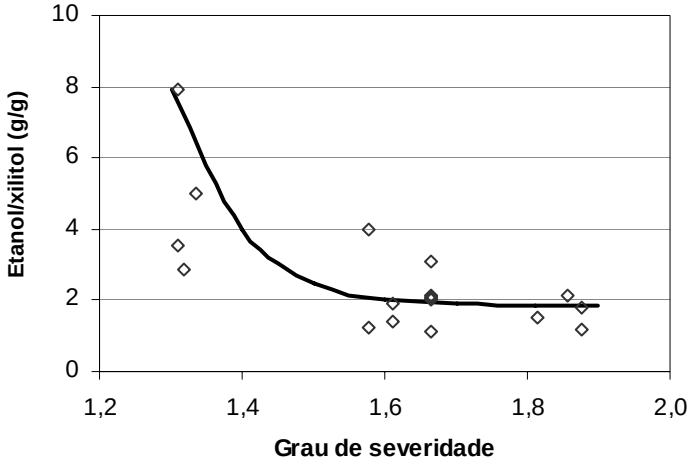


Figure 5.15 Influência do grau de severidade sobre a relação etanol/xilitol

Na Figura 5.16 é possível observar o efeito dos compostos inibidores, como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, sobre a relação entre os dois produtos principais da fermentação (etanol/xilitol) após 48 horas de processo. Com o aumento da concentração de qualquer um desses compostos observa-se, inicialmente, uma diminuição drástica na relação etanol/xilitol, que se atenua, progressivamente, após um determinado valor.

No caso do furfural, a marcada diminuição na relação etanol/xilitol apresentou-se quando a concentração deste composto aumentou de 0,4 para 0,8 g/L, após o qual a inclinação da curva diminuiu sem se estabilizar. Perfis similares foram observados para aumentos na concentração de hidroximetilfurfural e ácido acético, com uma mudança na inclinação da curva para valores acima de 0,07 g/L e 6 g/L, respectivamente.

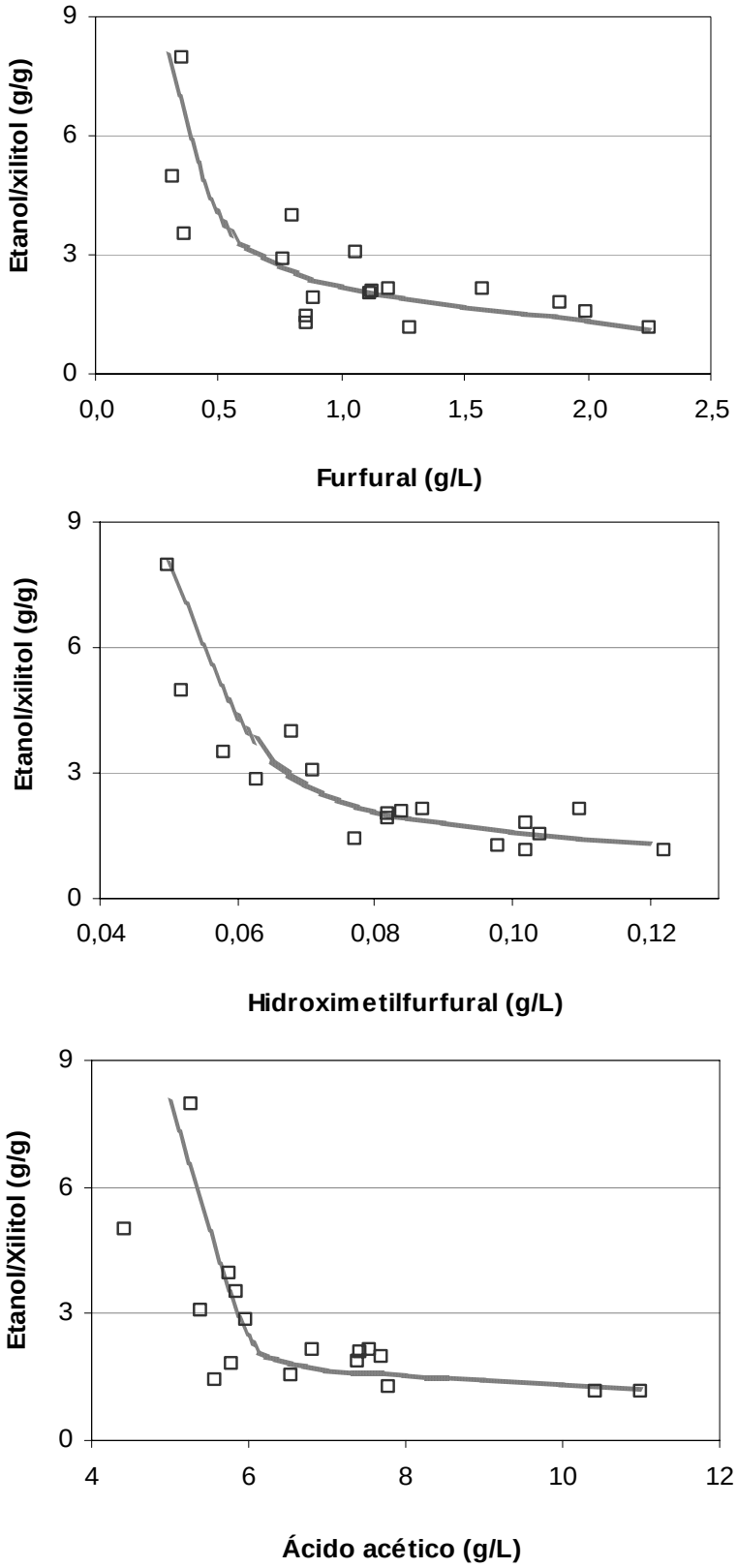


Figura 5.16 Influência da concentração de inibidores na relação etanol/xilitol após 48 horas de fermentação

Este comportamento na distribuição dos principais produtos de fermentação (etanol e xilitol) está relacionado com o efeito inibitório reportado para os furanos (furfural e hidroximetilfurural) sobre as enzimas do metabolismo de leveduras, como a álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase (MODIG *et al.*, 2002). Adicionalmente, Pampulha e Loureiro (1990) explicaram como a forma não dissociada do ácido acético se difunde pela parede celular das leveduras causando a diminuição do pH no citoplasma e inibindo a atividade de algumas enzimas, especialmente, fosfoglicerato mutase, aldolases e triose-fofato isomerase. Em leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido reportado (PHOWCHINDA *et al.*, 1995) maior efeito inibitório do ácido acético sobre o crescimento celular do que na produção de etanol. Segundo Palmqvist *et al.* (1999), a presença simultânea de etanol e ácido acético potencializa os efeitos inibitórios.

O aumento no fator de rendimento em xilitol, observado nos hidrolisados obtidos em pré-tratamentos com maior grau de severidade, pode ser uma resposta das células à adversidade causada pela maior geração de inibidores, independente da reconhecida função do xilitol como soluto compatível.

Quando analisados os resultados de fermentação, com o auxílio do *software* STATISTICA, foi possível determinar uma independência da concentração de etanol com os efeitos lineares das variáveis estudadas (Figura 5.17a), evidenciada pela não significância estatística dos efeitos lineares e pelo baixo coeficiente de correlação (R^2=0,470). Esta independência pode ser explicada pelo efeito que tem a concentração de xilose e inibidores sobre a fermentação alcoólica, fazendo com que a concentração de etanol não possa ser representada por um modelo quadrático que envolveria, apenas, as condições utilizadas durante o pré-tratamento ácido. Contudo, quando analisado o fator de rendimento em etanol como variável de resposta, foi encontrada significância estatística para o efeito linear da concentração ácido e a relação sólido:líquido, mas com um baixo coeficiente de correlação (Figura 5.17b).

No caso do xilitol, a análise estatística permitiu verificar como os efeitos lineares, de todas as condições avaliadas no pré-tratamento, apresentaram significância estatística (*p-level* < 0,05), tanto sobre a concentração quanto no rendimento (Figura 5.17c e 5.17d). Para o primeiro, além dos efeitos lineares, os efeitos de todas as interações apresentaram significância estatística, enquanto

apenas a interação entre a concentração de ácido e a relação sólido:líquido foi a única que não apresentou significância estatística sobre o rendimento em xilitol.

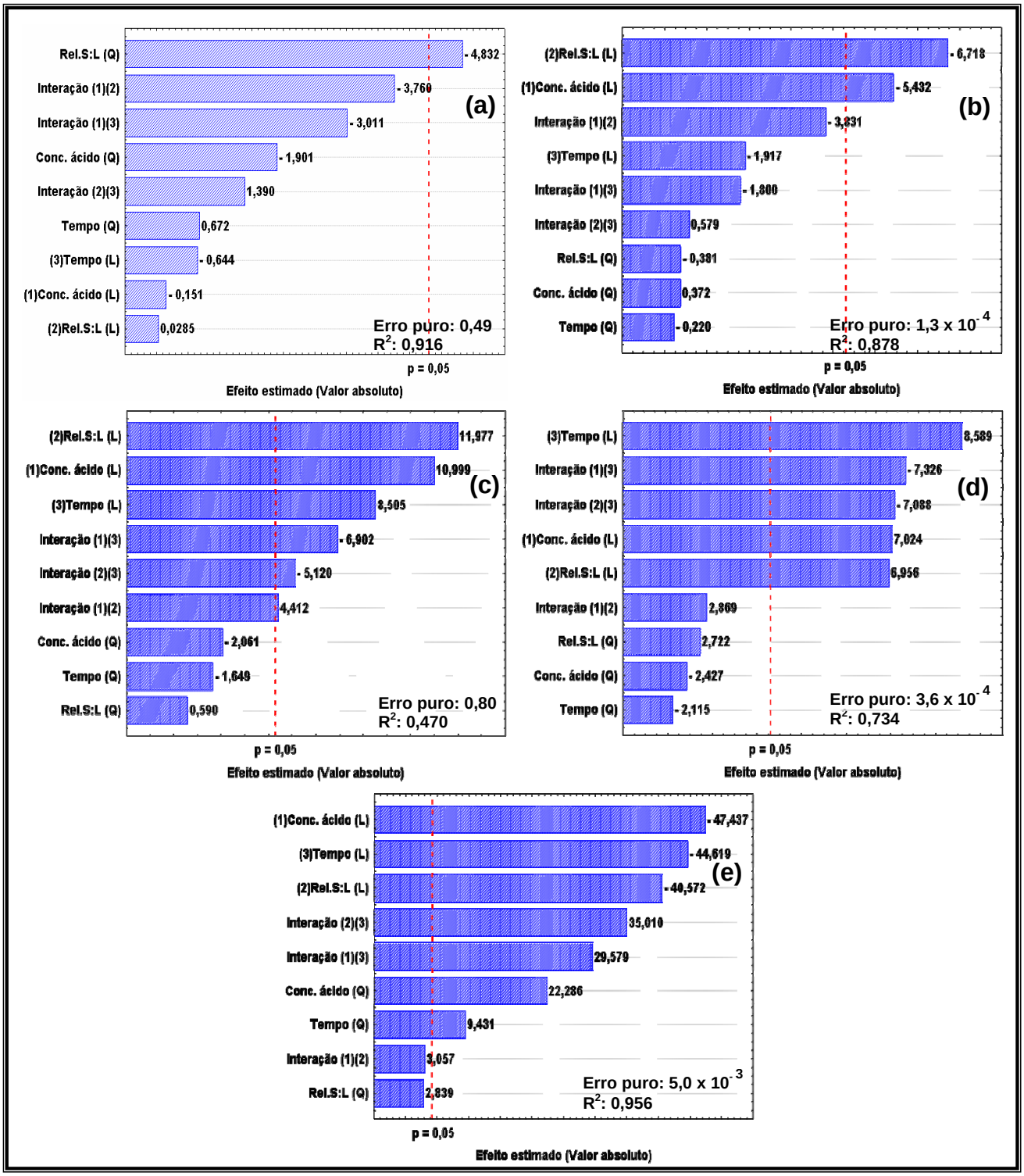


Figura 5.17 Diagramas de Pareto para concentração de etanol (a), rendimento em etanol (b), concentração de xilitol (c), rendimento em xilitol (d) e relação etanol/xilitol (e)

Ao se avaliar a distribuição dos principais produtos de fermentação (relação etanol/xilitol) foi possível observar uma significância estatística para quase todos os efeitos (Figura 5.17e), com exceção do efeito quadrático da relação sólido:líquido e do efeito da interação entre a concentração de ácido e a relação sólido:líquido. Os valores negativos obtidos para os efeitos indicam que uma relação etanol/xilitol alta, ideal para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico, requer condições de pré-tratamento com baixos tempo de exposição, relação sólido:líquido e concentração de ácido. Porém, tais condições levariam à obtenção de hidrolisados com baixo teor de xilose e, consequentemente, reduzidas concentrações de etanol na fermentação, resultados que não condizem com os requerimentos para o desenvolvimento industrial do processo. Deve-se assim, estabelecer condições de pré-tratamento que permitam um equilíbrio entre o teor de xilose no hidrolisado e sua fementabilidade, sendo a primeira maior quando incrementadas as condições do pré-tratamento, e a segunda, melhorada na medida em que a severidade do pré-tratamento seja menor.

Visando reunir de forma simples o tipo de influência que possuem as condições utilizadas durante o pré-tratamento ácido sobre as diferentes variáveis de resposta escolhidas, na Tabela 5.9 são apresentados os critérios de otimização para cada uma das variáveis de resposta e a tendência nas condições de pré-tratamento que permitiriam atingir esses critérios, segundo análise dos resultados experimentais.

Torna-se evidente, em função dos resultados discutidos, que a utilização de condições elevadas da concentração de ácido, no pré-tratamento, favoreceram a obtenção de maiores teores de xilose nos hidrolisados, assim como melhores eficiências de hidrólise. Em contraste, baixas concentrações de ácido permitiram uma diminuição na formação da maioria dos inibidores o que melhorou a fermentabilidade dos hidrolisados. Da mesma forma, quando observada a relação sólido:líquido, notou-se a necessidade de um equilíbrio para balancear maiores teores de xilose, obtidos em pré-tratamentos realizados com alta carga de sólidos, e menores concentrações de inibidores, quando o nível de sólidos aplicado foi baixo.

As variáveis de resposta relacionadas com a fermentabilidade dos hidrolisados mostraram uma homogeneidade na aplicação de níveis baixos para

todas as condições do pré-tratamento. Porém, como discutido anteriormente, pré-tratamentos desenvolvidos em condições de baixa severidade tornam-se inviáveis devido às baixas concentrações de xilose alcançadas e, consequentemente, baixas concentrações de etanol durante a fermentação. Cabe destacar que, para todas as variáveis de resposta nas quais o tempo apresentou significância estatística, indicaram uma diminuição no tempo, na faixa estudada, como melhor condição para atingir resultados ideais.

Tabela 5.9 Tendências necessárias das condições de pré-tratamento para atingir o ótimo de cada uma das variáveis de resposta, baseados na significância estatística dos efeitos

Variáveis de resposta do pré-tratamento ácido	Critério de otimização	Concentração de ácido	Relação sólido:líquido	Tempo de exposição
			Nível apropriado	
Concentração de xilose	Maximizar	⇑	⇑	•
Eficiência de hidrólise	Maximizar	⇑	⇓	•
Concentração de ácido acético	Minimizar	⇓	⇓	⇓
Concentração de furfural	Minimizar	⇓	⇓	⇓
Concentração de hidroximetilfurfural	Minimizar	⇓	⇓	⇓
Concentração de compostos fenólicos	Minimizar	•	⇓	•
Variáveis de resposta para a fermentação de hidrolisados				
Concentração de etanol	Maximizar	•	•	•
Rendimento em etanol	Maximizar	⇓	⇓	•
Concentração de xilitol	Minimizar	⇓	⇓	⇓
Rendimento em xilitol	Minimizar	⇓	⇓	⇓
Relação etanol/xilitol	Maximizar	⇓	⇓	⇓

⇑ Nível alto, ⇓ Nível baixo, • sem significância estatística

Na Tabela 5.10 registram-se os coeficientes dos modelos quadráticos, obtidos para cada uma das variáveis de resposta escolhidas, obedecendo à nomenclatura da Equação 4.3, assim como os coeficientes de correlação para cada um dos modelos e a significância na "falta de ajuste" dos mesmos. Destaca-se que, apenas, os modelos para a concentração final de etanol e para o fator de

rendimento em etanol apresentaram baixos coeficientes de correlação, indicando que não representaram apropriadamente os resultados experimentais. Por outro lado, a significância estatística apresentada para a "falta de ajuste" dos modelos que representam a concentração de furfural e a relação etano/xilitol, explica-se pela baixa magnitude do erro puro, para cada uma destas variáveis de resposta, quando comparado com os respectivos valores experimentais observados.

A determinação das melhores condições a serem aplicadas durante o pré-tratamento, visando favorecer tanto as características do hidrolisado quanto a sua fermentabilidade, foi realizada utilizando os modelos empíricos que representassem apropriadamente o comportamento das variáveis de resposta. Para isto, todas as variáveis medidas no hidrolisado foram consideradas para a etapa de otimização, sendo a concentração de xilose e a eficiência de hidrólise as variáveis a serem maximizadas, e minimizadas as concentrações de inibidores (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos), todas sendo representadas por modelos empíricos com coeficientes de correlação maiores do que 0,833.

Para as variáveis de resposta relacionadas com a fermentabilidade não foram empregadas a concentração de etanol, nem fator de rendimento deste produto pelo fato dos respectivos modelos terem apresentado coeficientes de correlação (R^2) menores de 0,75, sendo incluídos só a concentração de xilitol, variável a ser minimizada, e a relação etanol/xilitol, como variável a ser maximizada.

A função *desirability* (Equação 4.4), própria para otimizar simultaneamente múltiplas respostas, foi constituída para as variáveis envolvidas com as características do hidrolisado, a concentração de xilitol e a relação etanol/xilitol, sendo estas duas últimas representativas do processo de fermentação. O fator de rendimento em xilitol não foi incluído na otimização do processo por representar um efeito similar à concentração de xilitol durante a fermentação, um desvio indesejado do metabolismo celular, e seu modelo apresentar um coeficiente de correlação menor. Os critérios de otimização foram aqueles apresentados na Tabela 5.9. Na Figura 5.18 observa-se a superfície de resposta que representa a função *desirability*, destacando-se a presença de uma região de máximo, conforme esperado em um processo de otimização.

Tabela 5.10 Coeficientes empíricos para os modelos que representam o comportamento de cada uma das variáveis de resposta escolhidas para a otimização do pré-tratamento.

Variáveis de Resposta	Coeficientes empíricos										R^2	Falta de ajuste
	β_0	β_1	β_{11}	β_2	β_{22}	β_3	β_{33}	β_{12}	β_{13}	β_{23}		
Concentração de xilose (g/L)	61,810	6,011	-1,974	9,417	0,421	1,488	-0,193	2,172	0,051	1,961	0,946	Não significativo
Eficiência de hidrólise (%)	66,288	5,104	-2,009	-2,772	-1,700	1,328	-0,098	1,959	0,358	1,683	0,833	Não significativo
Concentração de ácido acético (g/L)	7,631	0,716	-0,572	1,324	0,188	0,461	-0,350	0,800	0,176	0,564	0,969	Não significativo
Concentração de compostos fenólicos (mg/L)	1,786	-0,042	-0,014	0,243	0,029	0,025	0,096	0,019	0,017	0,037	0,903	Não significativo
Concentração de furfural (g/L)	1,161	0,452	-0,026	0,061	-0,020	0,368	-0,020	0,047	0,179	0,040	0,968	Significativa
Concentração de Hidroximetilfurfural (g/L)	0,084	0,016	-0,003	0,008	0,000	0,014	0,000	0,005	0,001	-0,002	0,996	Não significativo
Concentração de etanol (g/L)	20,105	-0,037	-0,606	0,007	-1,284	-0,166	0,179	-1,166	-0,960	0,438	0,470	Não significativo
Rendimento em etanol (g/g)	0,322	-0,026	0,002	-0,034	-0,002	-0,010	-0,001	-0,026	-0,012	0,004	0,734	Não significativo
Concentração de xilitol (g/L)	9,989	2,086	-0,490	2,271	0,123	1,613	-0,344	1,093	-1,710	-1,288	0,916	Não significativo
Rendimento em xilitol (g/g)	0,155	0,022	-0,006	0,021	0,009	0,026	-0,007	0,011	-0,029	-0,028	0,879	Não significativo
Relação etanol/xilitol (g/L)	2,056	-0,906	0,488	-0,774	0,060	-0,861	0,198	0,078	0,737	0,873	0,964	Significativo

Valores em vermelho correspondem a coeficientes com significância estatística

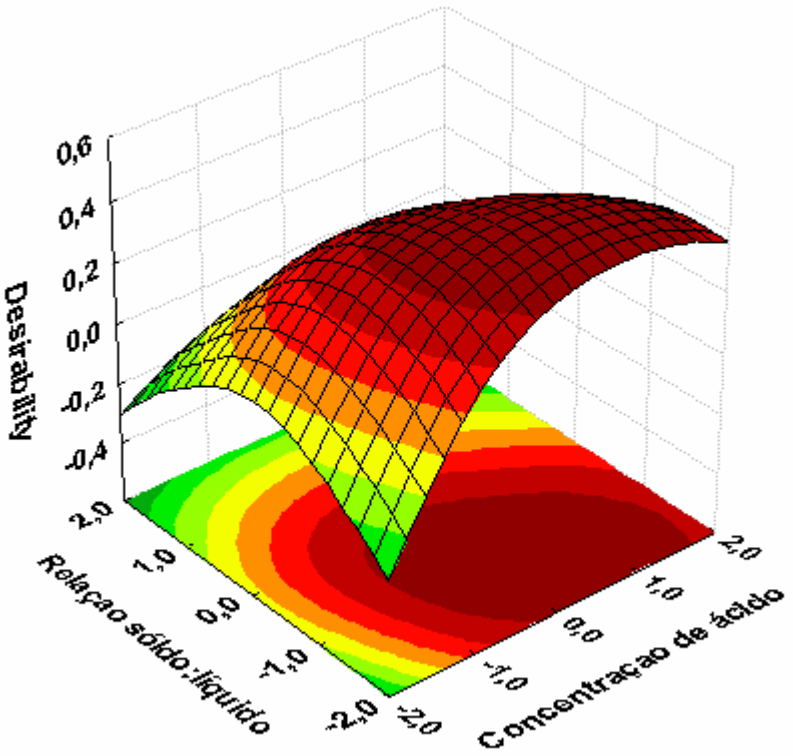


Figura 5.18 Superfície de resposta para a função *desirability* da otimização do pré-tratamento ácido visando tanto as características do hidrolisado quanto sua fermentabilidade.

As condições estabelecidas como as melhores na otimização, os valores preditos para as variáveis de resposta quando aplicadas estas condições e os resultados experimentais de sua validação, são apresentados na Tabela 5.11. Ressalta-se que quase todas as variáveis de resposta tiveram seu resultado experimental dentro da faixa de predição, a partir dos modelos ou com valores muito próximos da mesma. Somente no caso do hidroximetilfurfural, o valor experimental esteve, matematicamente, distante dos valores preditos, porém, dada a ordem de grandeza, o valor predito e experimental encontraram-se próximos, considerando-se que em uma faixa entre 0,05 g/L e 0,09 g/L deste inibidor o comportamento das variáveis de resposta foi similar como discutido anteriormente para a relação etanol/xilitol (Figura 5.16) e comprovado na validação da fermentabilidade do hidrolisado, na qual se obteve uma relação etanol/xilitol acima da faixa de predição do modelo.

Tabela 5.11 Condições preditas na otimização do processo e resultados experimentais de validação das mesmas

Variáveis controladas no pré-tratamento	Condições ótimas preditas	
Concentração de ácido (% vv)	1,09	
Relação sólido:líquido (g:mL)	1:2,8	
Tempo de exposição (min)	27	
Variáveis de resposta do pré-tratamento ácido	Valores preditos	Valores experimentais
Concentração de xilose (g/L)	54,61±4,20	50,13
Eficiência de hidrólise (%)	66,40±4,84	60,24
Concentração de ácido acético (g/L)	5,65±0,64	6,04
Concentração de furfural (g/L)	0,48±0,02	0,55
Concentração de hidroximetilfurfural (g/L)	0,05±0,01	0,09
Concentração de compostos fenólicos (mg/L)	1,92±0,39	1,18
Variáveis de resposta para o processo de fermentação	Valores preditos	Valores experimentais
Concentração de xilitol (g/L)	2,77±0,49	2,86
Relação etanol/xilitol (g/g)	5,61±0,26	6,66

Destaca-se, adicionalmente, que a concentração de xilose obtida (50,1 g/L) encontra-se muito acima de outros valores reportados (17,6 g/L) para bagaço de cana-de-açúcar utilizando outros ácidos (GÁMEZ *et al.* 2006), mesmo sendo aplicadas condições mais severas (ácido 4% m/v, 122ºC e 300 minutos) às utilizadas neste trabalho, sendo a relação sólido:líquido o grande diferencial. Inclusive, a concentração de xilose obtida nas condições otimizadas, apresenta-se maior à referenciada em trabalhos com ácido re-utilizado em três etapas, no qual se consegue alcançar concentrações de xilose de 45 g/L após processos térmicos de 121ºC, 2 horas e 10% de sólido em solução de ácido sulfúrico 1,25% (m/m) (CHENG *et al.*, 2008). Além disso, as concentrações de furfural e ácido acético sob condições otimizadas (0,48 g/L e 5,65 g/L, respectivamente) apresentaram-se menores às reportadas por Cheng *et al.* (2008), que corresponderam a 2,0 e 8,4 g/L, respectivamente.

As características do hidrolisado obtido em condições otimizadas foram comparáveis a os hidrolisados hemicelulósicos de outros materiais, apresentando uma concentração de xilose maior à reportada no pré-tratamento de fibra de palma (RAHMAN *et al.*, 2007), com concentrações de xilose máximas da ordem de 30 g/L em condições térmicas similares (119ºC, 60 minutos e uma relação sólido:líquido de 1:8 em solução de ácido sulfúrico 2%(m/m)). Mais uma vez, a relação sólido:líquido foi essencial para a obtenção de hidrolisados com maior teor de xilose, porém, em detrimento da eficiência de hidrólise que foi de 97% no pré-tratamento de fibra de palma (RAHMAN *et al.*,2007). Adicionalmente, Sun

& Cheng (2005) obtiveram uma eficiência de hidrólise similar (66%) quando palha de centeio foi pré-tratada em condições de 121ºC por 90 minutos, mesmo com uma relação de sólido inferior à estabelecida neste trabalho, 10% de sólidos em uma solução de ácido sulfúrico 0,9% (m/m).

Na Figura 5.19 é apresentado o perfil cinético para a fermentação realizada com hidrolisado obtido nas condições preditas na otimização. O processo de fermentação iniciou-se com uma alta taxa de consumo de xilose e de produção de etanol, obedecendo a valores de 2,7 e 1,2 g/L.h, respectivamente, e se manteve constate até as 15 horas de processo. A partir deste tempo, observou-se uma desaceleração nas taxas até o consumo total de xilose no tempo de 40 horas de fermentação, reduzindo-se em 8 horas o tempo para finalizar o processo, quando comparado com os ensaios do planejamento. A produtividade volumétrica global foi de 0,48 g/L.h, valor próximo a 0,54 g/L.h reportado para o mesmo microrganismo (NIGAM, 2001b) em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo destoxificado, por tratamento térmico e *overliming*, mas com concentrações iniciais de xilose e glicose muito menores (12,8 g/L e 1,7 g/L, respectivamente). Cabe ressaltar que a concentração final de etanol foi de 19,05 g/L, concentração próxima à máxima alcançada nos ensaios realizados no planejamento experimental.

Em fermentações com hidrolisado hemicelulósico com características similares (concentração de xilose de 42,8 g/L), mas utilizando *Pachysolen tannophilus* como agente biológico, foram reportadas as seguintes variáveis de resposta: concentração final de etanol, fator de rendimento em etanol e produtividade volumétrica de 19 g/L, 0,33 g/g e 0,53 g/L.h, respectivamente (CHENG *et al.*, 2008). Dentre estes valores, só a produtividade apresentou-se superior ao valor obtido no presente trabalho, mas deve-se ressaltar que os autores utilizaram processos de destoxificação prévios à fermentação (tratamento térmico para eliminar ácido acético e eletrodiálise para remoção de furfurais).

Nenhum crescimento celular foi observado, na fermentação, como resposta das células para as características do hidrolisado e às condições aplicadas na realização da fermentação, especialmente o suprimento de oxigênio, baixo o suficiente (Q_V=0,02 vvm) para direcionar o metabolismo celular para a produção de etanol, como também foi reportado por Jeffries *et al.* (2007), assim como favorecer uma ótima relação etanol/xilitol.

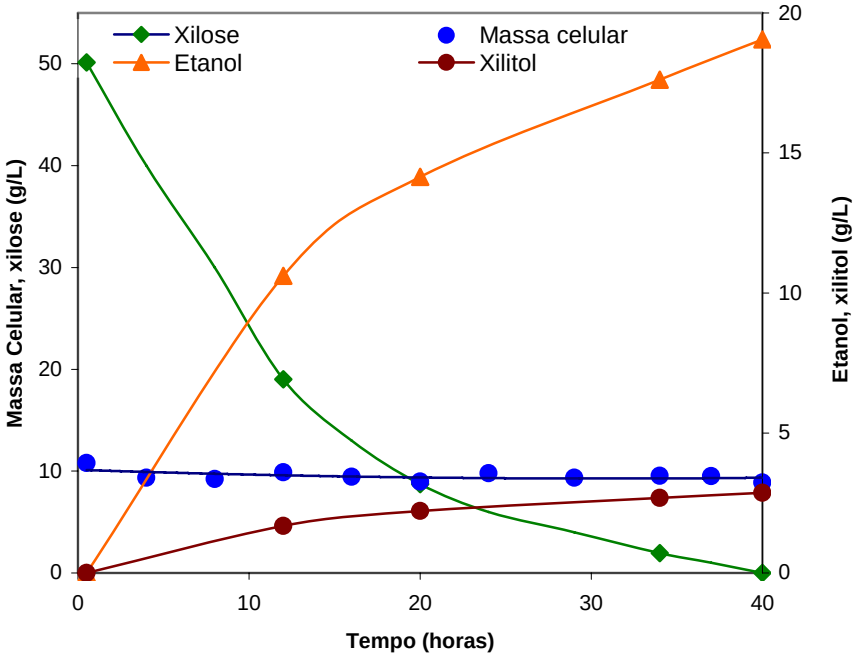


Figura 5.19 Perfil cinético da fermentação de hidrolisado hemicelulósico obtido nas condições preditas na otimização do processo

Durante a fermentação foi também acompanhado o comportamento da concentração dos inibidores (dados não exibidos). No caso do ácido acético e os compostos fenólicos as concentrações mantiveram-se constantes, enquanto o furfural mostrou uma leve diminuição na sua concentração. O hidroximetilfurfural foi o único inibidor que foi esgotado nas primeiras 10 horas do processo, comportamento também observado por Almeida *et al.* (2008), que comprovaram a redução de hidroximetilfurfural por *S. cerevisiae* modificada com o gene da xilose redutase de *P. stipitis*.

No que diz respeito ao sólido resultante do pré-tratamento ácido, denominado celulignina ácida, deve-se destacar que este material residual apresentou um teor aumentado de celulose e lignina, como consequência da extração da fração hemicelulósica. Porém, a caracterização deste material indicou um residual de hemicelulose, como esperado, ao não se aplicarem condições para atingir o 100% de extração dos açúcares constituintes desta fração (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 Composição básica da celulignina ácida (fração sólida) gerada após pré-tratamento do bagaço nas condições preditas

Fração	Teor (%) ± DP
Celulose	47,14 ± 2,13
Hemicelulose	7,86 ± 0,14
Lignina	22,84 ± 0,49
Cinzas	2,60 ± 0,08
Extrativos	15,55 ± 1,07

DP: desvio padrão.
Valores reportados em massa seca de material

Em resumo, a aplicação das condições otimizadas do pré-tratamento resultou na obtenção de um hidrolisado com melhores características de fermentabilidade, levando a um maior aproveitamento da pentose proveniente da hemicelulose, apesar de uma concentração de etanol levemente inferior, de 19,0 g/L para condições otimizadas de pré-tratamento, em contraste com 25,1 g/L com hidrolisados obtidos nas condições inicialmente avaliadas (Item 5.4). Assim, quando comparada a fermentação apresentada na Figura 5.19 com os primeiros ensaios de fermentação realizados (Figura 5.7), destacou-se uma redução no tempo de processo de 10 horas, passando de 50 para 40 horas; esgotamento total do substrato, indicando maior fermentabilidade do hidrolisado; manutenção da produtividade volumétrica, passando de 0,50 g/L.h para 0,47 g/L.h, e com um rendimento em produto por substrato consumido similar, 0,35 g/g para 0,38 g/g.

5.6 FERMENTAÇÕES SEQUÊNCIAIS UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

As Figuras 5.20 (a e b) apresentam os perfis cinéticos para fermentações sequênciais com reutilização de células. No processo representado na Figura 5.20a, as células foram re-utilizadas sem aplicar nenhum tratamento entre as fermentações, enquanto no processo representado na Figura 5.20b, foi aplicada a técnica Melle-Boinot entre cada fermentação.

Para ambos os experimentos foi possível constatar uma manutenção da capacidade fermentativa das células nas duas primeiras fermentações, obtendo-se um fator de rendimento em etanol de, aproximadamente, 0,4 g/g e concentrações finais de etanol próximas a 20 g/L. Porém, em ambos experimentos, a segunda fermentação precisou de um tempo maior para o

esgotamento do substrato, a xilose, e com isto observou-se uma diminuição na produtividade volumétrica em etanol.

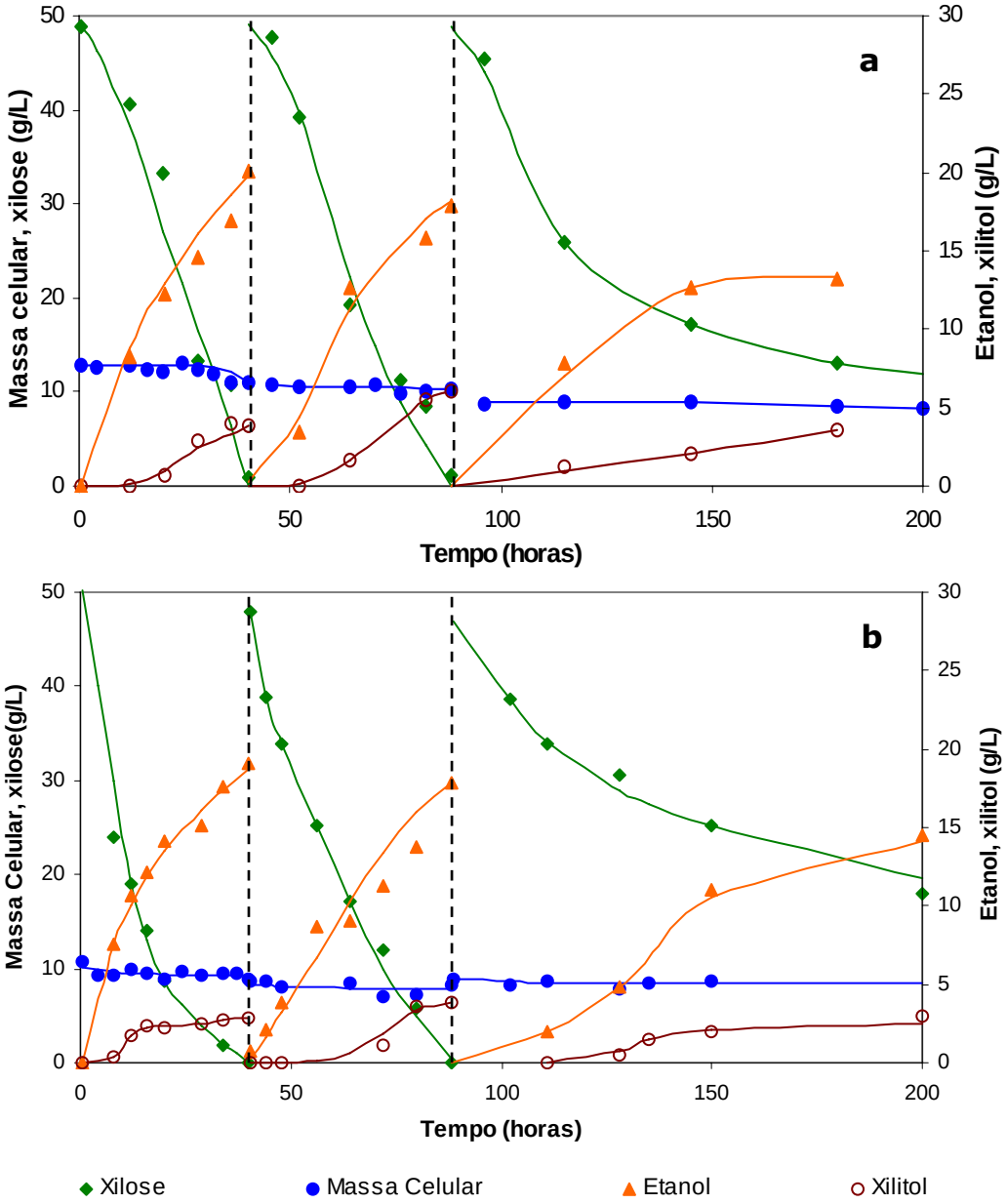


Figura 5.20 Perfis cinéticos de fermentações sequênciais utilizando hidrolisado hemicelulósico obtido nas condições preditas pela otimização e com reutilização direta de células (a) ou aplicando a metodologia Melle-Boinot entre cada fermentação (b)

O terceiro ciclo fermentativo sequencial, para ambos experimentos, mostrou-se mais lento, apresentando baixa concentração final de etanol e uma concentração de xilose residual elevada. Neste último estágio o processo levou

um tempo maior (o dobro da primeira fermentação), reduzindo, consequentemente, a produtividade do processo (Tabela 5.13). Por outro lado, o fator de rendimento em etanol foi mantido, destacando-se o aumento do mesmo no caso da terceira fermentação, quando aplicado o método de reativação celular.

Tabela 5.13 Parâmetros cinéticos mais relevantes em fermentações sequênciais com hidrolisado hemicelulósico re-utilizando as células

Parâmetros	Fermentações com reutilização celular direto			Fermentações com reutilização celular aplicando Melle-Boinot		
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª
Tempo (h)	40	48	90	40	48	110
Etanol (g/L)	20,1	18,1	13,2	18,7	17,8	14,5
Rendimento em etanol (g/g)	0,42	0,37	0,37	0,40	0,36	0,45
Produtividade em etanol (g/L.h)	0,50	0,38	0,16	0,50	0,37	0,13
Xilitol (g/L)	3,3	5,0	3,0	2,9	3,8	2,5
Xilose residual (g/L)	0,3	1,0	12,9	0,3	0,0	18,0
Massa celular (g/L)	11,0	10,0	8,5	9,4	7,8	8,5

A diminuição no desempenho da levedura após o contato prolongado com hidrolisado hemicelulósico, pode ser interpretado como decorrente da inibição do microrganismo. Para leveduras, tem sido reportada a capacidade de tolerar a presença de furanos, após adaptação, por períodos não maiores de 48 horas. O contato prolongado com estes inibidores promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e estas, por sua vez, afetam progressivamente várias estruturas celulares, principalmente, as mitocôndrias, assim como o processo respiratório (ALLEN *et al*., 2010).

A impossibilidade de se realizar um número significativo de fermentações sequênciais pode ser devido a duas questões principais: crescimento celular desprezível em cada uma das fermentações, o que não permitiu uma renovação celular, levando à reutilização de células "velhas"; e um efeito inibitório incrementado na medida em que as células foram transferidas de um meio com hidrolisado fermentado a um novo com a mesma carga de inibidores.

Adicionalmente, deve-se considerar que as condições definidas para a aplicação da metodologia de Melle-Boinot (tempo e pH de contato) foram desenvolvidas para a reutilização de *S. cerevisiae* em meios sacarificados, sendo possível que, quando aplicadas em uma outra levedura (*P. stipitis*) para a

fermentação de um tipo de açúcar diferente (xilose), não reproduzam a reativação reportada para *S. cerevisiae*. Porém, cabe a possibilidade de existirem outras condições que permitam um melhor desempenho de *P. stipitis* na fermentação sequêncial de hidrolisados hemicelulósicos.

A diminuição na eficiência no desempenho das células, com poucos ciclos de fermentação, sinaliza como pouco viável a realização de fermentação contínua, utilizando hidrolisado hemicelulósico, como estratégia para aprimorar o aproveitamento da fração hemicelulósica. Neste sentido, torna-se necessário direcionar a investigação para processos que permitam a obtenção de meios fermentados com maiores concentrações de etanol, minimizando o contato prolongado das células com o hidrolisado.

5.7 ESTUDOS PRELIMINARES PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL EM UM SISTEMA DE HIDRÓLISE E CO-FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS

Como descrito no capitulo 4, este processo propõe a realização, em um único equipamento e de forma simultânea, da fermentação de pentoses, a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação de glicose, sendo realizadas, separadamente, a hidrólise de hemicelulose e a produção de celulases. Adicionalmente, o processo visa à obtenção de meios fermentados com alto teor de etanol em curto tempo.

Nesse sentido, programou-se a realização deste tipo de processo utilizando a levedura *P. stipitis* ou uma combinação dela com *S. cerevisiae*. Porém, fez-se necessário o desenvolvimento de alguns ensaios que permitissem determinar o potencial da levedura, assim como as condições e forma mais apropriada para a realização do referido processo. Os experimentos realizados com este objetivo são apresentados a seguir.

5.7.1 Tolerância da levedura *P. stipitis* ao etanol durante o processo de fermentação

Para quantificar a capacidade real da levedura para a produção de etanol, foram realizadas diferentes fermentações em biorreator, empregando-se meio sintético e utilizando glicose ou xilose como substrato, em quantidades suficientes para produzir altas concentrações de etanol (equivalentes às obtidas

em processos industriais de etanol de primeira geração), além de avaliar diferentes modos de condução destas fermentações.

Na Figura 5.21 apresenta-se o perfil cinético da fermentação conduzida em batelada simples e meio sintético, utilizando como único substrato a glicose (a) ou a xilose (b), ambas com concentração inicial de substrato de 180 g/L.

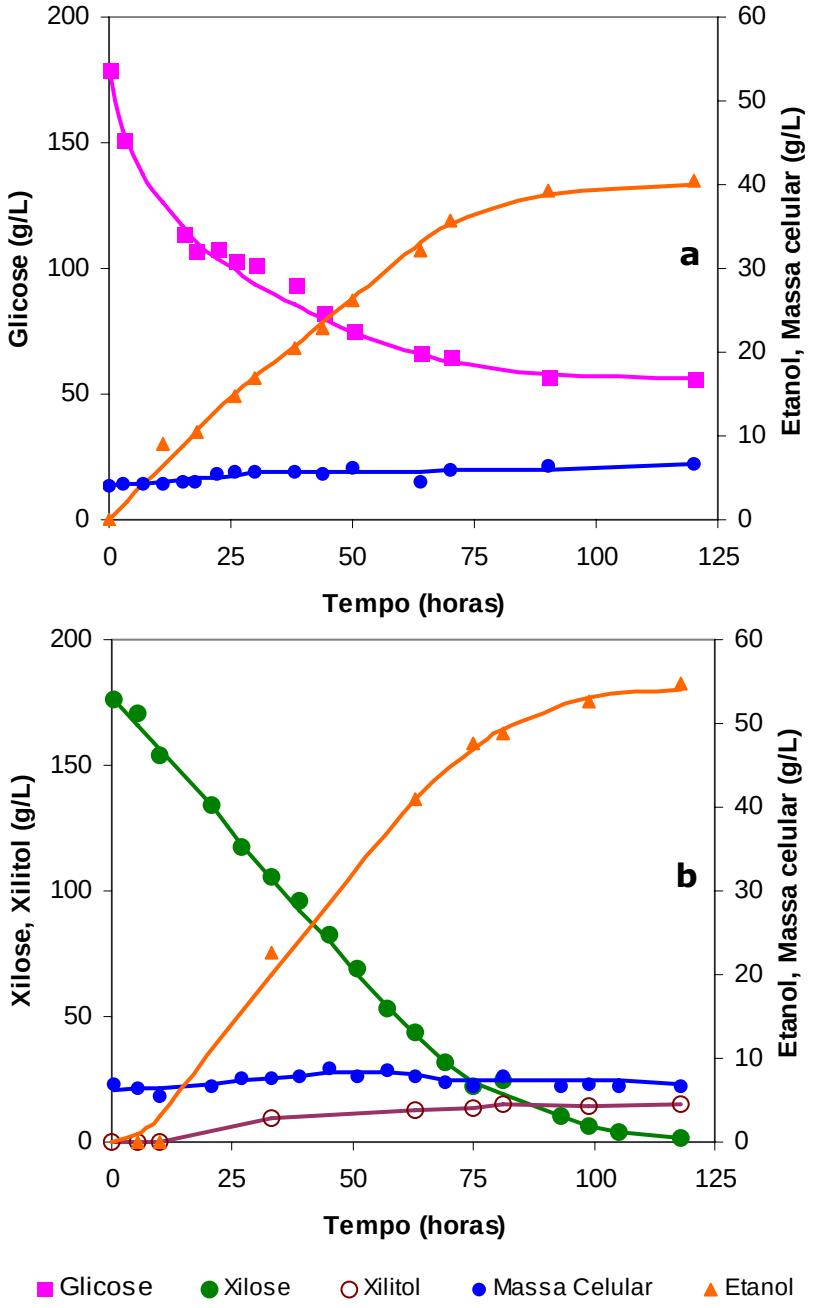


Figura 5.21 Perfis cinéticos de fermentações com *P.stipitis* realizadas em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm) utilizando glicose (a) ou xilose (b) como fontes de carbono

Na fermentação utilizando glicose evidenciou-se uma estabilização na concentração do substrato quando atingida uma concentração próxima a 40 g/L de etanol, apresentando uma concentração residual desse substrato de 58 g/L decorridas 90 horas de fermentação. Esta estabilização do processo, mesmo com a presença de substrato, pode ser decorrente de uma inibição da levedura pelo produto principal (etanol). No caso da utilização de xilose como substrato, foi possível atingir uma concentração de etanol da ordem de 55 g/L com um consumo total desta pentose e um acúmulo de xilitol de 14,7 g/L, após 120 horas de fermentação. Com estes resultados, poder-se-ia afirmar que a presença de xilitol no meio possibilitou um aumento na tolerância da levedura ao etanol, sendo esse composto um reconhecido soluto compatível (HOHMANN, 2002), contribuindo para a viabilidade da célula em resposta à hostilidade do meio ambiente, neste caso, as altas concentrações de xilose e etanol, moderadamente superior à observada na fermentação de glicose.

A taxa de consumo de substrato, durante as primeiras 15 horas de processo, mostrou-se marcadamente superior para glicose (4,37 g/L.h) quando comparada à xilose (2,05 g/L.h), apresentando, adicionalmente, um leve crescimento celular apenas no processo suplementado com glicose. Este comportamento diferenciado, para cada tipo de substrato, foi também observado por Agbogbo *et al.* (2006), em meio sintético com uma concentração inicial de substrato de 60 g/L, sendo relacionado com a maior complexidade do sistema de transporte de xilose (KRAHULEC *et al.*, 2010) e ao requerimento de um controle mais rigoroso para a sua utilização, dada a maior complexidade do metabolismo. Contudo, na fermentação de glicose, a partir das 15 horas de processo, a taxa de consumo de substrato decresce até a estabilização da concentração do substrato, enquanto no processo utilizando xilose, a taxa de consumo de substrato manteve-se constante até as 75 horas de processo, quando esta pentose começou a se esgotar e a se estabilizar a concentração de etanol.

Considerando-se a possibilidade de inibição da levedura pela alta concentração inicial de substrato durante as fermentações conduzidas em batelada simples, outra forma de condução foi realizada, a batelada alimentada por pulsos (Figura 5.22), visando reduzir esses efeitos inibitórios.

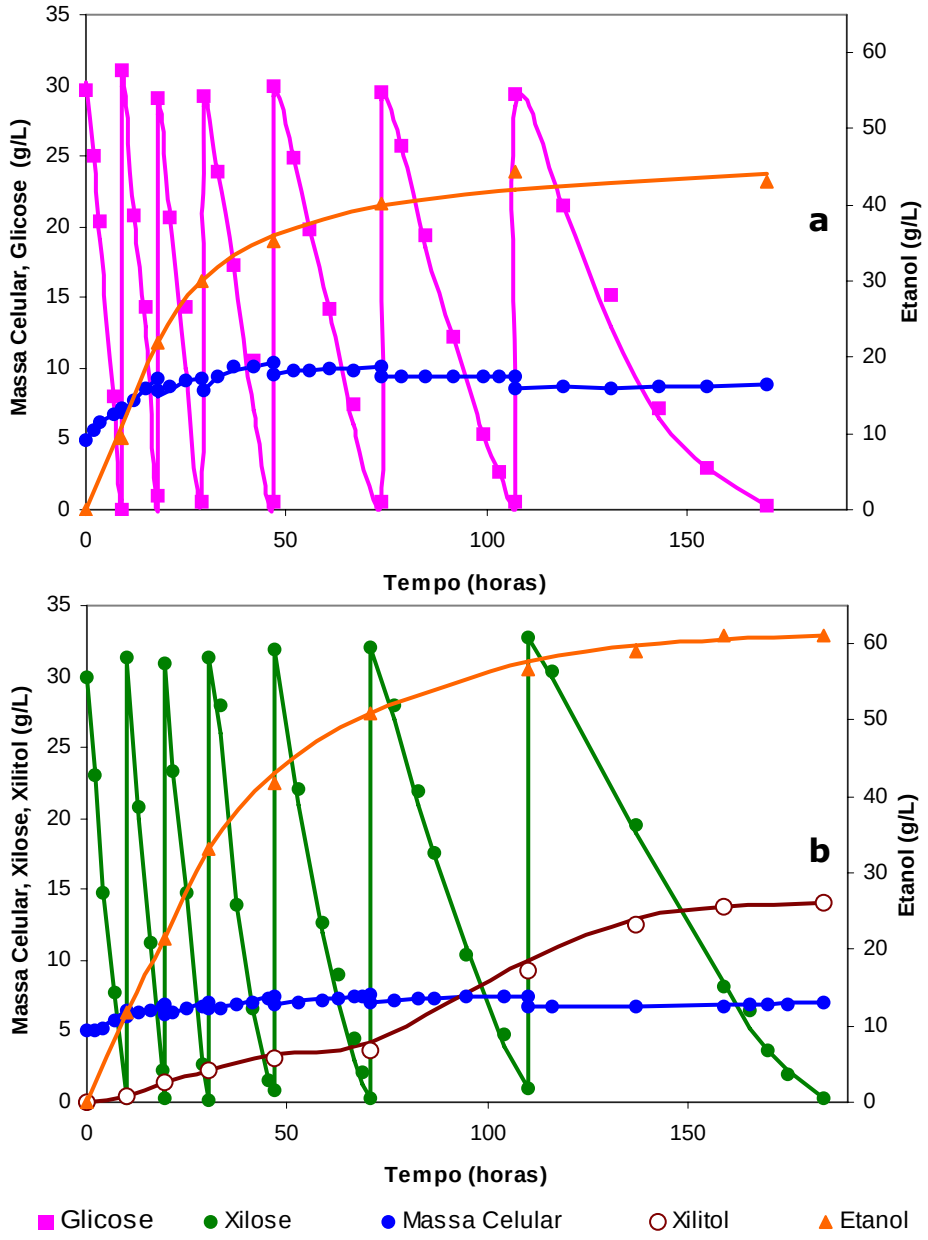


Figura 5.22 Perfis cinéticos de fermentações com *P.stipitis* realizadas em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm) e conduzidas em batelada alimentada por pulsos, utilizando glicose (a) ou xilose (b) como fontes de carbono

Durante os primeiros pulsos de alimentação foi possível observar uma rápida taxa de consumo de substrato, sendo a taxa média de consumo de glicose levemente superior (2,78 g/h), quando comparada com a observada para xilose (2,59 g/h). Nos pulsos subsequentes, a taxa de consumo decaiu gradativamente, passando de 1,70 g/h no quarto pulso, para 0,63 g/h no sétimo pulso, quando utilizada glicose, e de 1,83 g/h no quarto pulso, para 0,50 g/h no sétimo pulso, quando utilizada xilose.

Nestes ensaios, o maior crescimento celular foi observado na fermentação realizada com glicose como fonte de carbono, com uma taxa média de crescimento da ordem de 0,22 g/h, nas primeiras duas alimentações, reduzindo-se para 0,10 g/h nas terceira e quarta, enquanto foi muito menor nas últimas três alimentações (< 0,03 g/h). Quando utilizada xilose, como fonte de carbono, a taxa de crescimento celular não superou 0,12 g/h, nas primeiras três alimentações, manteve-se abaixo de 0,05 g/h na quarta e quinta e foi praticamente zero nas duas últimas (< 0,01 g/h).

Quando realizada a fermentação com xilose, foi possível observar o acúmulo moderado de xilitol, alcançando 4,2 g/L ao final do quinto ciclo, e seu marcado aumento, a partir do sexto ciclo, até atingir uma concentração final três vezes maior (14,0 g/L). Este aumento expressivo de xilitol presente no meio durante os últimos dois ciclos do processo, foi coincidente com a estabilização na produção de etanol a partir de 50 g/L, indicando a estreita relação entre a capacidade da levedura em tolerar etanol e o efeito que altas concentrações deste produto têm no metabolismo do microrganismo.

O modo de condução de processo em batelada alimentada permitiu a obtenção de concentrações finais de etanol superiores às obtidas quando realizado o processo em batelada simples, indicando uma possível inibição pelo substrato, que pode ter mascarado o verdadeiro nível de tolerância da levedura à concentração de etanol como produto de fermentação. Esta inibição pode ser confirmada ao se observarem menores valores para a produtividade e da taxa de consumo de substrato durante a batelada simples (0,52 g/h e 1,64 g/h, respectivamente), quando comparados com os obtidos durante a batelada alimentada (1,00 g/h e 2,59 g/h, respectivamente). Considerando-se uma possível inibição pelo substrato, inclusive com concentrações de substrato da ordem de 30 g/L, foi realizada uma fermentação conduzida com alimentação contínua, na qual o substrato não superasse 5 g/L (Figura 5.23). Nesta fermentação foi possível atingir uma concentração final de etanol de 57,2 g/L, após 105 horas de processo, similar à alcançada no mesmo tempo durante a batelada alimentada por pulsos (56,5 g/L).

Contudo, durante o processo conduzido com alimentação contínua, a taxa de produção de etanol manteve-se constante (0,85 g/h) por mais tempo (60 horas aproximadamente) seguida de uma rápida desaceleração e estabilização da concentração de etanol, enquanto no processo conduzido com alimentação

por pulsos, a taxa de produção inicial de etanol manteve-se constante por um tempo menor (30 horas aproximadamente), mas a desaceleração posterior foi menos acentuada. Esta similaridade nos valores iniciais para a produtividade, da mesma forma que os observados para a taxa de consumo de substrato (2,59 g/h e 2,19 g/h para batelada alimentada por pulsos e batelada alimentada continuamente, respectivamente), descartam a inibição da levedura pelo substrato para concentrações menores que 30 g/L.

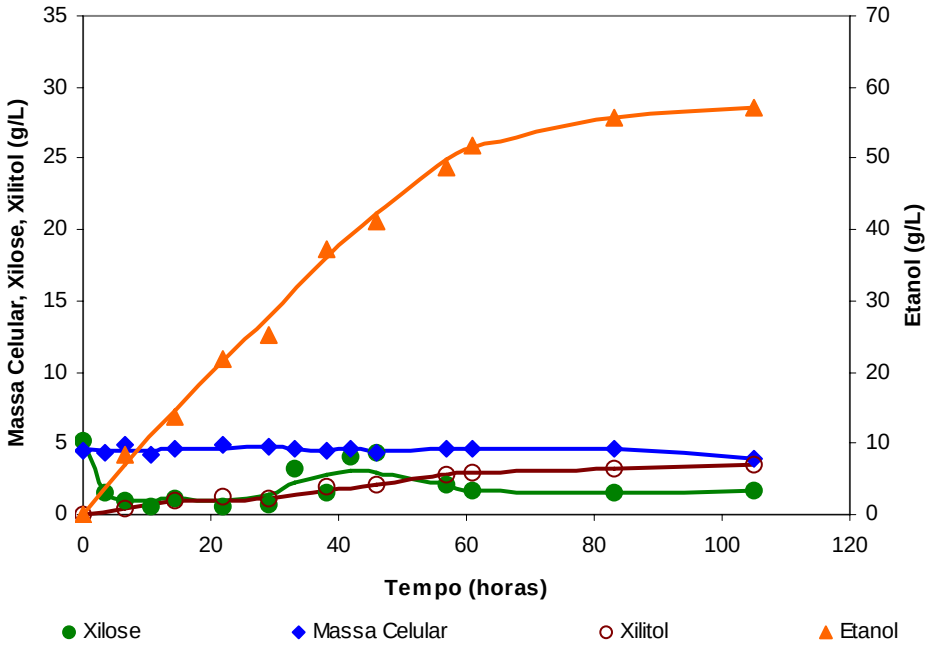


Figura 5.23 Perfil cinético de fermentação com *P.stipitis* realizada em biorreator (250 rpm, 30ºC, pH 6 e 0,02 vvm) e conduzida em batelada alimentada continuamente, utilizando xilose

Quanto à concentração de xilitol, foi verificado um acúmulo menor para a fermentação com alimentação contínua, observando-se uma estabilização aparente em 2,1 g/L e uma concentração de etanol de 41 g/L, decorridas 46 horas de processo, e um ligeiro aumento com estabilização próxima de 3,0 g/L, nas seguintes 10 horas de processo.

Determina-se assim, uma concentração próxima a 60 g/L como a máxima possível para fermentação alcoólica com *P. stipitis* quando utilizada xilose como substrato, sendo o xilitol um coadjuvante indispensável, mesmo em baixas concentrações, para possibilitar alcançar este patamar, agindo, provavelmente, como protetor da célula contra a hostilidade do meio.

5.7.2 Crescimento de *Pichia stipitis* em meio sintético contendo xilose e glicose

Um dos fenômenos a ser desvendado para o desenvolvimento de um processo consolidado utilizando *P. stipitis*, refere-se ao comportamento da levedura em um meio que tem as duas fontes de carbono, glicose e xilose, em proporções similares. Com o objetivo de visualizar este fenômeno, foram realizados diferentes experimentos, nos quais se tencionou determinar como a levedura conseguiria se desenvolver segundo o meio utilizado para a obtenção do inóculo e ao suprimento (facilitado ou limitado) de oxigênio nesses dois substratos, em concentrações de 20 g/L quando utilizadas como únicas fontes, ou a mistura xilose-glicose (10 g/L cada). Deve-se ressaltar que a condição denominada de anaerobiose foi induzida pelo uso de fermentômetros, existindo, no início do processo, uma pequena quantidade de oxigênio no sistema e, com o passar do tempo, devido ao seu consumo e à produção de dióxido de carbono, proporciona ao sistema tal condição.

Nos diferentes experimentos foi possível observar o maior crescimento da levedura quando utilizado um processo em condições de aerobiose, como esperado, ao ser favorecida a oxidação total do substrato (Figura 5.24) fundamentalmente para a plasticidade celular. Assim, quando utilizada glicose como fonte de carbono no processo de fermentação, a concentração celular foi 3,5 vezes maior em aerobiose do que em anaerobiose, sendo o comportamento similar para todos os substratos avaliados e as diferentes estratégias aplicadas para a obtenção do inóculo.

O menor crescimento celular foi alcançado quando utilizada xilose como única fonte de carbono, para todos os tipos de inóculos testados e cada uma das condições de aeração. Deve-se também mencionar como a fonte de carbono utilizada para a propagação de células influenciou de forma diferenciada o comportamento do microrganismo durante a fermentação das diferentes fontes testadas. Por exemplo, quando o meio para crescimento de inóculo continha duas fontes de carbono (mistura glicose-xilose) observou-se um desenvolvimento do microrganismo maior, em condições de aerobiose, na fermentação contendo esta mistura do que quando utilizada xilose ou glicose como únicas fontes de carbono.

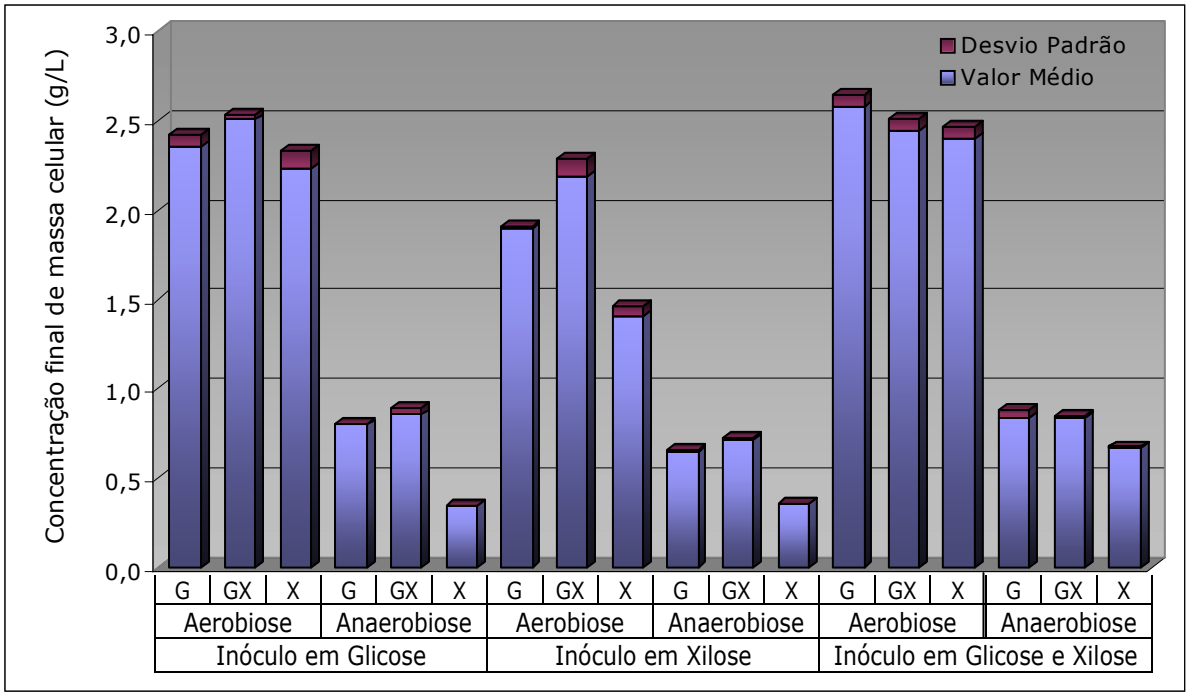


Figura 5.24 Concentração final de células (*P. stipitis*) após 24 horas de fermentação utilizando diferentes substratos em uma concentração inicial de 20 g/L
G: glicose; X:xilose; GX: mistura 1:1 glicose-xilose;
Aerobiose: refere-se a transferência de oxigênio facilitada;
Anaerobiose: refere-se a sistema acoplado a fermentômetros.

Visando-se o desenvolvimento de um bioprocesso consolidado a obtenção do inóculo deve ser planejada em função da proporção de açúcares no meio e, assim, facilitando o processo de fermentação. Por isto, poder-se-ia sinalizar a obtenção de inóculo em meio contendo ambas as fontes (glicose-xilose).

No que diz respeito à concentração de etanol, ao final de 24 horas de fermentação (Figura 5.25), pode-se verificar que os inóculos crescidos em xilose ou na mistura glicose-xilose permitiram alcançar as maiores concentrações finais de etanol. Destacaram-se como as melhores fermentações, em relação ao teor de etanol, aquelas realizadas com inóculo obtido utilizando xilose, aplicando condições não restritivas de oxigênio com as fontes de carbono glicose ou a mistura glicose-xilose.

Cabe ressaltar a marcada diferença na concentração de etanol nas fermentações realizadas utilizando xilose como único substrato e com inóculo obtido em glicose, em ambas as avaliadas, sendo os resultados mais baixos observados.

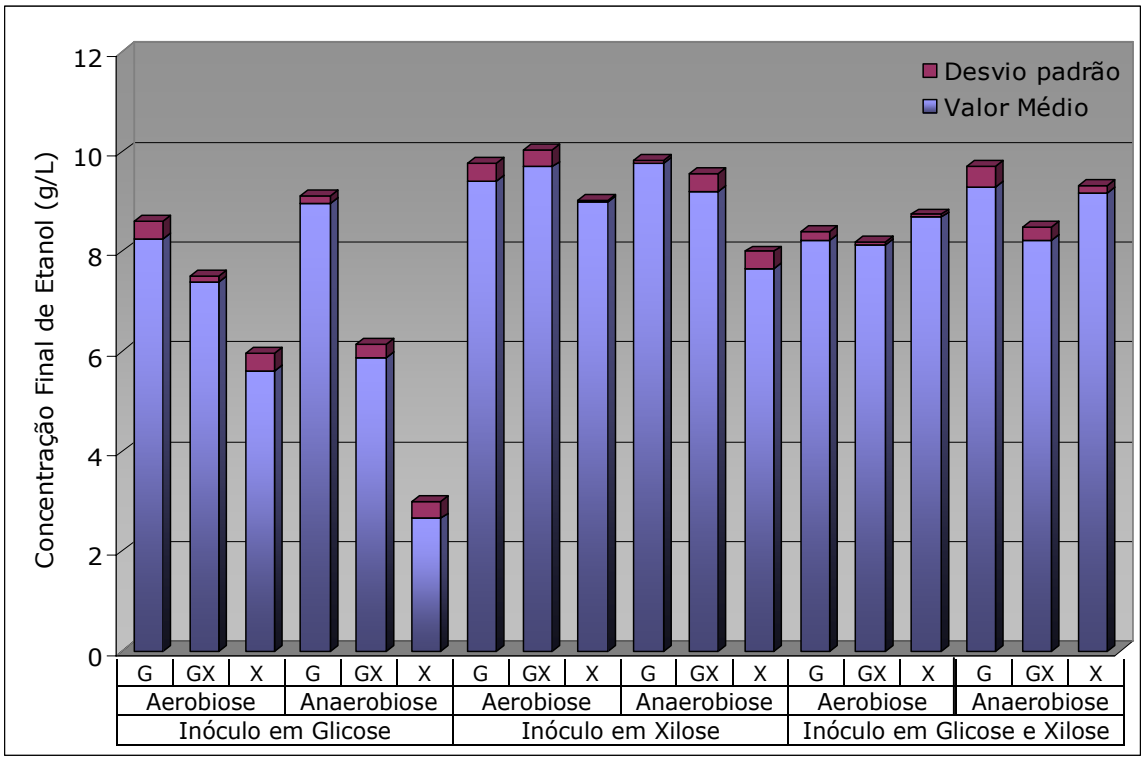


Figura 5.25 Concentração final de etanol após 24 horas de fermentação com *P. stipitis* utilizando diferentes substratos em uma concentração inicial de 20 g/L
G: glicose; X:xilose; GX: mistura 1:1 glicose-xilose;
Aerobiose: refere-se a transferência de oxigênio facilitada;
Anaerobiose: refere-se a sistema acoplado a fermentômetros.

A utilização de glicose como fonte de carbono, para a obtenção do inóculo, favoreceu o crescimento celular em detrimento da produção de etanol. De forma contrária, inóculos obtidos utilizando xilose ou a mistura glicose-xilose, favoreceram a produção de etanol com um menor crescimento celular. Este comportamento foi também observado em *S. cerevisiae* modificada para metabolizar xilose pela expressão heteróloga da enzima xilose redutase (KRAHULEC *et al.* 2010).

Em termos gerais, pode-se afirmar que os ensaios resultaram no consumo total dos substratos, exceto naqueles em que o meio de propagação para obtenção do inóculo possuía uma fonte de carbono diferente à utilizada na fermentação (Figura 5.26), observando-se uma possível inibição ao consumo de xilose em células crescidas em glicose. Neste caso, destaca-se a fermentação realizada em xilose e condições de anaerobiose, utilizando células crescidas em glicose, que apresentou a maior concentração residual de substrato no meio após as 24 horas de processo.

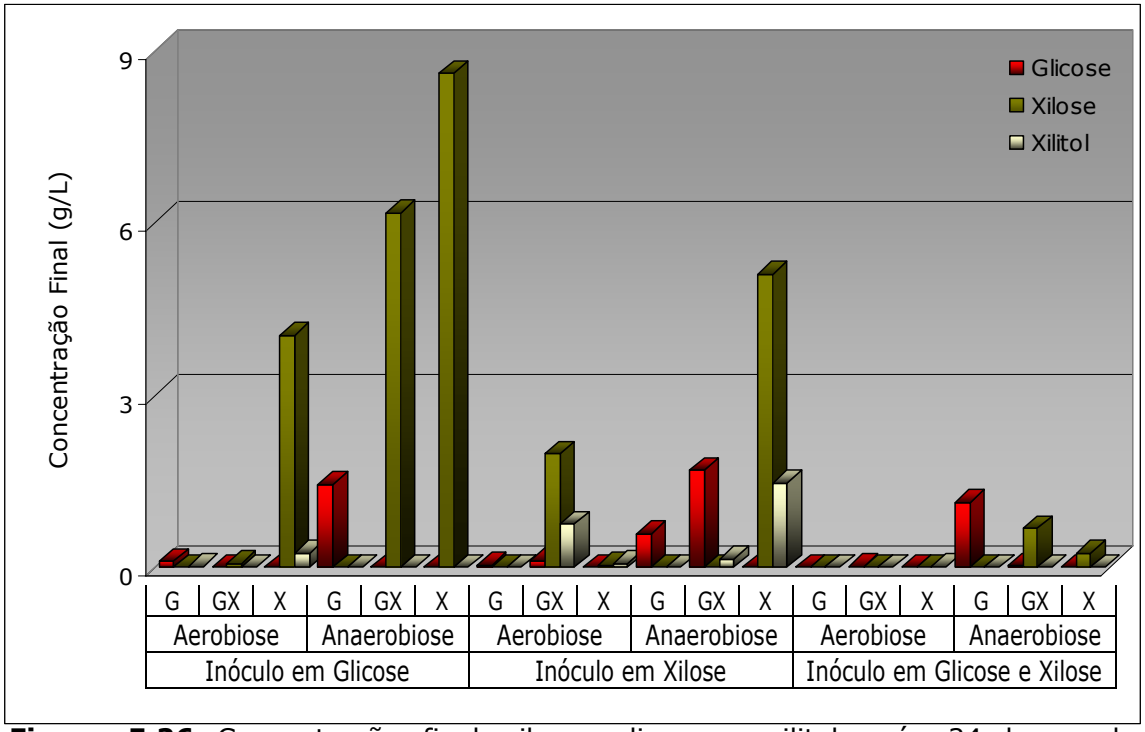


Figura 5.26 Concentração final xilose, glicose e xilitol após 24 horas de fermentação com *P. stipitis* utilizando diferentes substratos em uma concentração inicial de 20 g/L
G: glicose; X:xilose; GX: mistura 1:1 glicose-xilose;
Aerobiose: refere-se a transferência de oxigênio facilitada;
Anaerobiose: refere-se a sistema acoplado a fermentômetros.

A presença de oxigênio mostrou-se fundamental para a utilização da xilose como substrato, sendo observado um residual do carboidrato após 24 horas de fermentação nos processos com restrição de oxigênio, principalmente quando as células eram provenientes de inóculos sem esta pentose. Contrariamente constatou-se um consumo total de substrato em quase todos os processos realizados em aerobiose, sempre que a mesma fonte de carbono tivesse sido utilizada para a obtenção do inóculo.

O comportamento observado para a levedura *P. stipitis* sinalizou a impossibilidade do uso de condições de anaerobiose, inclusive quando a glicose foi o único substrato, e a necessidade do crescimento de inóculo em xilose ou na mistura glicose-xilose quando se pretende fermentar misturas de glicose e xilose, como preconizado em um processo de co-fermentação dos açúcares provenientes das frações polissacarídeas do bagaço de cana-de-açúcar. Pode-se, assim, programar o crescimento da levedura em hidrolisado hemicelulósico como etapa preliminar à co-fermentação de glicose e xilose.

5.7.3 Avaliação da hidrólise enzimática de celulose e co-fermentação simultâneas utilizando *P. stipitis*

Para o desenvolvimento deste experimento, utilizaram-se as condições estabelecidas por Vasquez (2007), no entanto, usando, como agente biológico para o processo SSF, a levedura *P. stipitis* no lugar de *S. cerevisiae*. Assim, um primeiro experimento foi realizado utilizando tampão citrato como diluente no processo SSF, como descrito para processos utilizando *S. cerevisiae*, alterando-se, apenas, a temperatura de processo, de 37ºC para 30ºC, para favorecer a ação da levedura *P. stipitis*, mesmo que se reduzisse a taxa de hidrólise da celulose. Em outro experimento, utilizou-se hidrolisado hemicelulósico obtido nas condições estabelecidas na otimização do pré-tratamento como diluente do processo SSF, estando presentes tanto a glicose, proveniente da hidrólise enzimática da celulose, quanto a xilose, proveniente do pré-tratamento ácido do bagaço de cana. Na Figura 5.27 são apresentados os perfis correspondentes a estes experimentos.

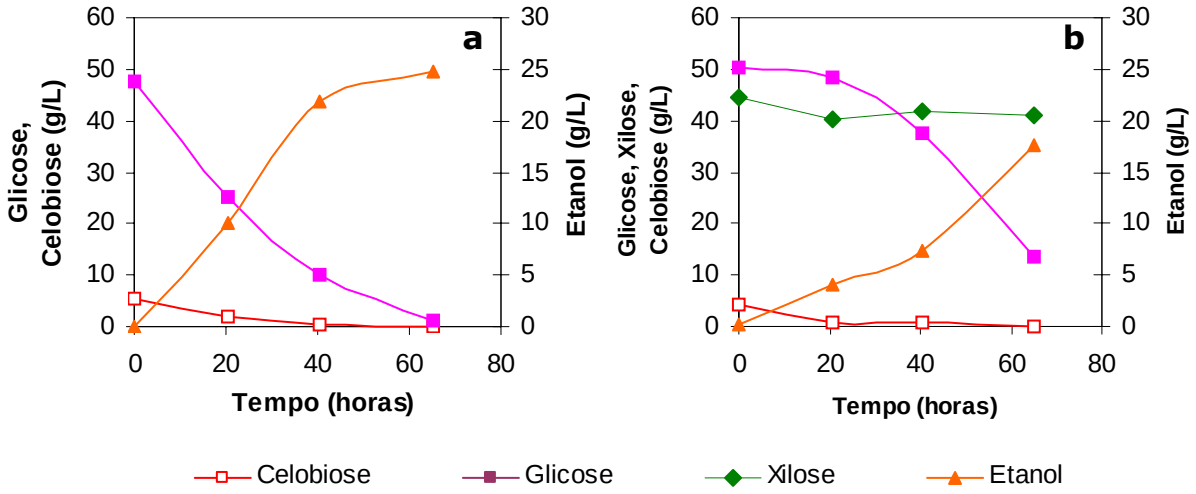


Figura 5.27 Desempenho da levedura *P. stipitis* em processos SSF utilizando tampão citrato (a) e SSCF utilizando hidrolisado hemicelulósico (b)
Experimentos realizados em frascos cônicos de 500 mL com um volume de trabalho de 200 mL, 200 rpm, 30ºC e pH inicial de 4,8.

Quando se utilizou tampão citrato no processo SSF foi possível atingir uma concentração final de etanol de 24,7 g/L, em um tempo de processo de 65 horas, demonstrando a inferioridade da levedura *P. stipitis* sobre *S. cerevisiae*, que para as mesmas condições de processo (excetuando-se a temperatura que foi de 37ºC

para *S. cerevisiae)* resultou em concentrações finais de etanol acima de 40 g/L, em 32 horas de processo (VASQUEZ, 2007).

No caso do processo SSF, realizado utilizando hidrolisado hemicelulósico como diluente, a levedura *P. stipitis* exibiu baixo desempenho, apesar de ter demonstrado sua habilidade de degradar tanto glicose quanto xilose, alcançando uma concentração final de etanol de apenas 17,7 g/L. Tal processo iniciou com um baixo aproveitamento de xilose e glicose (2,1 g/L e 4,2 g/L, respectivamente, nas primeiras 20 horas) e, posteriormente, a levedura consumiu seletivamente glicose, mas sem esgotar totalmente este substrato.

O comportamento das variáveis durante o processo SSF mostrou-se contrário ao esperado, se considerado o observado com a concentração de substrato nas fermentações com hidrolisado hemicelulósico, nas quais glicose e xilose foram consumidas simultaneamente nas primeiras horas de processo (itens 5.3 e 5.4), sendo este último carboidrato majoritário. Igualmente, o consumo eficiente de glicose e xilose, observado em experimentos realizados em misturas de 10 g/L de cada (item 5.7.2), sinalizou um melhor desempenho da levedura para a co-fermentação desses carboidratos. Neste contexto, poder-se-ia presumir que a levedura *P. stipitis*, em presença de altas concentrações de glicose, apresentou uma inibição no consumo de xilose, mostrando um consumo preferencial pela hexose, como também foi observado por Agbogbo *et al.* (2006) em experimentos em meio sintético contendo 60 g/L de misturas glicose/xilose (25/75 e 75/25). A inibição pelo consumo de xilose em presença de altas concentrações de glicose, também foi reportada por Runquist *et al.* (2010) em *S. cerevisiae* modificada carregando os genes que codificam xilose redutase, xilitol desidrogenase e transportadores seletivos de xilose, oriundos de *P. stipitis*.

5.8 AVALIAÇÃO DO PROCESSO SSF REALIZADO UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO FERMENTADO

Ao se constatar a limitação da levedura *P. stipitis* na co-fermentação de glicose e xilose quando realizado o processo SSF, considerou-se a possibilidade de se realizar um processo no qual fossem fermentadas, separadamente, a xilose e a glicose, porém, de forma sequêncial para aumentar a concentração de etanol no meio fermentado, como proposto por *Fu et al.* (2009). Estes autores utilizaram *Zymomonas mobilis* para a fermentação de glicose e *P. stipitis* para a

fermentação xilose de hidrolisado proveniente de bagaço de cana com concentrações iniciais marcadamente inferiores às utilizadas neste trabalho (32,1 g/L de glicose e 21,4 g/L de xilose).

Ao se observar a menor tolerância ao etanol por *P. stipitis*, quando comparada a *S. cerevisiae* que tolera altas concentrações deste álcool (VASQUEZ *et al.* 2007), e considerando-se a incapacidade de *S. cerevisiae* em metabolizar xilose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2001), faz-se evidente que, para um processo sequêncial, deve-se, inicialmente, fermentar a xilose, utilizando a levedura *P. stipitis* e, posteriormente, utilizar este meio hidrolisado para realizar o processo SSF com a levedura *S. cerevisiae*.

Para verificar o desempenho de *S. cerevisiae* durante o processo SSF em um meio diferente ao tampão citrato, foram realizados diferentes ensaios, a fim de se avaliar o efeito que poderiam ter os componentes típicos do meio de fermentação de hidrolisado hemicelulósico e o próprio hidrolisado hemicelulósico fermentado, como apresentado a seguir.

5.8.1 Efeito dos componentes do meio de fermentação de pentoses no processo SSF

Na Tabela 5.14 são apresentados os resultados de glicose liberada, após pré-hidrólise enzimática de celulose, e etanol equivalente, ao final do processo SSF, para o planejamento experimental realizado, visando determinar o efeito de cada uma das três variáveis independentes escolhidas (hidrolisado, fontes de nitrogênio e oligoelementos). Cabe lembrar que o nível superior (+1) para as fontes de nitrogênio e os oligoelementos corresponde à concentração utilizada para fermentação de hidrolisados, enquanto o nível inferior (-1) corresponde à ausência destes nutrientes.

Quando observada a concentração de glicose, obtida após pré-hidrólise enzimática nos ensaios, notou-se que valores equivalentes, e inclusive superiores, foram obtidos na presença dos componentes avaliados, sem ser identificada nenhuma tendência. Deve-se lembrar que o hidrolisado hemicelulósico aporta uma pequena quantidade de glicose ao sistema (4,8 g/L), justificando os valores de glicose levemente superiores quando este foi incluído nos ensaios.

Tabela 5.14 Resultados para o planejamento experimental desenvolvido para determinar o efeito dos componentes da fermentação de hidrolisado hemicelulósico após 50 horas de processo SSF

Ensaio	Hidrolisado	Fontes de Nitrogênio	Oligoelementos	Glicose após pré-hidrólise enzimática (g/L)	CO_2 liberado (g)	Etanol equivalente (g/L)
1	-1 (0%)	-1	-1	53,6	10,36	54,15
2	1(100%)	-1	-1	60,5	9,08	47,46
3	-1	1	-1	51,3	10,32	53,95
4	1	1	-1	58,0	9,20	48,09
5	-1	-1	1	57,5	10,76	56,25
6	1	-1	1	56,5	9,36	48,93
7	-1	1	1	52,5	10,36	54,15
8	1	1	1	55,2	9,56	49,97
9	0 (50%)	0	0	58,2	10,16	53,11
10	0	0	0	59,0	10,68	55,83
11	0	0	0	59,3	10,40	54,36

As concentrações de etanol equivalente mostraram-se relativamente próximas em todos os ensaios, com valores entre 47 e 56 g/L. Porém, percebeu-se uma tendência nos resultados, sendo os valores abaixo de 50 g/L correspondentes a experimentos realizados com 100% de hidrolisado (ensaios 2, 4, 6 e 8), e valores acima de 53 g/L obtidos no restante dos experimentos. A maior concentração de etanol equivalente (56,2 g/L) foi obtida no experimento realizado sem hidrolisado nem fontes de nitrogênio, mas com oligoelementos nas concentrações utilizadas para fermentação de pentoses (ensaio 5). Estes resultados sinalizaram um possível efeito negativo do hidrolisado no desempenho de *S. cerevisiae* no processo SSF, provavelmente relacionado com suas características inibitórias, e um leve efeito negativo das fontes de nitrogênio, como também reportado por Vasquez (2007), para o processo SSF em tampão citrato suplementado com extrato de levedura.

Na Figura 5.28 apresenta-se o comportamento da concentração de etanol equivalente durante o processo SSF de todos os ensaios. Nesta figura pode ser observado, mais claramente, o efeito negativo do hidrolisado no desempenho de *S. cerevisiae*, como mostrado pelas menores concentrações nos experimentos realizados utilizando 100% hidrolisado (linhas inferiores, como indicado na Figura 5.28).

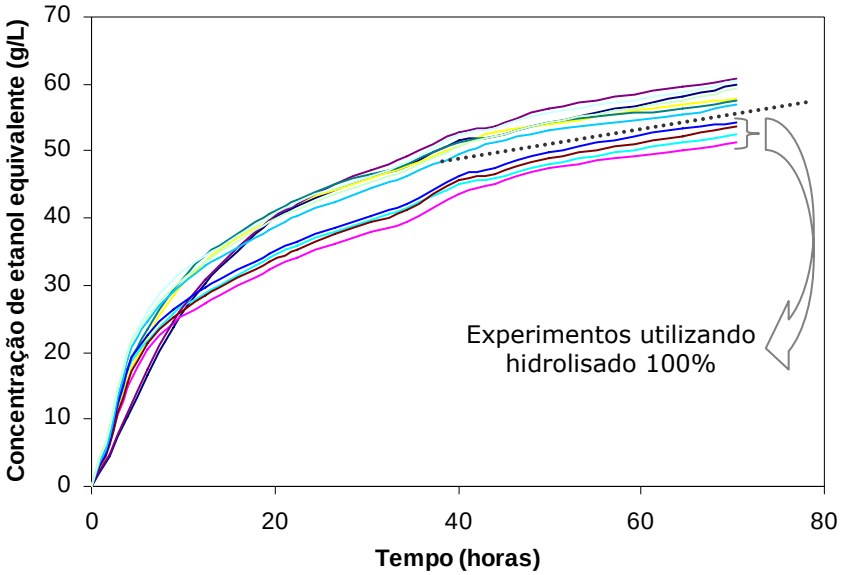


Figura 5.28 Perfil cinético da variação do etanol equivalente durante o processo SSF para avaliação do efeito dos componentes utilizados na fermentação de hidrolisado hemicelulósico

Quando analisada estatisticamente a concentração de glicose, após pré-hidrólise enzimática, foram indicados como significativos o efeito positivo do hidrolisado e negativos para as fontes de nitrogênio e a interação hidrolisado-oligoelementos, como apresentado no diagrama de Pareto da Figura 5.29a. Porém, o efeito positivo do hidrolisado pode estar mascarado pelo seu teor de glicose, mesmo que seja baixo (menor dos 10% da magnitude final observada). Para eliminar esta interferência, um novo diagrama de Pareto foi construído (Figura 5.29b) descontando-se a glicose presente no hidrolisado, considerando-se assim, apenas, a glicose liberada durante a pré-hidrólise enzimática. Neste novo diagrama, observou-se como os efeitos das fontes de nitrogênio e a interação hidrolisado-oligoelementos foram os únicos a apresentar significância estatística, sendo ambos negativos, passando a ser não significativo o efeito do hidrolisado. Estabeleceu-se, assim, que o desempenho das enzimas celulolíticas foi diminuído pela presença das fontes de nitrogênio e, quando presentes simultaneamente, o hidrolisado e os oligoelementos.

Contudo, além dos efeitos apresentarem baixa magnitude, deve-se destacar que a pré-hidrólise enzimática realizada em hidrolisado suplementado, apesar do efeito negativo no desempenho das enzimas, permitiu alcançar

concentrações de glicose comparáveis a processos desenvolvidos em tampão citrato.

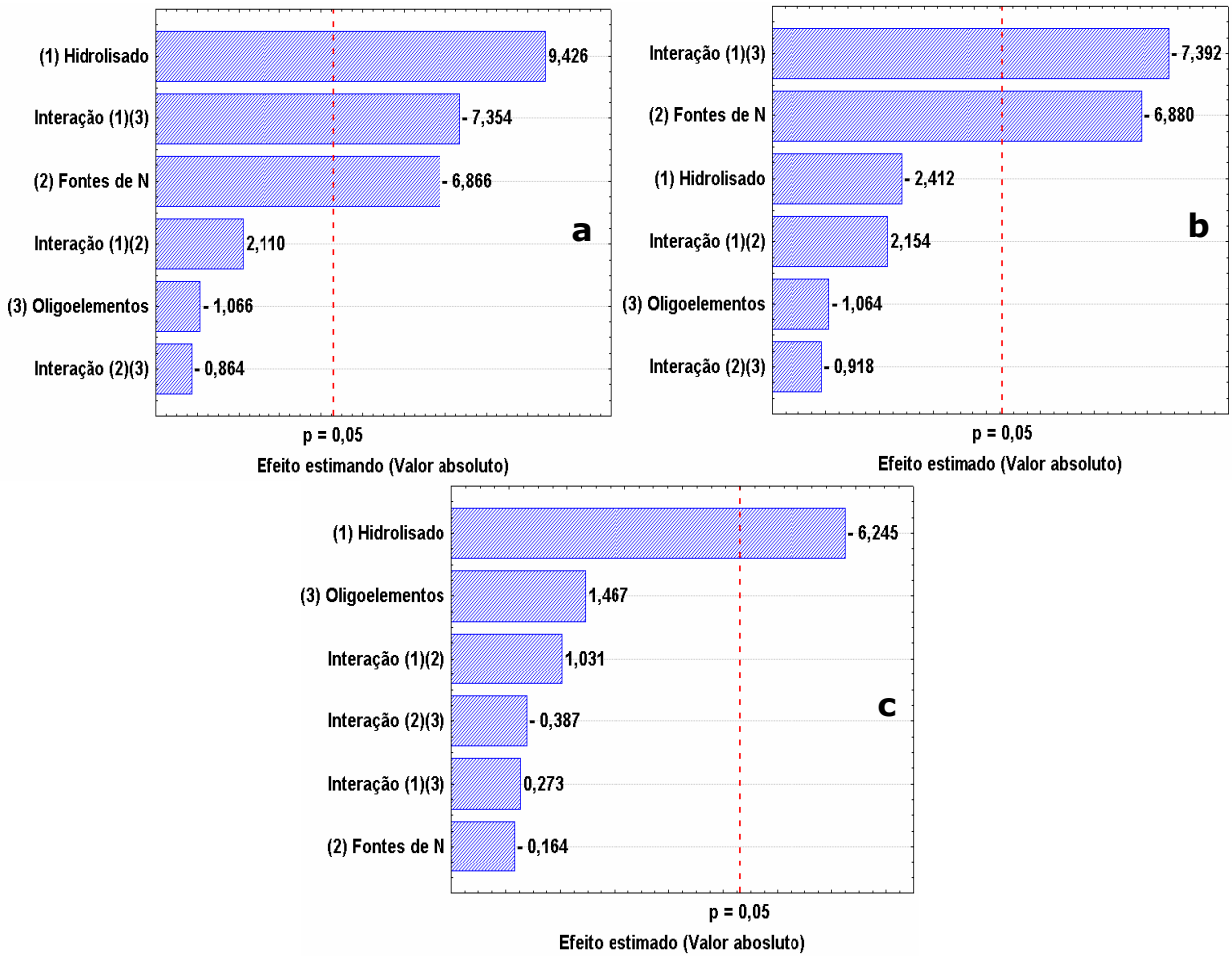


Figura 5.29 Diagramas de Pareto para Glicose total (a), Glicose liberada na pré-hidrólise enzimática (b) e concentração de Etanol equivalente após processo SSF (c).

No caso do processo SSF, a análise estatística confirmou o efeito negativo do hidrolisado na concentração de etanol equivalente, sendo o único efeito que apresentou significância estatística. Porém, a presença do hidrolisado suplementado diminuiu a concentração de etanol equivalente de 54,15 g/L (ensaio 1 em tampão citrato) para 49, 97 g/L (ensaio 8), variação que pode ser compensada se considerado o potencial para produção de etanol (em torno de 20 g/L) a partir da xilose ainda presente.

5.8.2 Efeito do hidrolisado hemicelulósico fermentado no processo SSF

No processo SSF conduzido utilizando hidrolisado hemicelulósico fermentado como fase líquida, foi constatado um efeito negativo, sobre a liberação de CO_2, superior ao observado em experimentos anteriores (item 5.8.1) para hidrolisado não fermentado. Neste caso (processo SSF utilizando hidrolisado hemicelulósico fermentado), concentração de etanol equivalente diminuiu de 53,5 g/L, obtidos utilizando tampão citrato como fase líquida, para 40,2 g/L quando utilizado 100% de hidrolisado fermentado, como pode ser observado na Figura 5.30. Esta variação foi maior em quase 10 g/L à observada quando utilizado meio com hidrolisado sem fermentar (item 5.8.1), indicando como a presença do etanol, e de outros produtos gerados durante a fermentação da xilose, poderiam estar potencializando a inibição da levedura *S. cerevisiae* durante o processo SSF.

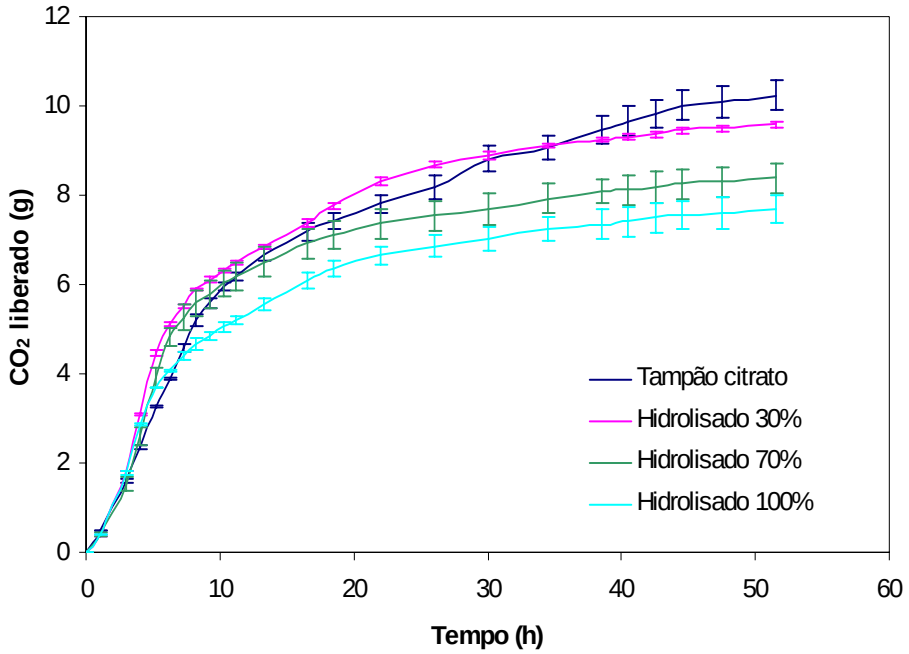


Figura 5.30 Perfil cinético para a liberação de CO_2 durante o processo SSF com *S. cerevisiae* em ensaios com diferentes teores de hidrolisado hemicelulósico fermentado

Contudo, deve-se ressaltar que durante as primeiras 10 horas de processo não foram observadas diferenças marcantes entre os ensaios, sendo esta etapa limitada pela taxa de consumo da levedura em meio com excesso de glicose (Figura 5.30). A partir deste tempo, a glicose no meio começou a se esgotar e a

taxa liberação de CO_2 mostrou-se limitada pela taxa de hidrólise (menor à taxa de consumo da levedura), observando-se, adicionalmente, que o processo desenvolvido com 100% de hidrolisado apresentou uma desaceleração maior na liberação de CO_2, enquanto os ensaios restantes (contendo 0, 30 e 70% de hidrolisado fermentado) continuaram com um comportamento similar até 20 horas de processo. No final do processo, os ensaios em que se utilizaram 0 e 30% de hidrolisado, apresentaram uma concentração de etanol equivalente similar de 53,5±1,7 g/L e 50,1±0,3 g/L, respectivamente, enquanto o processo com 70% de hidrolisado alcançou um valor significativamente menor, 43,8±1,8 g/L.

Quando considerada a concentração de glicose inicial do processo, correspondente à liberada durante a pré-hidrólise enzimática da celulose, o efeito negativo do hidrolisado hemicelulósico fermentado tornou-se evidente, obtendo-se uma concentração de glicose de 45,4 g/L, quase 20 g/L a menos do obtido quando utilizado tampão citrato como fase líquida, como observado nos dados apresentados na Figura 5.31. Este comportamento foi explicado por Chen & Jin (2006), que demonstraram como concentrações de etanol acima de 10 g/L inibiram, reversivelmente, a hidrólise de celulose, apesar de incrementar a atividade de β-glicosidase, justificando a menor concentração de glicose obtida neste trabalho quando utilizado o hidrolisado fermentado. Contudo, o processo SSF, realizado utilizando hidrolisado hemicelulósico fermentado, apresentou a maior concentração final de etanol, correspondente ao etanol já contido no hidrolisado fermentado e ao produzido durante o processo SSF, apesar de ter mostrado a menor quantidade de CO_2 liberado. Destaca-se que neste ensaio verificou-se a presença de glicose residual, denotando que se poderiam atingir concentrações ainda maiores de etanol.

Estes resultados sinalizaram um alto potencial para a realização de um processo, no qual fosse utilizado o sobrenadante resultante da fermentação de hidrolisado hemicelulósico como fase líquida para a realização do processo SSF, visando à produção de etanol e permitindo um aumento da concentração final deste produto. Além disso, se fossem utilizadas condições ótimas que garantissem o aproveitamento total da glicose durante o processo SSF, seria possível alcançar patamares comparáveis com fermentações industriais, e tornar factível, assim, a recuperação do etanol por destilação clássica.

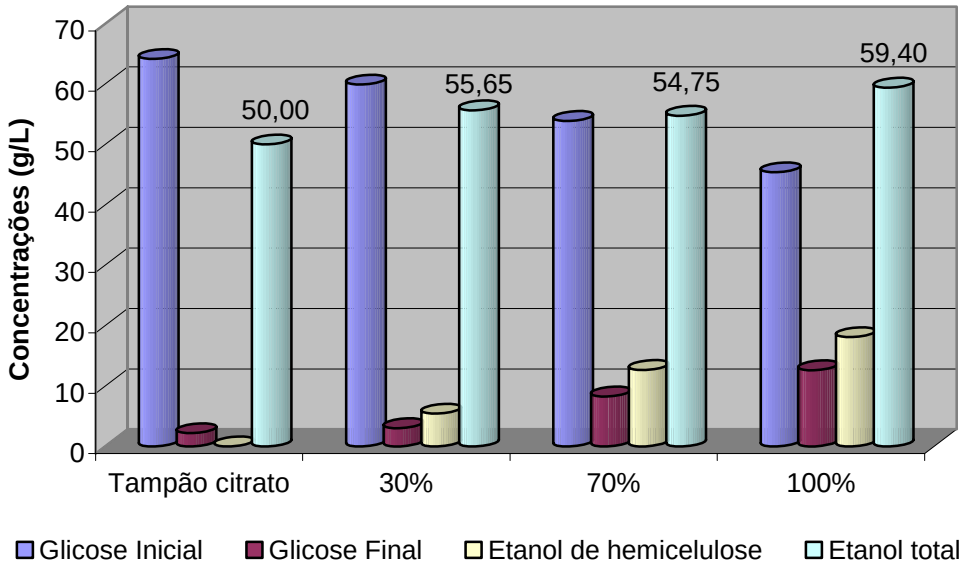


Figura 5.31 Variáveis relacionadas com o processo SSF utilizando diferentes teores de hidrolisado hemicelulósico fermentado

Adicionalmente, deve-se destacar que, esta conjunção de etapas no processo SSF, apresentou outras duas vantagens:

- √ A não necessidade do uso de tampão citrato no processo SSF, que pode representar uma economia considerável quando for escalonado o processo SSF ao nível industrial;
- √ A geração de um volume de vinhoto marcadamente inferior, quando comparado a um processo, no qual fossem destilados, separadamente, os meios fermentados de xilose e glicose.

Em um processo global de aproveitamento de ambas as frações, sendo considerados os tempos de fermentação do hidrolisado hemicelulósico (40 horas) e do processo SSF (51 horas) utilizados neste trabalho, poder-se-ia determinar uma produtividade volumétrica global de 0,65 g/L.h, valor muito próximo do reportado por Fu *et al.* (2009) para as fermentações sequênciais utilizando, na ordem, *Z. mobilis* e *P. stipitis*, mas atingindo uma concentração final de etanol inferior (26,2 g/L).

A concentração final de etanol de 59,4 g/L obtida neste experimento foi, inclusive, superior à reportada em trabalhos recentes (BERTISSON *et al.* 2009), para processos de co-fermentação com microrganismos geneticamente modificados para fermentar xilose (*S. cerevisiae* TMB3400), nos quais, após 96 horas de processo (tempo equivalente à soma dos tempos da fermentação de xilose, pré-hidrólises da celulignina e SSF), foi atingida uma concentração de

etanol de 45 g/L para madeira de pino pré-tratada com ácido 2% (v/v), e aplicando uma carga enzimática marcadamente superior, 35 FPU/g e 359 IU de β-glicosidase (pela combinação dos consórcios enzimáticos Celluclast e Novozyme 188, ambos da Novozymes).

A realização deste trabalho permitiu estabelecer condições, para o pré-tratamento ácido, que geraram um hidrolisado com fermentabilidade melhorada, assim como técnicas mais apropriadas para a obtenção do inóculo. Desta forma, de fermentações que levavam tempos de 60 horas e apresentavam um uso ineficiente do substrato, foi possível atingir tempos de 40 horas com o consumo total do mesmo. Adicionalmente, foram estabelecidas, experimentalmente, as vantagens e desvantagens no uso de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* em processos SSF e SSCF, utilizando hidrolisado fermentado e alcançando altas concentrações finais de etanol.

O uso de técnicas de planejamento experimental e análise estatística foram imprescindíveis, além de práticas, para a obtenção de resultados aprimorados, definitivos, confiáveis e validáveis. Estas técnicas permitiram uma racionalização na realização de experimentos sem comprometer a relevância e precisão de resultados e conclusões.

Em termos gerais, os avanços conseguidos com a realização desta tese, apresentam-se como um grande aporte na procura de se atingir o conhecimento necessário para o aproveitamento de materiais lignocelulósicos visando à industrialização da produção de etanol de segunda geração, sendo esta uma das maiores necessidades da humanidade: fontes alternativas de energia, renováveis, economicamente viáveis e ambientalmente mais amigáveis.

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

- ✓ O bagaço de cana-de-açúcar apresentou uma composição de 38,7 % de celulose, 23,0% de hemicelulose e 22,8% de lignina, mostrando potencial teórico de produção de etanol, a partir das frações polissacarídeas, de 393 L por tonelada de material seco, sendo 37% correspondente ao aproveitamento da fração hemicelulósica;

- ✓ A distribuição granulométrica própria do bagaço, proveniente da moagem de cana-de-açúcar, mostrou-se apropriada à aplicação de pré-tratamento com ácido diluído, visando à extração de hemicelulose, ao se verificar que o processo independe dos diferentes tamanhos de partícula avaliados, sendo desnecessárias etapas físicas para a cominuição do material;

- ✓ A hidrólise da fração hemicelulósica de bagaço de cana-de-açúcar pode ser realizada sem a necessidade de longos tempos de contacto da matriz sólida com a solução ácida, sendo apropriado uma simples aspersão da matriz lignocelulósica com solução ácida seguido de tratamento térmico. Esta técnica

apresenta características mais apropriadas quando considerado o processo industrial;

- ✓ O uso de ácido 1% (v/v) e uma relação sólido:líquido de 1:2 (g:mL), durante o pré-tratamento ácido de bagaço de cana, permitiu a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de açúcares fermentáveis (até 85 g/L). Porém, foi demonstrado que a fermentabilidade de hidrolisados obtidos sob estas condições foi baixa, gerando longos tempos de fermentação (60 horas) e uso ineficiente do substrato;

- ✓ É possível a obtenção de inóculos robustos para a fermentação de hidrolisados sem a utilização de xilose comercial, sendo plausível realizar a etapa inicial da propagação celular diretamente com a xilose contida no hidrolisado hemicelulósico;

- ✓ As condições aplicadas durante o pré-tratamento ácido de bagaço de cana influenciaram diferentes características do hidrolisado. Em termos gerais, aumentos na concentração de ácido permitem uma maior eficiência do processo com maiores teores de xilose no hidrolisado, em detrimento da fermentabilidade dos hidrolisados. Da mesma forma, a relação sólido:líquido apresentou efeitos opostos na concentração de xilose e na eficiência do processo, sendo positivo para a primeira variável e negativa para a segunda. Fica, assim, evidente que a determinação de condições ótimas de processo deve ser direcionada a atender todas as variáveis de resposta consideradas;

- ✓ Os resultados experimentais permitiram estabelecer o efeito dos principais inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico (furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético) sobre a fermentabilidade dos mesmos. Assim, a relação etanol/xilitol, após fermentação, apresentou uma diminuição drástica na medida em que a concentração dos inibidores foi maior nos hidrolisados;

- ✓ O pré-tratamento de bagaço de cana com ácido diluído, considerando-se as múltiplas variáveis de resposta relacionadas com o aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica na produção de etanol, apresentou como condições

ótimas de processo uma relação sólido:líquido de 1:2,8 (g de bagaço: mL de solução ácida 1,09% v/v) com tratamento térmico de 121ºC, durante 27 minutos. O hidrolisado obtido sob estas condições apresentou uma concentração de xilose de 50,1 g/L, uma eficiência de hidrólise de 60,2% e uma concentração de inibidores suficientemente baixa para se obter uma concentração de etanol de aproximadamente 20 g/L, após 40 horas de fermentação, e com o consumo total de substrato utilizando a levedura *P. stipitis*;

- ✓ O desempenho da levedura *P. stipitis* foi mantido durante duas fermentações sequênciais de hidrolisado hemicelulósico, aplicando-se ou não técnicas para ativação das células entre os ciclos fermentativos. Durante a terceira fermentação verificou-se um desempenho inferior da levedura, sinalizando uma dificuldade para a reutilização da levedura e o desenvolvimento de processos contínuos;

- ✓ A levedura *P. stipitis* apresentou tolerância a concentrações de etanol de até 60 g/L, quando cultivada em meio sintético contendo xilose como substrato, enquanto sua tolerância foi menor (43 g/L), quando glicose foi utilizada. Esta diferença está relacionada com o acúmulo de xilitol, próprio do metabolismo de xilose, que agiu como protetor da célula contra a hostilidade do meio decorrente das maiores concentrações de etanol durante o processo;

- ✓ Quando propagada em meios com baixas concentrações da mistura glicose-xilose (até 20 g/L totais), a levedura *P. stipitis* mostrou um bom desempenho no seu crescimento, especialmente em glicose, e na produção de etanol, principalmente, quando proveniente de processos de propagação em xilose. Porém, quando o meio de fermentação apresentou uma alta concentração de glicose (em torno de 50 g/L), o consumo de xilose pela levedura foi reprimido e a fermentação da mistura, durante o processo SSF, foi ineficiente;

- ✓ A pré-hidrólise enzimática de celulignina mostrou-se independente da presença isolada de hidrolisados hemicelulósicos e oligoelementos utilizados para fermentação de xilose. Porém, pode ser afetada pela suplementação de fontes de nitrogênio ou a adição simultânea de hidrolisado-oligoelementos.

Adicionalmente, a quantidade de etanol produzido durante o processo SSF, realizado com *S. cerevisiae*, mostrou-se independente da suplementação do meio com oligoelementos ou fontes de nitrogênio, enquanto foi diminuída pela presença de hidrolisado hemicelulósico;

- ✓ O hidrolisado hemicelulósico fermentado apresentou um efeito negativo, tanto na pré-hidrólise enzimática de celulignina quanto no desempenho de *S. cerevisiae*, durante o processo SSF. Porém, o efeito foi tão pequeno que os resultados obtidos podem ser considerados promissores. Assim, após a realização de processo SSF utilizando 100% de hidrolisado hemicelulósico, foi possível atingir uma concentração final de etanol de 59,4 g/L, sinalizando-se a possibilidade de se atingir concentrações superiores e, inclusive, comparáveis às reportadas para processos de produção de etanol de primeira geração.

6.2 SUGESTÕES

- ✓ Novos estudos do pré-tratamento ácido de bagaço devem ser conduzidos direcionados à diminuição da concentração de ácido. Porém, a obtenção de bons resultados, neste sentido, só serão possíveis com aumentos da temperatura e, consequentemente, equipamentos de maior sofisticação que poderiam ser desenvolvidos visando à integração energética dentro do conceito da biorrefinaria;

- ✓ Seria recomendável aprofundar em estudos relacionados ao efeito do tamanho de partícula, incluindo no processo equipamentos que permitam uma homogenização da mistura sólido:líquido, já que este fator mostrou-se marcadamente importante para a obtenção de altos teores de xilose e negativo para a eficiência de hidrólises.

- ✓ Considerando-se a redução na recuperação de açúcares observada na fração de finos do bagaço, apesar de não ser significativa, estudos direcionados ao aumento da eficiência de extração de hemicelulose de esta fração devem ser realizado. Neste sentido, a utilização de reatores de fase sólida pode levar a

melhoras significativas no processo, inclusive para outros tamanhos de partícula;

- ✓ Condições mais apropriadas para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico devem ser avaliadas visando à reutilização de *P. stipitis* em fermentações sequênciais. Neste sentido, é possível que, variações na taxa de aeração do processo, permitam um crescimento celular que sustente um número relevante de ciclos fermentativos;

- ✓ Para a integração de etapas próprias do aproveitamento das frações polissacarídicas de materiais lignocelulósicos será necessário o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados, que fermentem eficientemente misturas de glicose e xilose e apresentem uma tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico e o etanol gerado durante a fermentação;

- ✓ Estudos direcionados à fermentação sequêncial de substratos devem ser realizados, visando minimizar possíveis efeitos inibitórios intrínsecos aos processos e acelerar o consumo eficiente de substrato, para a obtenção de fermentados com altas concentrações de etanol;

- ✓ Para se alcançar maiores rendimento no aproveitamento da fração hemicelulósica, o melhoramento genético da linhagem *Pichia stipitis*, assim como de outras leveduras, pode ser uma estratégia a ser pesquisada. Neste sentido, tornam-se interessantes estudos direcionados ao aumento da tolerância ao etanol e os inibidores gerados no pré-tratamento ácido, ao aumento na expressão de enzimas chave do catabolismo de xilose (como a xilose redutase), assim como à identificação, caracterização e aumento na expressão dos transportadores específicos para xilose;

- ✓ A realização de estudos de viabilidade econômica do processo, e de cada uma das etapas que envolvem o aproveitamento de bagaço de cana sob as condições desenvolvidas no presente trabalho, será necessária para direcionar o escalonamento do processo;

- ✓ A viabilidade da integração do processo proposto neste trabalho (SSF utilizando hidrolisado fermentado) a processos já estabelecidos industrialmente deve ser avaliada. Adicionalmente, a integração de outros processos ao aqui desenvolvido, dentro do conceito de biorrefinaria, deve ser pesquisada;

- ✓ Como uma forma de auxiliar o desenvolvimento industrial para o aproveitamento da fração hemicelulósica de bagaço de cana para a produção de etanol de segunda geração, estudos fundamentados na modelagem e simulação das etapas do processo devem ser desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

AGBOGBO, FRANK K.; COWARD-KELLY, GUILLERMO; TORRY-SMITH, MADS; WENGER, KEVIN S. (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2333–2336.

Agencia Nacional de Petróleo, gas natural e biocombustíveis (ANP) (2010). **Álcool Etílico Anidro Combustível (AEAC)**.
Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?id=582>. Acesso em: 24 abr. 2010.

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁSQUEZ, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55 n. 4, p 309-318.

Alexander´s Gas Oil Connections: Features (AGOCF) (2003). **Ethanol production around the word is booming**. AGOCF, v. 8, n. 11.
Disponível em: <http://www.gasandoil.com/>, Acesso em: 16 jun. 2005.

ALLEN, SANDRA A.; WILLIAM, CLARK; MCCAFFERY, J MICHAEL; CAI, ZHEN; LANCTOT, ALISON; SLININGER, PATRICIA J.; LIU, Z LEWIS; GORSICH, STEVEN W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 2, 10 p.

ALMEIDA, JOÃO R.M.; MODIG, TOBIAS; RÖDER, ANJA; LIDÉN, GUNNAR; GORWA-GRAUSLUND, MARIE-F. (2008). *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n.12, 9 p.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861.

ANTUNES, J.C. (1997). **Bioconversão de D-xilose a etanol por células de *Pichia stipitis***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

ASADA, CHIKAKO; NAKAMURA, YOSHITOSHI; KOBAYASHI, FUMIHISA (2005). Waste reduction system for production of useful materials from un-utilized bamboo using steam explosion followed by various conversion methods. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 131–137.

Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA) (2009). **Anuário estatístico**. Disponível em: <http://www.anfavea.com.br>. Acesso em: 24 abr. 2010.

BARBOSA, M.F.S.; LEE, H.; SCHNEIDER, H.; FORSBERG, C.W. (1990). Temperature mediated changes of D-xylose metabolism in the yeast *Pachysolen tannophilus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 72, p. 35-40.

BADGER, P.C. (2002) **Ethanol from cellulose: A general review**. In: JANICK,J.; WHIPKEY, A. Trends in new crops and new uses. Alexandria: ASHS Press. 599 p.

BALAT, MUSTAFA; BALAT, HAVVA; OZ, CAHIDE (2008). Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573.

BALLESTEROS, IGNACIO; BALLESTEROS, MERCEDES; MANZANARES, PALOMA; NEGRO, M. JOSÉ; OLIVA, J. MIGUEL; SÁEZ, FELICIA (2008). Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 84–91.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, O. (1983). **Yeasts: Characteristics and identification**. Cambridge: Cambridge University Press. 433 p.

BARROS NETO, B.; SCAEMNINIO, I.S.; BRUNS, R.E. (1995) **Planejamento e otimização de experimentos**. São Paulo: Editorial UNICAMP. 299 p.

BARROS NETO, B.; SCAEMNINIO, I.S.; BRUNS, R.E. (2001) **Como fazer experimentos, pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. São Paulo: Editorial UNICAMP. 480 p.

BECKER, J.; BOLES, E. (2003). A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p 4144–4150.

BENGTSSON, O.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. (2009). Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 9, 10P.

BERG, C. (2001). **Word ethanol production 2001**. Disponível em: <http://www.distill.com>. Acesso em: 10 jun. 2005.

BERLIN, ALEX; BALAKSHIN, MIKHAIL; GILKES, NEIL; KADLA, JOHN (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and β-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198–209.

BERTILSSON, MAGNUS; OLOFSSON, KIM; LIDÉN, GUNNAR (2009). Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2: n. 8, 10 p.

BETANCUR, G.J.V. (2005) **Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Pichia stipitis***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. (2008) Comparing the xilose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, 16 p.

BHAT, M.K.; BHAT, S. (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-620.

BOIN, CAROLINE (2010). **Biofuel scam**. Alexander´s Gas and Oil Connections, v. 15, n. 5. Disponível em: <http://www.gasandoil.com>. Acesso em: 21 de abr. 2010.

BOM, ELBA P.S.; GÍRIO, FRANCISCO; PEREIRA Jr., NEI (2008). **Enzimas na produção de etanol**. Em: Bon, Elba P.S.; Ferrara, Maria Antonieta; Corvo, Maria Luísa. Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., 1ª ed. 506 p.

BRITO, F. (2000). **Bioprodução de etanol de hidrolisado de bagaço de cana utilizando diferentes formas de operação do bioprocesso**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

BRÜINENBERG, P.M.; DE BOT, P.H.M.; VAN DIJKEN, P.; SCHEFFERS W.A. (1984). NADH linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 256-260.

CANETTIERI, ELIANA VIEIRA; ROCHA; GEORGE JACKSON DE MORAES; DE CARVALHO JR., JOÃO ANDRADE; SILVA, JOÃO BATISTA DE ALMEIDA (2007). Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 422–428.

CARAMEZ, M. (1999). **Produção de endoxilanases termoestáveis por *Termomyces lanuginosus* IOC-4145 em meio semi-sólido**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

CHEN, HONGZHANG; JIN, SHENGYING (2006). Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1430–1432.

CHENG, KE-KE, CAI, BAI-YAN; ZHANG, JIAN-AN; LING, HONG-ZHI; ZHOU, YU-JIE; GEB, JING-PING; XU, JING-MING (2008). Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105–109.

CHEN, K.; IVERSON, A.G.; GARZA, E.A.; GRAYBURN, W.S.; ZHOU, S. (2010). Metabolic evolution of non-transgenic *Escherichia coli* SZ420 for enhanced homoethanol fermentation from xylose**. Biotechnology Letters**, v. 32, n. 1, p. 87–96.

CHO, DAE HAENG; SHIN, SOO-JEONG; BAE, YANGWON; PARK, CHULHWAN; KIM, YONG HWAN (2010). Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4947–4951.

CRUEGER, W; CRUEGER, A. (1993). **Biotecnología: Manual de microbiologia industrial.** Zaragoza. España: Editora Acribia, 3ª edição. 414 p.

CUZENS, J.C.; MILLER, J.R. (1997). Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 2/3, n. 10, p. 285-290.

D'ALMEIDA, M.L.O. (1988). **Composição química dos materiais lignocelulósicos**. Em: Celulose e papel: Tecnologia de fabricação de pasta celulósica (v. 1). São Paulo: IPT.

DAVIS, DIANA J.; BURLAK, CHRISTOPHER; MONEY, NICHOLAS P. (2000) Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. **Mycological Research**, v. 104, n. 7, p. 800-804.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. (1988). Continuous production of ethanol from a glucose, xylose and arabinose mixture by a flocculant strain of *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 10, p. 752-730.

DEMIRBAS, M. FATIH; BALAT, MUSTAFA; BALAT, HAVVA (2009). Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 1746–1760.

DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W.H. (2003). Enhanced xylan degradation and utilisation by *Pichia stipitis* overproducing fungal xylanolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 5, p. 620–628.

DEN HAAN, R.; ROSE, S.H.; LYND, L.R.; VAN ZYL, W.H. (2007). Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 9, n. 1, p. 87–94.

DERRINGER, G.; SUICH, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219.

DU PREEZ, J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 944-956.

DU PREEZ, J.C.; BOSH, M.; PRIOR, B.A. (1986a). Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 8, n. 6, p. 360-364.

DU PREEZ, J.C.; BOSH, M.; PRIOR, B.A. (1986b). The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 3-4, n. 23, p. 228-233.

DU PREEZ, J.C.; BOSH, M.; PRIOR, B.A. (1987). Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 521-525.

Energy Information Administration (EIA) – Department of Energy - EUA (2010). **Official Energy Statistics from the U.S. Government**. Disponível em: <http://www.eia.doe.gov/>. Acesso: 13 Abr. 2010.

FAIRBANKS, M. (2003). **Álcool: Tecnologia amplia oferta e reduz custo do álcool**. Revista: Química e Derivados, n. 417. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista>. Acesso em: 24 jun. 2004.

FERRARI, M.D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. (1992). Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 753-759.

FERREIRA, C.O. (2002). **Avaliação preliminar do potencial de produção de etanol da cana-de-açúcar**. Economia & Energia, n. 34. Disponível em: <http://ecen.com/eee34>. Acesso em: 29 jun. 2005.

FOGEL, R. (2004). **Otimização da hidrólise ácida de bagaço de cana-de açúcar e utilização do hidrolisado na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

FOGEL, R.; GARCIA, R.; OLIVEIRA, R.; PALACIO, D.; MADEIRA, L.; PEREIRA Jr, N. (2005). Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 741-752.

FU, NAN; PEIRIS, PAUL; MARKHAM, JULIE; BAVOR, JOHN (2009). A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 54, p. 210-217.

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. (2004). Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1207–1212.

GÁMEZ, SARA; GONZÁLEZ CABRIALES, JUAN JOSE; RAMÍREZ, JOSE´ ALBERTO; GARROTE, GIL; VÁZQUEZ, MANUEL (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid**. Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78–88

GIANNINI, ROBERTO GOMES (1997). **Taxionomia do setor sucro-alcooleiro do centro-sul do Brasil - uma abordagem estatística**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

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

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. (1981). Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied Environmental Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 430-436.

GUEBEL, D.V.; CORDENONS, A.; NUDEL, B.C.; GIULIETTI, A.M. (1991). Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 12, p. 1193-1198.

GUPTA, RISHI; SHARMA, KRISHNA KANT; KUHAD, RAMESH CHANDER (2009). Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498**. Bioresource Technology**, v. 100, p. 1214–1220.

GUTIÉRREZ, T.; BUSKO, M.L.; INGRAM, L.O.; PRESTON. J.F. (2002). Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 327-340.

HAHN-HÄGERDAL, B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. (1991). Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolisate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, p. 131-144.

HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C.F.; GARDONYI, M.; VAN ZYL, W.H.; CORDERO OTERO, R.; JONSSON, L.J. (2001). Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for xylose utilisation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 73, p. 53–84.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937–953.

HENDRIKS; A.T.W.M.; ZEEMAN, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomasa. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18.

HENRISSAT, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316.

HOHMANN, STEFAN (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300–372.

JEFFRIES, T.W.; GRIGORIEV, I.V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J.M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P.M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylosefermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 319–326.

JEFFRIES, T.W.; VAN VLEET, J.R. (2009) *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 6, p. 793–807.

KARIMI, KEIKHOSRO; KHERADMANDINIAA, SHAUKER; TAHERZADEH, MOHAMMAD J. (2006). Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 247–253.

KASTNER, J.R.; AHMAD, M.; JOJNES, W.J.; ROBERTS, R.S. (1996). Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 224-228.

KAVANAGH, K.; WHITTAKER, P.A. (1994) Application of the Melle-Boinot process to the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 28-31.

KIM, T.H.; LEE, Y.Y. (2006). Fractionation of corn stover by hot-water and aqueous ammonia treatment. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 224–232.

KLEMAN-LEYER, K.M. SIIKA-AHO, MATTI; TEERI, TUULA T.; KIRK, T. KENT (1996). The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act sinergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2883-2887.

KÖTTER, P.; CIRIACY (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Biotechnology**, v. 38, p. 776-783.

KRAHULEC, STEFAN; PETSCHACHER, BARBARA; WALLNER, MICHAEL; LONGUS, KARIN; KLIMACEK, MARIO; NIDETZKY, BERND (2010). Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the coenzyme specificity of xilose reductase, and effect of glucose on xilose utilization. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 16, 14 p.

LAMONICA, H. M. (2005) **Geração de energia elétrica a partir da biomassa de cana**; In: SEMINÁRIO BIOELETRICIDADE, 3. 2005, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: BNDES. Palestra.
Disponível em: <http://www.inee.org.br/down_loads/eventos/Geracao_EE_Biomassa_Cana_Lamonica_BNDES_2005.pdf> Acesso: 14 fev. 2006.

LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETA, R.; NAVARRO, J.M. (1991). Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: Process consideration in relation to ethanol tolerance. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 445-450.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄRDERGAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. (1998). The generation of fermentation inhibitors during acid hydrolysis of soft-wood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 151-159.

LASER, M.; SCHUNAB, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL Jr., M.J.; LYND, L.R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, n. 81, p. 33-44.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E. (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1081-1099.

LAWRENCE, CHRIS (2010). **Bifuels**. Alexander´s Gas and Oil Connections, v. 15, n. 1. Disponível em: <http://www.gasandoil.com>. Acesso em: 21 abr. 2010.

LEAL, M. L. (1998). **Reciclo Celular na produção contínua de etanol a partir de d-xilose com uma linhagem floculante de *Pichia stipitis***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

LEE, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24.

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

LIGTHELM, M.E.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C.; BRANT, V. (1988). An investigation of D-(1-C13) xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic condition. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 293-296.

LINDE, MARIE; JAKOBSSON, EVA-LENA; GALBE, MATS; ZACCHI, GUIDO (2008). Steam pretreatment of dilute H_2SO_4-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 326 – 332.

LOHMEIER-VOGEL, E.; SKOOG, K.; VOGEL, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1989). 31P nuclear magnetic resonance study of effect of azide on xilose fermentation by *Candida tropicalis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1974-1980.

LLOYD, TODD; WYMAN, CHARLES E. (2003) Application of a depolymerization model for predicting thermochemical hydrolysis of hemicellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105–108, p. 53-67.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 506–577.

LYND, L.R.; ZYL, W.H. V.; MCBRIDE, J.; LASER M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. **Biotechnology**, v.16, p. 577–583.

McMILLAN, J. (2004). **Biotechnological routes to biomass conversion**. Disponível em: <www.nrel.gov/docs/gen/fy04/36831g.pdf>. Acesso: 14 fev. 2006.

MAEDA, ROBERTO; SANTOS, DAIANE; MESQUITA, SABRINA; FELIX, LETÍCIA; SANTA ANNA, LÍDIA M.M.; PEREIRA Jr., NEI (2010). Study of cellulase production by *Penicillium funiculosum* in instrumented bioreactor using three different preinoculum. In: 32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Florida, 2010.

MAIORELLLA, B.L.; BLANCH, H.N.; WIKE, C.R. (1983). Economic evaluation of alternative ethanol fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1003-1024.

MANSFIELD, SHAWN D. (2009). Solutions for dissolution—engineering cell walls for deconstruction. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 286–294.

MARTÍN, CARLOS; KLINKE, HELENE B.; THOMSEN, ANNE BELINDA. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse**. Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 426–432.

MATSUSHITKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. (2008). Bioethanol production from xylose by recombinant Saccharomyces cerevisiae expressing xylose reductase NADP+-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n. 3, p. 296-299.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; ROMIEU, C.; MOLETTA, R.; GOUNOT, A.M. (1995). Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 535-540.

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Secretaria de Produção e Comercialização (SPC) – Departamento de Cana-de-Açúcar e Agroenergia (DCAA) (2010). **Produção**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br.> Acesso em: 14 abr. 2010.

Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2009). **Anuário estatístico da agroenergia**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 abr. 2010.

MODIG, TOBIAS; LIDÉN, GUNNAR; TAHERZADEH, MOHAMMAD J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769-776.

MOHAGHEGHI, ALI; EVANS, KENT; CHOU, YAT-CHEN; ZHANG, MIN (2002). Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98–100, n. 1-9, p. 885–898.

MONTGOMERY, D.C. (2001) **Design and analysis of experiments**. New York: Editorial Wiley. Quinta Ed. 684 p.

MOREIRA, J.R.; GOLDEMBERG, J. (1999). The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, n. 4, p. 229-245.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. (2005a). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686.

MOSIER, NATHAN; HENDRICKSON, RICHARD; HO, NANCY; SEDLAK, MIROSLAV; LADISCH; MICHAEL R. (2005b). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1986–1993.

MURNEN, HANNAH K.; SHISHIR, VENKATESH BALAN; CHUNDAWAT, P. S.; BALS, BRYAN; SOUSA, LEONARDO DA COSTA; DALE, LEONARDO DA COSTA (2007). Optimization of ammonia fiber expansion (afex) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to fermentable sugars. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 846-850.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. (2002) Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 28, p. 24-39.

NAIK, S.N.; GOUD, VAIBHAV V.; ROUT, PRASANT K.; DALAI, AJAY K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578–597.

NEVES, MARCOS FAVA; TROMBIN, VINÍCIUS GUSTAVO; CONSÔLI, MATHEUS ALBERTO (2009). **Mapeamento e quantificação do setor sucroenergético em 2008**. Disponível em: <http://www.unica.com.br>, acesso em: 20 Abr. 2010.

NIGAM, J.N. (2001a). Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 145-150.

NIGAM, J.N. (2001b). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 82, p. 17-27.

NIGAM, J.N. (2001c). Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 208–215.

NIGAM, J.N. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose–fermenting yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 107–116.

ODAC – Oil Depletion Analysis Center (2007). Disponivel em: <http://www.odac-info.org/>.

OLIVEIRA, ELIANE; DE SOUZA, CLAUDIO; D'ERCOLE, RONALDO; DE FRANÇA, MIRELLE (2006). **Governo decide aumentar mistura de álcool na gasolina para 23%**. O Globoonline.
Disponível em: <http://oglobo.globo.com/economia/mat/2006/10/31/286474230.asp>, Acesso em: 24 Abr. 2010.

OLSSON, L; HAHN-HÄGERDAL, B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL. B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N.Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. (1999). Main and interaction effects of acid acetic, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol production of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 46-55.

PAMPULHA, M.E.; LOREIRO-DIAS, M.C. (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 375-380.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. E.; SOCCOL, V.T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 74, n. 1, p. 69-80.

PARAJÓ, JUAN CARLOS; DOMÍNGUEZ, HERMINIA; DOMÍNGUEZ, JOSÉ MAUEL (1998). Biotechnological Production of xilitol. Part III: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40.

PEDRO, K. C. N. R. ; CASTRO, A. M. ; BETANCUR, G. J. V. ; PEREIRA Jr., NEI (2005). Influência do tamanho de partícula na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. In: **XXVII Jornada de Iniciação científica da UFRJ**, 2005, Rio de Janeiro. Anais da XXVII Jornada de Iniciação científica da UFRJ.

PEREIRA, RAQUEL EMERIC (2006). **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para produção de etanol**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

PEREIRA Jr., NEI (1991). **Investigation of D-xylose fermenting yeast**. Ph.D. Thesis. Deparment of Chemistry. The University of Manchester, U.K.

PEREIRA Jr., NEI; COUTO, MARIA ANTONIETA PEIXOTO G.; SANTA ANNA, LIDIA MARIA MELO (2008). **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. *Series on Biotechnology* v. 2**. Rio de Janeiro: Amigadigital. 46 p.

PETERSSON, ANNELI; ALMEIDA, JOÃO R. M.; MODIG, TOBIAS; KARHUMAA, KAISA; HAHN-HÄGERDAL, BÄRBEL; GORWA-GRAUSLUND, MARIE F.; LIDÉN, GUNNAR (2006). A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerante. **Yeast**, v. 23: p. 455–464.

PHOWCHINDA, O.; DÉLIA-DUPUY M.L.; STREHAIANO, P. (1995) Effects of acetic acid on growth and fermenting activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 237-242.

POUTANEN, K.; PLUS, J.; NIEMELÄ, K.; BUCHERT, J. (1990). Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolisate by ion exclusion. **Process Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 176-180.

QUEIROZ, CARLA REGINA AMORIM DOS ANJOS; DE MORAIS, SÉRGIO ANTÔNIO LEMOS; DO NASCIMENTO, SÉRGIO ANTÔNIO LEMOS (2002). Caracterizaçao dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p.485-492.

RAHMAN, S.H.A.; CHOUDHURY, J.P.; AHMAD, A.L.; KAMARUDDIN, A.H. (2007). Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xilose. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 554–559.

Renewable Fuels Association (RFA) (2010). **Ethanol industry outlook: Climate of opportunity**.
Disponível em: <http://foodnfuel-ethanolrfa.bluestatedigital.com/pages/annual-industry-outlook>. Acess em: 18 Abr. 2010.

RIOU, CHRISTINE; SALMON, JEAN-MICHEL; VALLIER, MARIE-JOSE; GUNATA, ZIYA; BARRE, PIERRE (1998) Purification, characterization and substrate

specificity of a novel highly glucose-tolerant ß-glucosidase from *aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 10, p. 3607-3614.

RIZZI, M.; KLEIN, C.; SCHULTZE, C. BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. (1989). Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen limited growth and fermentation with the yeast *Pichia stipitis* with xylose as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 509-514.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. (1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15-21.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 143-152.

ROMERO, I; MOYA, M.; SÁNCHEZ, S.; RUIZ, E.; CASTRO, E.; BRAVO; V. (2007). Ethanolic fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. **Industrial Crops and Products**, v. 25, p. 160–168.

RUNQUIST, DAVID; HAHN-HÄGERDAL, BÄRBEL; RÅDSTRÖM, PETER (2010) Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 5, 7p.

SÁ, M.C.A. (1993). **Efeito do grau de areação na produção de xilitol por bioconversão**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

SAHA, BADAL C.; ITEN, LOREN B.; COTTA, MICHAEL A.; WU, Y. VICTOR (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to etanol. **Process Biochemistry**, v. 4, p. 3693–3700.

SANTOS, A.S. (2000a). **A experiência brasileira no desenvolvimento de um combustível binário álcool-diesel**. Economia & Energia, n. 20. Disponível em: <http://www.ecen.com/eee20/adailson.htm>. Acesso em: 21 jun. 2005.

SANTOS, A.S. (2000b). **Adição de compostos oxigenados na gasolina e a experiência do proálcool**. Economia & Energia, n. 19. Disponível em: <http://ecen.com/eee19/compoxi.htm>. Acessado em: 22 jun. 2005.

SANTOS, A. S. (2002). **A participação brasileira nos movimentos internacionais de oposição ao MTBE**. Economia & Energia. n. 31. Disponível em: <http://ecen.com/eee31/merc_alcool.htm>. Acesso em: 21 jun. 2005.

SAXENA, R.C.; ADHIKARI, D.C.; GOYAL, H.B. (2007). Biomass-based energy fuel through biochemical routes; review. **Renewable and Sustaitable Energy Reviews**, v. 13, p. 167-178.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. (2000), Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 253-260.

SCHELL, DANIEL J.; FARMER, JODY; NEWMAN, MILLI; McMILLAN, JAMES D. (2003). Diluite-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, n. 1-3, p. 69-85.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.S.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (2001a) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica, 2v**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1 edição. 541 p.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.S.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (2001b). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, 3v**. São Paulo : Editora Edgard Blucher, 1º edição. 544 p.

SCHNEIDER, H. (1989). Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1-40.

SHLESER, R. (1994). **Ethanol production in Hawaii**. State of Hawaii, Department of Business, Economic Development and Tourism. Disponível em: <http://www.hawaii.gov/dbet/ert/ethanol>. Acesso em: 4 jul. 2005.

SIMÕES, J. (2006) **Produtividade e eficiência energética da cana-de-açúcar dão ao Brasil dianteira mundial em etanol; mantê-la depende de mais P&D. Inovação.** UNICAMP (boletim eletrônico) disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/news-oportunidade.php>. Acesso em: 18 oct. 2007.

SKOOG, K.; JEPPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAN, B. (1992). The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, p. 369-375.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; LADISCH, M.R.; OKOS, M.R. (1990). Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 727-731.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; OKOS, M.R.; LADISCH, M.R. (1985). Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentration. **Biotechnology Letters**, v. 7, n. 6, p. 431-436.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. (2008). **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Technical reports NREL/TP-510-42618, 14 p.

SOMAVILLA, C.; GOMES NETO, E. H. (2005) **Etanol e as células combustíveis**. Brasil H_2 Fuel Cell Energy.
Disponível em: <http://www.celulaacombustivel.com.br>. Acesso em: 10 jun. 2005.

SREENATH, H.K. AND JEFFRIES, T.W. (2000) Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 3, p. 299-308.

STANBUK, BORIS U.; ELEUTHERIO, ELIS C.A.; FLOREZ-PARDO, LUZ MARINA; SOUTO-MAIOR, ANA MARIA; BON, ELBA P.S. (2008). Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, p. 918-926.

Stat-Ease ® Software, Design Expert, version 6.0.6. Informação disponível em: www.statease.com. Stat-Ease ® Software, 2000.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0. Informação disponível em: www.statsoft.com. Statsoft, Inc., 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11.

SUN, RUNCANG; TOMKINSON, JEREMY (2003). Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylethylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 4, p. 751-759.

SUN, YE; CHENG, JAY J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599–1606.

TELLI-OKUR, MUJGAN; EKEN-SARAÇOGLU, NURDAN (2008). Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2162–2169.

TEYMOURI, FARZANEH; LAUREANO-PEREZ, LIZBETH; ALIZADEH, HASAN; DALE, BRUCE E. (2005). Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 2014–2018.

UNICA (2005) **Dados e cotações: Estatísticas**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Acessado em: 10 jun. 2005.

VÁSQUEZ, MARIANA PEÑUELA (2007). **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultânea para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

VÁSQUEZ, MARIANA PEÑUELA; DA SILVA, JULIANA NASCIMENTO C.; DE SOUZA Jr., MAURÍCIO BEZERRA; PEREIRA Jr., NEI (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v. 136-140, p. 141-153.

VASSILEV, STANISLAV V.; BAXTER, DAVID; ANDERSEN, LARS K.; VASSILEVA, CHRISTINA G. (2010). An overview of the chemical composition of biomass. **Fuel**, v. 89, p. 913–933.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. (2007) Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 296–301

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. (2003) Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1109-1117.

WISSELINK, H.W.; TOIRKENS, M.J.; ROSARIO FRANCO, B.M.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; VAN MARIS, A.J. (2007). Engineering of

Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4881–4891.

XU, F.; SUN, J. X.; LIUB, C. F.; SUNB, R. C. (2006). Comparative study of alkali and acidic organic solvent soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 253–261.

XU, JIAN; LIU, SHIJIE (2009) Optimization of ethanol production from hot-water extracts of sugar maple chips. **Renewable Energy**, v. 34, p. 2353–2356.

YOMANO, L.P.; YORK S.W.; ZHOU, S.; SHANMUGAM, K.T.; INGRAM, L.O.; (2008). Reengineering *Escherichia coli* for ethanol production. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 12, p. 2097–2103.

ZAVREL, MICHAEL; BROSS, DANIELA; FUNKE, MATTHIAS; BÜCHS, JOCHEN; SPIESS, ANTJE C. (2009). High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2580–2587.

ZENG, M.; MOSIER, N.S.; HUANG, C.P.; SHERMAN, D.M.; LADISCH, M.R. (2007). Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to cellulose activity and hot water pretreatment. **Biotechnology and Bioengineerig**, v. 97, n. 2, p. 265-278.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824.

ZHU, SHENGDONG; WU, YUANXIN; YU, ZINIU; CHEN, QIMING; WU, GUIYING; YU, FAQUAN; WANG, CUNWEN; JIN, SHIWEI (2006). Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering**, v. 94, p. 437–442.

ANEXOS

Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458
Vol.13 No.3, Issue of May 15, 2010
© 2010 by Pontificia Universidad Católica de Valparaíso -- Chile
Received July 2, 2009 / Accepted November 10, 2009

DOI: 10.2225/vol13-issue3-fulltext-3

SHORT COMMUNICATION

Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization

Gabriel J. Vargas Betancur
Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos
Departamento de Engenharia Bioquímica
Escola de Química, Centro de Tecnologia
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Nei Pereira Jr.*
Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos
Departamento de Engenharia Bioquímica
Escola de Química, Centro de Tecnologia
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: nei@eq.ufrj.br

Website: www.ladebio.org.br

Financial support: Brazilian Council for Research (CNPq) and Brazilian Oil Company Research Center (PETROBRAS).

Keywords: hemicellulose hydrolysis, severity factor, xylose.

Tons of sugar cane bagasse are produced in Brazil as waste of the sugar and ethanol industries. This lignocellulosic material is a potential source for second-generation ethanol production. Diluted acid hydrolysis is one of the most efficient pretreatments for hemicellulosic solubilization. The hydrolysate obtained is rich in xylose, which can be converted to ethanol by *Pichia stipitis*. This work used a statistical approach and the severity factor to investigate the effects of factors associated with the diluted acid hydrolysis process (acid concentration, solid:liquid ratio and time of exposure) on various response variables (xylose concentration, hydrolysis yield, inhibitor concentration and hydrolysate fermentability). The severity factor had a strong influence on the generation of inhibitors. The statistical analysis was useful for determining the effects of the individual factors and their interactions on the response variables. An acid concentration of 1.09% (vv), an S:L ratio of 1:2.8 (g:ml), and an exposure time of 27 min were established and validated as the optimum pretreatment conditions for the generation of hydrolysates with high xylose concentration and low contents of inhibitors. In such conditions, hydrolysate with 50 g/l of xylose was obtained.

Dependence on petroleum remains the most important factor affecting the worldwide distribution of wealth, global conflicts and the quality of the environment. Population growth and the associated demand for fuel and goods coupled with more restrictive environmental regulations have intensified the research and development of renewable energy feedstocks to substitute for and/or to complement fossil fuel sources (Pereira et al. 2008). Biotechnology offers alternatives for the development of the biomass industry based on lignocellulosic (LC) feedstocks for energy supply and the production of chemicals. A relatively new concept called the LC Biorefinery establishes a selective separation of residual biomass fractions and processes them in accordance with their chemical characteristics and the desired target products (Lynd et al. 2005). In this context, lignocellulosic materials, especially agroindustry residues, have been the subject of intense research since they are renewable sources of carbon and energy that are available in large quantities. The integrated and rational utilization of these abundant feedstocks can revolutionize a variety of industries, including liquid fuels, food, fodder and chemicals, and thereby bring immeasurable benefits, especially to countries with extensive regions of high biological productivity such as Brazil.

Sugar cane bagasse is the main Brazilian agroindustrial residue, being produced at approximately 250 kg per ton of sugar cane. In spite of the great potential of this residual biomass of lignocellulosic composition (60-70% carbohydrates) for the production of fuels and chemicals, the majority of it is burned in sugar mills and alcohol distilleries for energy generation, and a smaller fraction is used for animal feeding; however there is still some surplus (Zanin et al. 2000; Wyman et al. 2005). Additionally, with the increase in cane production in response to the growth of global ethanol demand (from 66 to 125 million m^3 between 2008 and 2020), more bagasse will be available (Pandey et al. 2000; Balat and Balat, 2009).

*Corresponding author

Table 1. Levels for each factor in the experimental design.

Factor	Axial point (-a)	Low Level (-1)	Central level (0)	High level (+1)	Axial point (+a)
Time of exposure (min.)	27	40	60	80	93
Acid concentration (% vv)	0.50	0.75	1.13	1.50	1.75
Solid:liquid ratio (g:ml)	1:3.3	1:3.0	1:2.5	1:2.0	1:1.7

Sugar cane bagasse is mainly composed of two polysaccharidic fractions (cellulose and hemicellulose) and a polyphenolic macromolecule (lignin). The more abundant component is cellulose (33-36%), a polysaccharide consisting of a linear chain of several highly organized β(1→4)-linked D-glucose units that generates crystalline regions and consequently increases resistance to the hydrolytic process. Hemicellulose is the second predominant fraction (28-30%), and it possesses a heteropolysaccharidic composition that varies according to the source. Sugar cane bagasse hemicellulose is composed of heteroxylans, with a predominance of xylose, which is configured in a chain that can be chemically hydrolyzed more easily than cellulose. The polyphenolic fraction, called lignin, is a complex structure formed by the polymerization of aromatic alcohols that, when combined with the hemicellulose, covers the cellulose matrix, conferring resistance to enzymatic and chemical degradation (Sun and Cheng, 2002; Ververis et al. 2007).

For the integral utilization of lignocellulosic feedstock, it is necessary to develop a pretreatment process for the selective and efficient fractionation of its main polysaccharide components, which should undergo hydrolysis to generate a high concentration of sugar monomers. These sugar monomers can be used as substrates (building-blocks) for biotechnological and chemical processes (Mussato and Roberto, 2002).

The selective separation of hemicellulose can be performed using various pretreatments, such as ammonia fiber explosion (AFEX), alkaline humid oxidation (WAO), sodium hydroxide explosion (SHFEX), calcium hydroxide (Lime), Organosolv, steam explosion (STE), diluted acid hydrolysis (DAH) and liquid hot water (LHW) (Baudel et al. 2005; Mosier et al. 2005). Each pretreatment provides particular characteristics to the obtained phases, with the main purpose being to increase the susceptibility of the solid phase to enzymatic hydrolysis, and in some cases to make available the monomeric sugars of the hemicellulose. Among these treatments, acid hydrolysis stands out when compared with non-catalytic pretreatments because it allows for the generation of a liquid phase (hemicellulose hydrolysate) rich in xylose and with minor amounts of lignin derivatives that can inhibit cell metabolism relative to the levels seen with alkaline and organic pretreatments (Lavarack et al. 2002; Fogel et al. 2005; Gámez et al. 2006).

Additionally, xylose, the main hemicellulose-derived pentose, and hexose may be degraded during acid hydrolysis into furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural (hydroxymethylfurfural), respectively, which are also reported to be inhibitors of cell metabolism (Balat et al. 2008).

This work aimed to characterize the individual effects of sulfuric acid concentration, solid:liquid (S:L) ratio and the time of exposure, as well as their synergic effects, on hydrolysate composition using severity factor expression and statistical approach. For this, a central composite design was constructed using response variables such as xylose concentration, concentration of inhibitors in the generated hydrolysates.

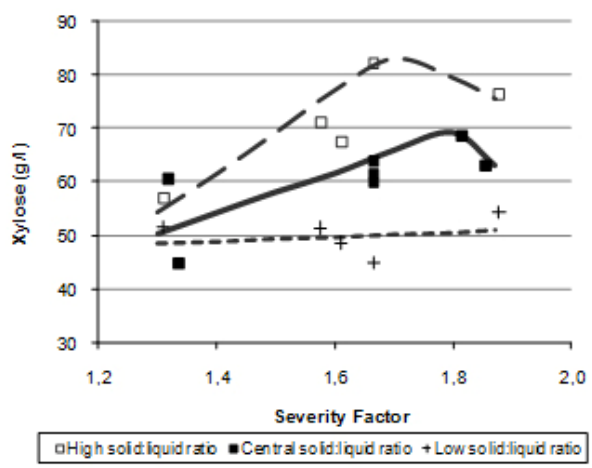


Figure 1. Xylose concentration resulting from the acid pretreatment as a function of the severity factor.

MATERIALS AND METHODS

Diluted acid pretreatment/hydrolysis

The diluted acid hydrolysis was performed using a central composite design with the following factors: time of exposure, concentration of sulfuric acid and solid-liquid ratio. The temperature was kept constant at 121ºC. The level for each variable and the full experimental matrix expressed in coded values are shown in Table 1 and Table 2, respectively.

After acid pretreatment, the liquid phase (hemicellulose hydrolysate) was separated from the solid by a pressure filter set within the reaction system (Santa Anna et al. 2007). Then, the pH of the liquid phase was adjusted to 6 by addition of $Ca(OH)_2$, and the generated $CaSO_4$ was separated by filtration. The liquid phase, called hemicellulose hydrolysate, had its sugar and inhibitor contents determined.

Analytical methods

Xylose concentration in the hydrolysates was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Aminex HPX-87P column (Bio-rad) maintained at 65ºC and with a differential refractive index detector (Waters). Furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid concentrations were determined by HPLC using a KC811 column (Shodex) with a UV detector at 230 nm (Waters). The concentration of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteau method (Queiroz et al. 2002).

The hydrolysis factors were used to determinate the severity factor (Equation 1), as proposed by Schell et al. (2003), and its relation with the response variables was established. Additionally, the effects of each individual factor and its interactions were analyzed using the software STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2002).

$$\text{Severity factor} = \text{Log}_{10}\left(\text{time}.\exp\left[\frac{\text{Temperature} - 100}{14.75}\right]\right) - \text{pH}$$

[Equation 1]

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental results for the diluted acid pretreatment are summarized in Table 3. The highest xylose concentrations (above 70 g/l in experiments 5, 6 and 11) were achieved with the highest S:L ratio (+α or +1). Other experiments carried out with high S:L ratios that resulted in low xylose concentrations were due to low acid concentration (-1). On the other hand, experiments that provided the lowest xylose concentrations used either the lowest S:L ratio (experiments 3, 4, 7, 8 and 12) or the middle value (experiment 9) combined with the lowest acid concentration (0.5%). These results show a strong influence of acid concentration and S:L ratio on xylose concentration,

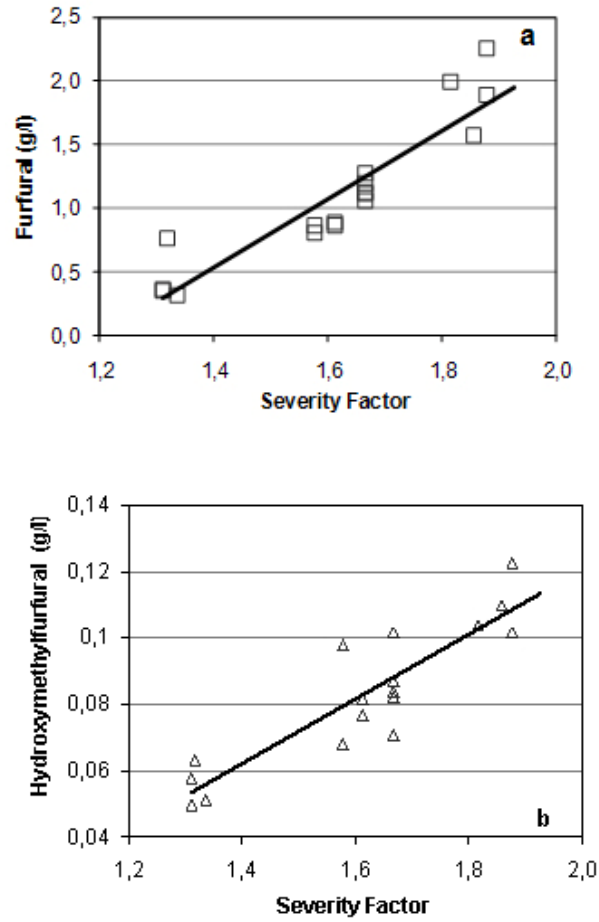


Figure 2. Furfural (a) and hydroxymethylfurfural (b) generated in acid pretreatment as a function of the severity factor.

as was reported by Cheng et al. (2008) for sugarcane bagasse and Ballesteros et al. (2008) for cardoon biomass.

Values ranging from 58.8% to 73.6% were observed for the hydrolysis yield, except for experiments 1 and 9, which resulted in values of 48.9% and 48.1%, respectively, corresponding to the -α and -1 levels of acid concentration. Moreover, the highest (73.6%) and the lowest (48.1%) hydrolysis yields were achieved using the highest (+α) and the lowest (-α) acid concentrations, respectively, showing a directly proportional relation between acid concentration and hydrolysis yield.

The concentrations of furfural and hydroxymethylfurfural in the hydrolysates showed a strong dependence on acid concentration. Thus, the lowest concentrations of these furan compounds (experiments 1, 3 and 9) corresponded to low acid concentration (-α and -1) while the maximum concentrations of these inhibitors were achieved (experiments 6, 8 and 10) when high acid concentrations were used (+α and +1). Similarly, acetic acid concentrations were higher when high S:L ratios were used (+α and +1).

Table 2. Central composite design for the diluted acid pretreatment expressed in coded values.

Experiment	Time of exposure	Acid concentration	Solid:liquid ratio
1	-1	-1	+1
2	+1	-1	+1
3	-1	-1	-1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	+1	+1	+1
7	-1	+1	-1
8	+1	+1	-1
9	0	-α	0
10	0	+α	0
11	0	0	+α
12	0	0	-α
13	-α	0	0
14	+α	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Since the experimental conditions had a wide range, the experiments were assembled according to the S:L ratio for a better understanding of the influence of the severity factor (which takes into account the acid concentration, time of exposure and temperature) on xylose concentration (Figure 1). Xylose concentration is dependent on the severity factor for high and intermediate S:L ratios. Its maximum concentrations of 83 g/l (high S:L ratio) and 68 g/l (intermediate S:L ratio) were achieved with severity factors of 1.7 and 1.8, respectively. Increasing the severity factor further caused a decrease in xylose concentration. This is due to the dehydration of the released sugars to furan compounds (furfural from pentoses and hydroxymethylfurfural from hexoses), as described by Balat et al. (2008) and Lloyd and Wyman (2003). This reaction is more important as the experimental condition is more drastic, *i.e.*, as the severity factor gets higher more furan compounds are generated (Figure 2).

Similarly to the xylose concentration, the hemicellulose hydrolysis yield varied with the severity factor (Figure 3). No defined tendency was observed between the severity factor and the concentration of phenolic compounds (values ranged from 1.5 g/l to 2.3 g/l), nor with acetic acid concentration (values ranged from 4.4 g/l to 11 g/l).

The statistical analysis showed the linear effect of the S:L ratio was the most important influence on the xylose concentration followed by the linear effect of the acid concentration (Figure 4a). No statistical significance ($p < 0.05$) was observed for the interactions or the quadratic effects of this response variable. The positive effect of S:L ratio on xylose concentration indicates that high-xylose hydrolysates were obtained when high S:L ratios were used. Additionally, it should be noted that the magnitude of the linear effect of the S:L ratio, expressed in absolute value (16.98) was almost twice that of the linear effect of

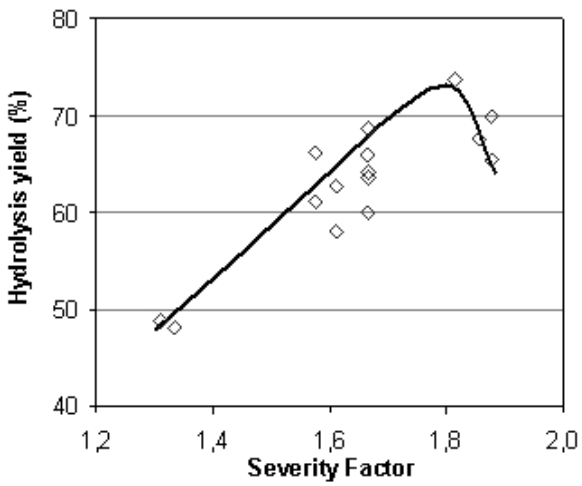


Figure 3. Hemicellulose hydrolysis yield of the acid pretreatment as a function of the severity factor for all experiments.

the acid concentration (9.03), and these were first and second in importance to xylose concentration, respectively.

In Figure 4b (Pareto chart for the hydrolysis yield) an opposite order in the importance of the factors can be observed. The linear effect of the acid concentration was the most important, followed by the linear effect of the S:L ratio, the magnitude of which was almost half that of the acid concentration. Again, only the linear effects of the acid concentration and S:L ratio showed statistical significance ($p > 0.05$). Furthermore, the linear effect of the S:L ratio on hydrolysis yield was negative, indicating that the use of low levels of this factor leads to a more effective extraction of xylose from the hemicellulosic fraction. Thus, the S:L ratio has opposite effects on xylose concentration and hydrolysis yield. In other words, to maximize xylose concentration a high S:L ratio should be used and to maximize hydrolysis yield a low S:L ratio should be used.

For the acetic acid concentration, while no clear relation with the severity factor was noticed, statistical significance for all the individual effects was observed (Figure 4c). The linear effect of the S:L ratio was more important, which is reasonable since acetic acid arises from the hemicellulose component. The higher the S:L ratio is the more acetic acid is released into the hydrolysate.

The sulfuric acid concentration appears as the factor with greatest effect on the concentration of furfural and hydroxymethylfurfural generated by sugar degradation (Figure 4e and Figure 4f). For these response variables, the linear effect of the time of exposure was second in importance, and it was statistically significant for both ($p < 0.05$). In addition, only the interaction of acid concentration with time of exposure and the linear effect of the S:L ratio

Table 3. Experimental design response variables for diluted acid hydrolysis.

Experiment	Xylose	Hydrolysis yield	Acetic acid	Furfural	Hydroxymethyl-furfural
1	56.96	48.9	5.85	0.36	0.06
2	67.53	58.0	7,40	0.89	0.08
3	51.56	66.4	6.27	0,35	0.05
4	48.64	62.6	5.57	0.86	0.08
5	71.12	61.0	7.77	0.86	0.10
6	76.25	65.4	11.00	2.25	0.12
7	51.38	66.2	5.76	0.80	0.07
8	54.31	69.9	5.80	2.00	0.10
9	44.80	48.1	4.42	0.31	0.05
10	68.63	73.6	6.54	2.00	0.10
11	82.11	59.9	10.42	1.28	0.10
12	44.87	63.6	5.40	1.06	0.07
13	60.47	64.9	5.96	0.76	0.06
14	63.04	67.6	6.82	1.57	0.11
15	61.51	66.0	7.54	1.19	0.09
16	63.91	68.6	7.68	1.11	0.08
17	59.84	64.2	7.42	1.12	0.08

showed statistical significance on furfural concentration, while the linear effect of the S:L ratio and the interaction of acid concentration with the S:L ratio showed statistical significance for hydroxymethylfurfural concentration.

The Pareto chart for phenolic compounds concentration (Figure 4d) indicates statistical significance only for the linear effect of the S:L ratio, with a positive influence. This result denotes constant extraction of the acid-soluble lignin in the range of the hydrolysis conditions evaluated.

A summary of the optimum level of each factor to maximize the performance of the diluted acid pretreatment is shown in Table 4. It became clear that high concentrations of sulfuric acid are necessary to obtain high xylose concentrations and hydrolysis yields during the

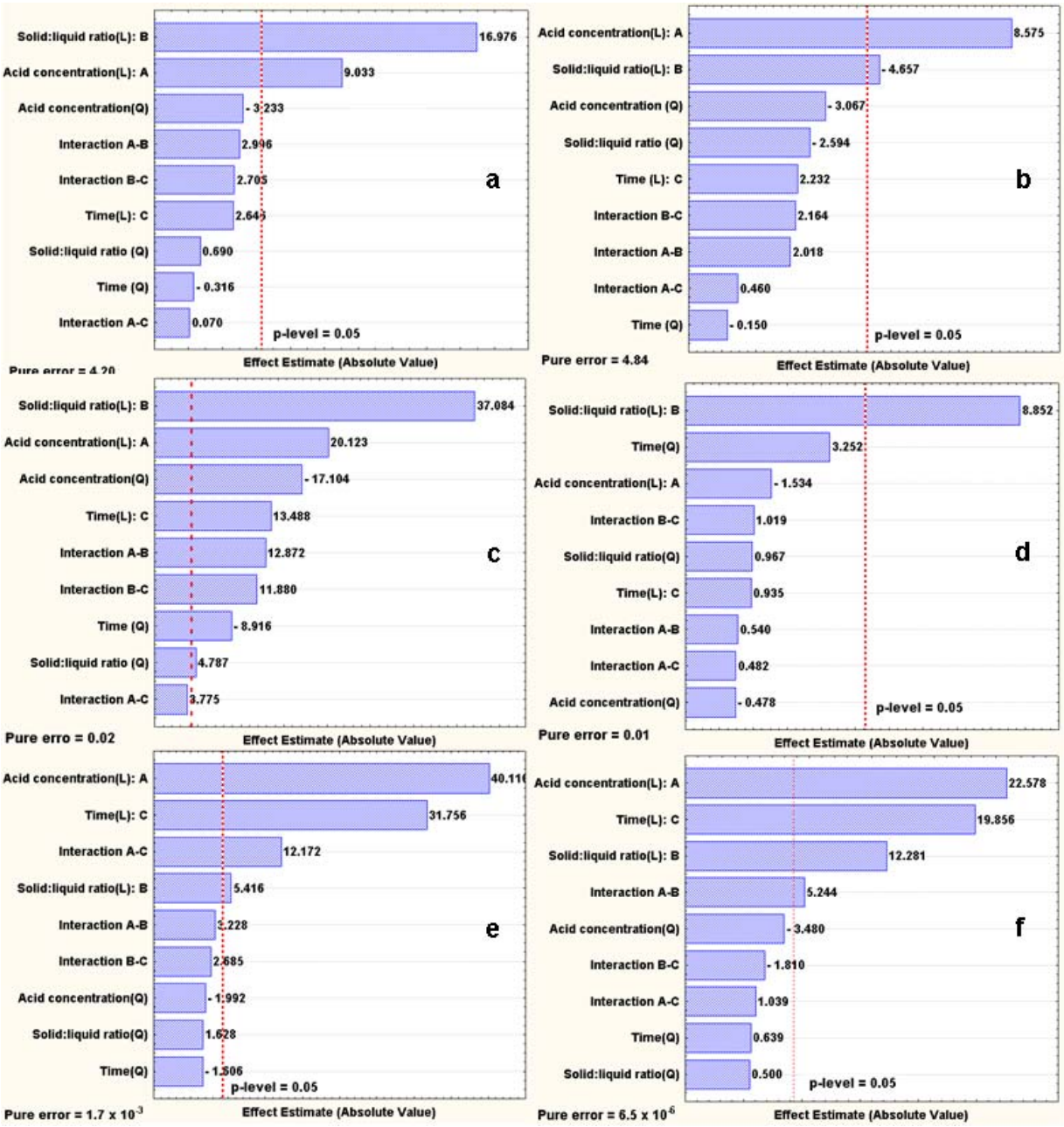


Figure 4. Pareto charts of standardized effects for (a) xylose (g/l); (b) hydrolysis yield (%); (c) acetic acid (g/l); (d) phenolic compounds (g/l); (e) furfural (g/l) and (f) hydroxymethylfurfural (g/l).
L: Linear effect.
Q: Quadratic effect.

Table 4. Optimum levels of the acid pretreatment factors for all the response variables.

Response variables for the hydrolysis process	Optimization criteria	Appropriated level		
		Acid concentration	Solid:liquid ratio	Time of exposure
Xylose concentration	Maximize	⇑	⇑	•
Hydrolysis yield	Maximize	⇑	⇓	•
Acetic acid concentration	Minimize	⇓	⇓	⇓
Furfural concentration	Minimize	⇓	⇓	⇓
Hydroxymethylfurfural concentration	Minimize	⇓	⇓	⇓
Phenolic compounds concentration	Minimize	•	⇓	•

⇑High levels, ⇓Low levels, • No statistical significance

pretreatment step, yet a low acid concentration is also necessary for controlling the concentration of inhibitors.

Since high S:L ratios resulted in high concentrations of xylose and inhibitors, an ideal condition should be determined for obtaining a high substrate concentration and hydrolysis yield with low levels of inhibitors.

Empirical models for each response variable (Equation 2) were obtained and used to determine the conditions for achieving the best performance of the pretreatment hydrolysis. The models for the pretreatment response variables had good coefficients of determination ($R^2 \geq 0.83$).

Response variable =

$\beta_0 + \beta_1$(Acid concentration) + β_{11}(Acid concentration)^2

+ β_2 (Solid:liquid ratio) + β_{22}(Solid:liquid ratio)^2

+ β_3(time) + β_{33}(time)^2

+ β_{12}(Acid concentration)(Solid:liquid ratio)

+ β_{13}(Acid concentration)(time)

+ β_{23}(Solid:liquid ratio)(time)

[Equation 2]

β: Empirical coefficient

The pretreatment conditions yielding the best hydrolysis performance were determined using the desirability function (Equation 3) under the optimization criteria described in Table 4. The experimental results of the optimized conditions (Table 5) were within the predicted confidence intervals for almost all variables. The furfural, hydroxymethylfurfural and phenolic concentrations were not within the confidence interval but had close values.

$$D = (d_1(Y_1) \text{ x } d_2(Y_2) \text{ x} \ldots \text{x } d_k(Y_k))^{1/K}$$

[Equation 3]

D: overall desirability

Y_i: Response variable

$d_i(Yi) = 0$ for undesirable value and $d_i(Yi) = 1$ for desirable value

k: number of response variables

Experiments were carried out to determined the hydrolysates fermentability (part II of this work) and further experiments will be done aimed at acclimatizing cells to hydrolysates containing high concentrations of the inhibitory substances generated during acid pretreatment.

CONCLUDING REMARKS

The severity factor had a very important influence on the xylose concentration and xylose yield, as well as on the generation of the inhibitors (furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid) during the diluted acid pretreatment. For some response variables, no relation with the severity factor could be established, which should be due to the absence of the S:L ratio in this expression.

Table 5. Predicted conditions for process optimization and their experimental validation.

Pretreatment conditions	Predicted conditions	
Acid concentration (% vv)	1.09	
S:L ratio (g:ml)	1:2.8	
Time of exposition (min)	27	
Response variables for the hydrolysis process	**Predicted values**	**Experimental values**
Xylose concentration (g/l)	54.61 ± 4.20	50.13
Hydrolysis yield (%)	66.40 ± 4.84	60.24
Acetic acid concentration (g/l)	5.65 ± 0.64	6.04
Furfural concentration (g/l)	0.48 ± 0.02	0.55
Hydroxymethylfurfural concentration (g/l)	0.05 ± 0.01	0.09
Phenolic compounds concentration (g/l)	1.92 ± 0.39	1.18

The use of statistical analysis allowed the individual effect of every acid pretreatment factor on the characteristics of the hydrolysates. Also, the conditions dictated by the statistical analysis were validated experimentally, and the results were in good agreement with the predictions.

REFERENCES

BALAT, Mustafá; BALAT, Havva and ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, October 2008, vol. 34, no. 5, p. 551-573.

BALAT, Mustafá and BALAT, Havva. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, November 2009, vol. 86, no. 11, p. 2273-2282.

BALLESTEROS, Ignacio; BALLESTEROS, Mercedes; MANZANARES, Paloma, NEGRO, M. José; OLIVA, J. Miguel and SÁEZ, Felicia. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 15 October 2008, vol. 42, no. 1, p. 84-91.

BAUDEL, Henrique M.; ZAROR, Claudio and de ABREU, César A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Industrial Crops and Products*, May 2005, vol. 21, no. 3, p. 309-315.

CHENG, Ke-Ke; CAI, Bai-Yan; ZHANG, Jian-An; LING, Hong-Zhi; ZHOU, Yu-Jie; GE, Jing-Ping and XU, Jing-Ming. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, 15 January 2008, vol. 38, no. 1, p. 105-109.

FOGEL, Rafael; GARCIA, Rafaela R.; OLIVEIRA, Rebeca; PALACIO, Denise; MADEIRA, Luciana and PEREIRA Jr., Nei. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March 2005, vol. 122, no. 1-3, p. 741-752.

GÁMEZ, Sara; GONZÁLEZ-CABRIALES, Juan José; RAMÍREZ, José Alberto; GARROTE, Gil and VÁZQUEZ, Manuel. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering,* May 2006, vol. 74, no. 1, p. 78-88.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J. and RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, November 2002, vol. 23, no. 5, p. 367-380.

LLOYD, Todd and WYMAN, Charles E. Application of a depolymerization model for predicting thermochemical hydrolysis of hemicellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March 2003, vol. 105, no. 1-3, p. 53-67.

LYND, Lee R.; van ZYL, Willem H.; McBRIDE, John E. and LASER, Mark. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, October 2005, vol. 16, no. 5, p. 577-583.

MOSIER, Nathan; WYMAN, Charles; DALE, Bruce; ELANDER, Richard; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, Mark and LADISCH, Michael. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, April 2005, vol. 96, no. 6, p. 673-686.

MUSSATO, Solange Inês and ROBERTO, Inês Conceição. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, September-October 2002, vol. 5, no. 28, p. 34-39.

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos R.; NIGAM, Poonam E. and SOCCOL, Vanete T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, August 2000, vol. 74, no. 1, p. 69-80.

PEREIRA Jr., Nei; COUTO, Maria Antonieta P.G. and SANTA ANNA, Lidia Maria M. *Series on biotechnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery*. Rio de Janeiro, Amigadigital press, 2008. 47 p. ISBN 978-85-903967-3-4.

QUEIROZ, Carla Regina Amorim dos Anjos; LEMOS, Sérgio Antônio de Morais and Do NASCIMENTO, Evandro Afonso. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, July-August 2002, vol. 26, no. 4, p. 485-492.

SANTA ANNA, Lídia Maria Melo; PEREIRA Jr, Nei; VARGAS BETANCUR, Gabriel Jaime; BEVILAQUA, Juliana Vaz; GOMES, Absai da Conceição and MENEZES, Emerson Pires. Processo de produção de etanol a partir do hidrolisado da fração hemicelulosica do bagaço de cana-de-açúcar em reator do tipo presa. *Instituto Nacional de Propriedade Industrial*, 2007, patent PI 0505299-9, Brasil.

SCHELL, Daniel J.; FARMER, Jody; NEWMAN, Millie and McMILLAN, James D. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March 2003, vol. 105, no. 1-3, p. 69-85.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0. Available from Internet: www.statsoft.com. Statsoft, Inc., 2002.

SUN, Ye and CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, May 2002, vol. 83, no. 1, p. 1-11.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; SANTAS, P.; SANTAS, R. and CORLETI, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*, January 2007, vol. 98, no. 2, p. 296-301.

WYMAN, Charles E.; DALE, Bruce E.; ELANDER, Richard T.; HOLTZAPPLE, Mark; LADISCH, Michael R. and LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, vol. 96, no. 18, December 2005, p. 1959-1966.

ZANIN, Gisella M.; SANTANA, Cesar C.; BON, Elba P.S.; GIORDANO, Raquel C.L.; De MORAES, Flavio F.; ANDRIETTA, Silvio R.; De CARVALHO NETO, Carlos Coelho; MACEDO, Isaias C.; FO, Djalma Lahr; RAMOS, Luiz P. and FONTANA, José D. Brazilian bioethanol program. *Applied Biochemistry Biotechnology*, March 2000, vol. 84-86, no. 1-9, p. 1147-1161.

Sugar Cane Bagasse as Feedstock for Second Generation Ethanol Production. Part II: Hemicellulose Hydrolysate Fermentability

Gabriel J. Vargas Betancur
Biochemical Engineering Department
Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Nei Pereira Jr.
Biochemical Engineering Department
Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Keywords: xylose fermentation, bioethanol, *Pichia stipitis*.

ABSTRACT

Sugar cane bagasse is produced in Brazil as waste of the sugar and ethanol industries. This lignocellulosic material is a potential source for second-generation ethanol production; however a pretreatment stage is essential, which aims at removing the hemicellulose component by disorganizing the lignocellulosic complex. In this work sugar cane bagasse was pretreated by diluted acid hydrolysis resulting in xylose-rich hydrolysates, which could be fermented to ethanol by a strain of the yeast *Pichia stipitis*. Statistical approach was used to investigate the effects of factors associated with the diluted acid hydrolysis process (acid concentration, solid:liquid ratio and time of exposure) on the fermentability of different hydrolysates. The statistical analysis was useful for determining the effects of the individual factors and their interactions on the response variables. An acid concentration of 1.09% (v/v), a solid:liquid ratio of 1:2.8 (g:ml), and an exposure time of 27 minutes were established and validated as the optimum pretreatment conditions for ethanol production from hemicellulose hydrolysates of sugar cane bagasse. Under these conditions, a hydrolysate with 50 g/l of xylose, 6.04 g/l of acetic acid, 0.55 g/l of hydroxylmethylfurfural and 0.09 g/l of furfural was obtained and its fermentation yielded roughly 20 g/l of ethanol in 40 h.

INTRODUCTION

The growth of population and the associated demand for fuel and goods coupled with more restrictive environmental regulations have intensified the research and development of renewable energy feedstocks to substitute for and/or to complement fossil fuel sources (Pereira et al. 2008). Lignocellulosic materials, especially agroindustrial residues, have been the subject of intense research since they are renewable sources of carbon and energy available in large amounts. Sugar cane bagasse is the main Brazilian agroindustrial residue, being produced at approximately 250 kg per ton of sugar cane (Zanin et al. 2000; Wyman et al. 2005). This lignocellulosic material is mainly composed of two polysaccharide fractions (cellulose and hemicellulose) and a polyphenolic macromolecule (lignin). Sugar cane hemicellulose is the second predominant fraction (23-30%), and it is composed of heteroxylans, with a predominance of xylose, which is configured in a chain that can be

chemically hydrolyzed (Sun and Cheng, 2002; Ververis et al. 2007). Diluted acid hydrolysis pretreatment of sugar cane bagasse allows the generation of a liquid phase (hemicellulose hydrolysate) rich in xylose, which can be used as substrate (building-block) for biotechnological and chemical processes (Lavarack et al. 2002; Fogel et al. 2005; Gámez et al. 2006).

The yeast *Pichia stipitis* is one of the best xylose-fermenting organisms to produce ethanol. Whereas in most bacteria the xylose metabolism proceeds via direct isomerization to xylulose, in yeasts and filamentous fungi the formation of xylulose occurs via a two-step reaction in which xylose is first reduced to xylitol by NADPH-dependent xylose reductase, followed by oxidation of xylitol to xylulose by NAD^+-dependent xylitol dehydrogenase. It is evident that under anaerobic conditions there will be an overproduction of NADH, resulting in a redox imbalance, which blocks the metabolic activity, since it can not be reoxidized in the absence of oxygen. However, in xylose-fermenting yeasts, such as cells of *Pichia stipitis*, these two first enzymes of xylose catabolism display dual coenzyme specificity. Thus, the reducing equivalents produced in the second reaction can be used for the initial step of xylose metabolism, therefore reducing the overproduction of NADH, and consequently alleviating the cell redox imbalance. Nonetheless, micro aeration conditions will be necessary, since this dual specificity does not occur in the same extent. In the next step, phosphoketolase incorporates inorganic phosphate into xylulose to produce xylulose-5-P, which is converted into glyceraldehyde 3-P and fructose 6-P in the pentose phosphate pathway. Both are converted into pyruvate through the glycolytic pathway, which gives origin to ethanol through two sequential reactions (decarboxylation and reduction) (Toivari et al. 2001; Jin and Jeffries, 2004; Jeffries 2006; Pereira Jr. et al. 2008).

Yeast growth and sugar fermentation can be inhibited by different compounds generated during the acid hydrolysis of hemicellulose. Xylose, the main hemicellulose-derivative pentose, and hexoses may be dehydrated during acid hydrolysis into furfural and 5-hydroxymethyl furfural, respectively, which have been reported as potent inhibitors of yeast enzymes such as alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase (Modig et al. 2002; Balat et al. 2008). Also, Pampulha and Loureiro (1990) showed the action of the undissociated form of acetic acid that diffuses into yeast cells, reducing the cytoplasm pH and modify the control of glycolysis involving enolase and phosphorilating enzymes. Phowchinda et al. (1995) showed the inhibitory effect of acetic acid on the growth and fermentation activity of *Saccharomyces cerevisiae* and indicated that it had more impact on biomass synthesis than on ethanol production. Nonetheless, the simultaneous presence of these compounds has a greater inhibitory effect on yeast metabolism than do their individual presence (Palmqvist et al. 1999).

Thus, this work aimed at characterizing the individual effects of sulfuric acid concentration, solid:liquid (S:L) ratio and the time of exposure, as well as their synergic effects on the hydrolysate fermentability and its relation with the concentrations of inhibitors by a strain of the yeast *Pichia stipitis*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and inoculum preparation

The fermentation assays were carried out with the yeast *Pichia stipitis* 5774 from the Central Bureau voor Schimmelcultures (CBS) – The Netherlands. The strain was stored at 5°C in agar slant medium containing xylose (5 g/l), yeast extract (2 g/l) and peptone (5 g/l) (Pereira and Bu´lock, 1994). Cell propagation was performed in two stages using hydrolysate obtained in pretreatment condition of 121°C during 40 min. with a solid:liquid ratio of 1:2 (g of bagasse:mL of 1% sulfuric acid solution). In the first stage, cells were transferred from the agar slant to liquid medium containing 25% hydrolysate, and in the second stage the hydrolysate content was increased to 50%. Then cells necessary for each fermentation assay was separated from media by centrifugation at 4000 rpm during 4 min. For the propagation stages, the liquid medium was supplemented with urea (2.5 g/l); KH_2PO_4 (2.2 g/l); yeast extract (4 g/l) and 40 ml/l of a solution of salts (Pereira and Bu´lock, 1994).

Fermentation assays

Hemicellulose hydrolysates were obtained by diluted acid pretreatment using a central composite design with the following factors: time of exposure, concentration of sulfuric acid and solid-liquid ratio for a total of 17 experimental runs (central point performed in triplicate). The temperature was kept constant at 121°C (Vargas and Pereira Jr., 2010). The levels for each variable are shown in Table 1.

Table 1. Levels for each factor in the experimental design.

Factor	Axial point (-α)	Low level (-1)	Central level (0)	High level (+1)	Axial point (+α)
Time of exposure (min.)	27	40	60	80	93
Acid concentration (% vv)	0.50	0.75	1.13	1.50	1.75
Solid:liquid ratio (g:ml)	1:3.3	1:3.0	1:2.5	1:2.0	1:1.7

After acid pretreatment, the liquid phase (hemicellulose hydrolysate) was separated from the solid by a pressure filter set within the reaction system (Santa Anna et al. 2007). Then, the pH of the liquid phase was adjusted to 6 by addition of $Ca(OH)_2$, and the generated $CaSO_4$ was separated by filtration. The liquid phase, called hemicellulose hydrolysate, had its sugar and inhibitor contents determined, and was used for fermentation assays.

The fermentations were carried out in conical flasks (500 ml) containing 200 ml of hydrolysate supplemented with the same nutrients as the propagation media. The fermentation media were inoculated with an initial cell concentration of 10 g/l and performed on a rotary

shaker (Excella E25 – New Brunswick) at 200 rpm for 48 h at 30°C with an initial pH of 6. To validate the fermentability of the hydrolysates in the best pretreatment condition, a fermentation was performed in a 2l-Biostat B fermenter (B. Braun) containing 800 ml of medium with control of agitation (250 rpm), temperature (30°C) and air supply (0.02 vvm). The pH was maintained at 6 by the addition of 2 M NaOH or 2 M HCl solutions.

Analytical Methods

Xylose, ethanol and xylitol concentrations in the hydrolysates and fermented media were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Aminex HPX-87P column (Bio-rad) maintained at 65°C and with a differential refractive index detector (Waters). Furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid concentration was determined by HPLC using a KC811 column (Shodex) with a UV detector at 230 nm (Waters). The cell concentration was determined by a correlation between cell dry mass and cell suspension absorbance at 570 nm.

The hydrolysis factors were used to determinate the severity factor (Equation 1), as proposed by Schell et al. (2003), and its relation with the response variables was established. Additionally, the effects of each individual factor and its interactions were analyzed using the software STATISTICA 6.0 (StatSoft, 2002).

$$\text{Severity factor} = \text{Log}_{10}\left(\text{time.exp}\left[\frac{\text{Temperature} - 100}{14.75}\right]\right) - \text{pH} \qquad \text{Equation (1)}$$

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrolysates characteristics were discussed previously (part I of this work). Hydrolysates fermentability was investigated by using a strain of the yeast *P. stipitis* and monitoring the final concentrations of ethanol and xylitol after 48 h (Table 2). Total consumption of xylose was achieved for the majority of the experiments, except for those coded as 2, 3, 6, 11 and 15, corresponding to high severity conditions and with residual xylose concentrations below 5 g/l.

Table 2. Xilose content in the hydrolysate and response variables for the fermentability of hydrolysates by *P. stipitis* after 48 h.

Experiment	Severity Factor	Xylose (g/l)	Ethanol (g/l)	Xylitol (g/l)	$Y_{Ethanol/S}$ (g/g)	$Y_{Xylitol/S}$ (g/g)	Ethanol/xylitol ratio (g/g)
1	1.31	56.96	17.71	5.04	0.31	0.09	3.51
2	1.61	67.53	22.46	11.91	0.34	0.18	1.89
3	1.31	51.56	18.47	2.33	0.36	0.05	7.94
4	1.61	48.64	14.85	10.47	0.30	0.21	1.42
5	1.58	71.12	19.40	15.49	0.27	0.21	1.25
6	1.88	76.25	13.73	11.72	0.18	0.15	1.17
7	1.58	51.38	18.28	4.60	0.35	0.09	3.97
8	1.88	54.31	17.48	9.71	0.32	0.18	1.80
9	1.34	44.80	18.45	3.70	0.41	0.08	4.98
10	1.81	68.63	20.88	13.64	0.30	0.19	1.53
11	1.67	82.11	16.23	14.39	0.27	0.24	1.13
12	1.67	44.87	18.69	6.09	0.41	0.13	3.07
13	1.32	60.47	20.65	7.23	0.34	0.12	2.86
14	1.86	63.04	22.55	10.61	0.35	0.16	2.13
15	1.67	61.51	18.98	8.87	0.30	0.14	2.14
16	1.67	63.91	20.31	10.16	0.31	0.16	2.00
17	1.67	59.84	20.68	9.99	0.34	0.16	2.07

The final ethanol concentration varied between 13.73 g/l and 22.55 g/l with xylitol production as an intermediate metabolite in concentrations ranging from 2.33 g/l to 15.49 g/l. The highest ethanol concentrations (experiments 2, 10, 13, 14, 16 and 17) were not coincident with the highest xylose content in the hydrolysates (experiments 5, 6 and 11). Xylitol synthesis increased as xylose content increased in the hydrolysate, especially in experiments 5 and 11. This result confirms that hydrolysis under severe conditions (1.7), as used in experiment 11, leads to high xylose content in the hydrolysate, yet no efficient ethanol production is achieved during the fermentation. Additionally, the two best ethanol/xylitol ratios (7.94 g/g and 4.98 g/g) were obtained from pretreatments carried out under moderate severity conditions (1.31 and 1.34 for experiments 3 and 9, respectively).

No correlation was found between the severity factor and ethanol concentration or yield. In contrast, the ethanol/xylitol ratio decreased dramatically when the severity factor increased (Figure 1). It is well known that xylitol is a fungal-compatible solute (Davis et al. 2000), and its accumulation during fermentation is considered to be a cellular response to the medium's adversities, be it by the redox imbalance that can be caused under oxygen restriction, high substrate concentration or the presence of inhibitors that may be generated during the pretreatment stage, particularly if high severity conditions are imposed.

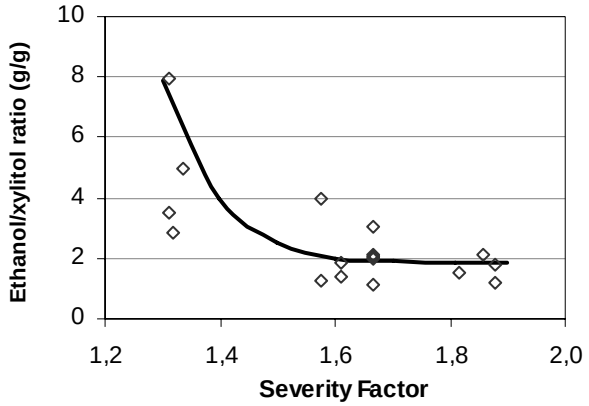
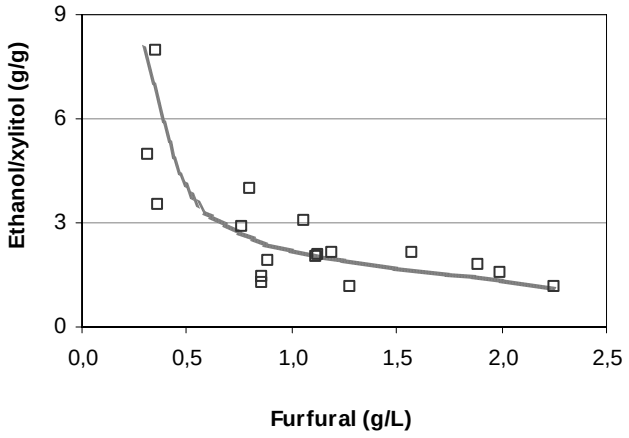
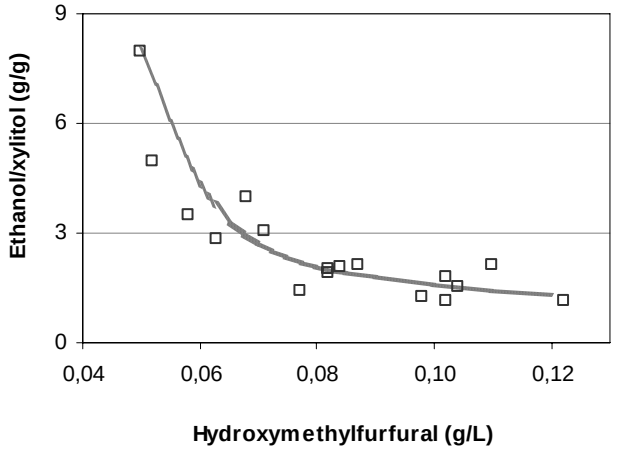


Figure 1. The influence of the severity factor on ethanol/xylitol ratio.





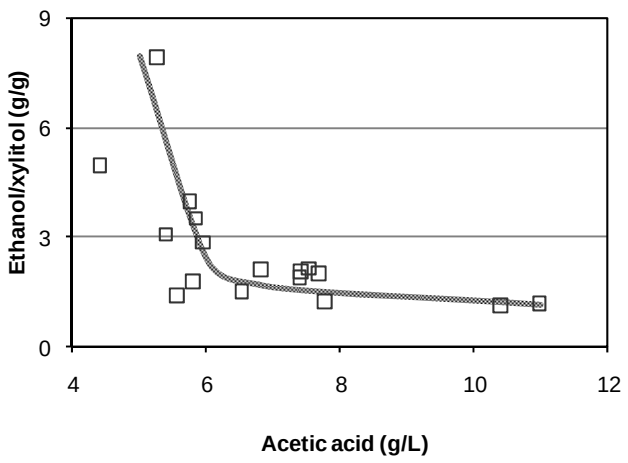


Figure 2. Effect of inhibitors on the ethanol/xylitol ratio

Figure 2 shows the effect of inhibitors on the yeast metabolic product distribution during fermentation. The ethanol/xylitol ratio decreases when the concentration of inhibitors (furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid) increases. Initially, the ethanol/xylitol ratio decreases sharply when the concentration of furfural increases from 0.4 g/l to 0.8 g/l, and then it continues to diminish, but more slowly. The same performance was observed for hydroxymethylfurfural and acetic acid, with sharp declines for concentrations up to 0.07 g/l and 6 g/l, respectively. Both furans and acetic acid are reported to be inhibitors of *Pichia stipitis* yeast (Modig et al. 2002; Balat et al. 2008). The increase in xylitol yield as the severity factor rises can be ascribed to the increasing concentration of inhibitors during acid pretreatment that are generated in harsher conditions. It seems that xylitol, apart from being a compatible solute, has other protective functions for the cell.

The linear effect of the S:L ratio and the acid concentration were the most important factors determining ethanol yield (Figure 3a) and the only ones with statistical significance ($p<0.05$). All factors during the acid pretreatment showed statistically significant effects on the ethanol/xylitol ratio, except for the quadratic effect of the S:L ratio and its interaction with the acid concentration (Figure 3b). The negative values of the effects indicate that high ethanol/xylitol ratios, ideal for the ethanol fermentation of hemicellulose hydrolysates, requires short exposure times and low acid concentrations and S:L ratios, within the range evaluated. However, these conditions lead to the generation of hydrolysates with low xylose content and consequently low ethanol concentration in the fermentation process, which is not technologically sound. Figure 3b also shows that the linear effect of time of exposure is negative, which means that as exposure time gets shorter the ethanol/xylitol ratio gets higher, within the range evaluated.

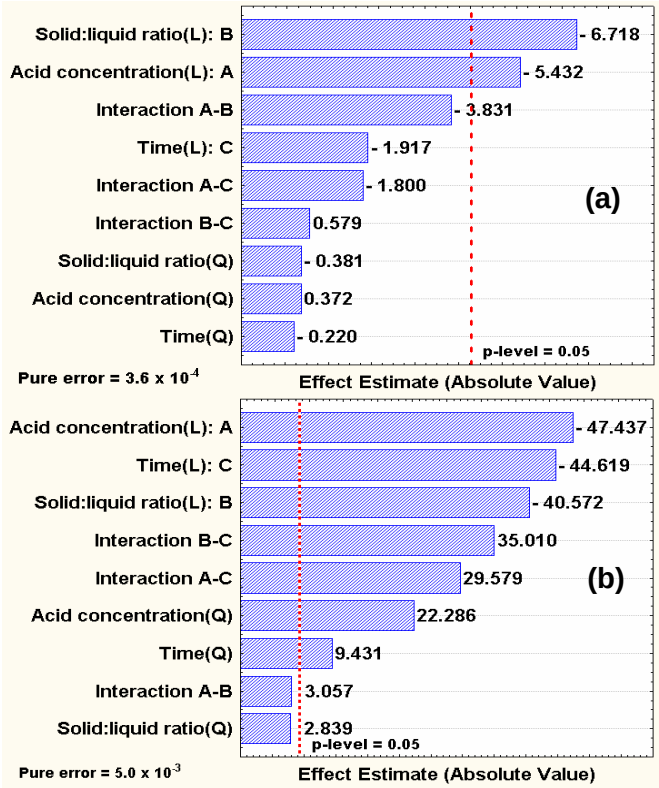


Figure 3. Pareto charts of standardized effects for (a) ethanol yield on substrate consumed (g/g) and (b) ethanol/xylitol ratio (g/g).(L): Linear effect; (Q): Quadratic effect

Empirical models for each response variable (equation 2) were obtained and used to determine the conditions for achieving the best performance of the pretreatment hydrolysis and the fermentation process. The final ethanol concentration model was not statistically significance, which resulted in a low coefficient of determination (R^2=0.47). On the other hand, the empirical model for xylitol concentration had a very good coefficient of determination (R^2=0.92). In the case of the ethanol and xylitol yields during the fermentation process, the empirical models had coefficients of determination of 0.73 and 0.88, respectively, corroborating the greater mathematical model fit for xylitol than for ethanol yield. For the ethanol/xylitol ratio, the empirical model showed statistical significance and a good coefficient of determination (R^2=0.88).

$$\begin{aligned} \textit{Response variable} = \; & \beta_o + \beta_1\,(\textit{Acid concentration}) + \beta_{11}\,(\textit{Acid concentration})^2 \\ & + \beta_2\,(\textit{Solid:liquid ratio}) + \beta_{22}\,(\textit{Solid:liquid ratio})^2 \\ & + \beta_3\,(\textit{time}) + \beta_{33}\,(\textit{time})^2 \\ & + \beta_{12}\,(\textit{Acid concentration})(\textit{Solid:liquid ratio}) \\ & + \beta_{13}\,(\textit{Acid concentration})(\textit{time}) \\ & + \beta_{23}\,(\textit{Solid:liquid ratio})(\textit{time}) \end{aligned} \qquad \text{(Equation 2)}$$

β : Empirical Coefficient

The pretreatment conditions yielding the best process performance were determined using the desirability function (Equation 3) (Statistica 6.0, 2002) under optimization criteria to maximize the xylose concentration, ethanol concentration and ethanol/xylitol ratio and to minimize the xylitol concentration and yield. The experimental results of the optimized conditions (Table 3) were within the predicted confidence intervals for the xylitol and ethanol concentrations, even without statistical significance for the ethanol concentration model.

$$D = (d_1(Y_1) \times d_2(Y_2) \times \ldots \times d_k(Y_k))^{1/K} \qquad \text{(Equation 3)}$$

D: overall desirability
Y_i: Response variable
$d_i(Yi) = 0$ for undesirable value and increase to $d_i(Yi) = 1$ for desirable value
k: number of response variables

Table 3. Predicted process conditions, using empirical models, for process optimization and their experimental validation.

Pretreatment Conditions	Predicted conditions	
Acid concentration (% vv)	1.09	
S:L ratio (g:ml)	1:2.8	
Time of exposition (min.)	27	
Response Variables for the Fermentation Process	Predicted Values	Experimental values
Ethanol concentration (g/l)	20.58±0.80	19.05
Xylitol concentration (g/l)	2.77±0.49	2.86

Figure 4 shows the hydrolysate fermentation carried out under the pretreatment predicted conditions. The process began with fast xylose uptake and ethanol production. Both rates diminished after 15 h, and total xylose consumption was achieved at the end of 40 h. Cell growth was not observed, which may be due to the hydrolysate composition and fermentation conditions, especially the oxygen supply, which was low enough (Q_V=0.02 v.v.m) to assure ethanol fermentation in detriment to cell growth (Jeffries et al. 2007).

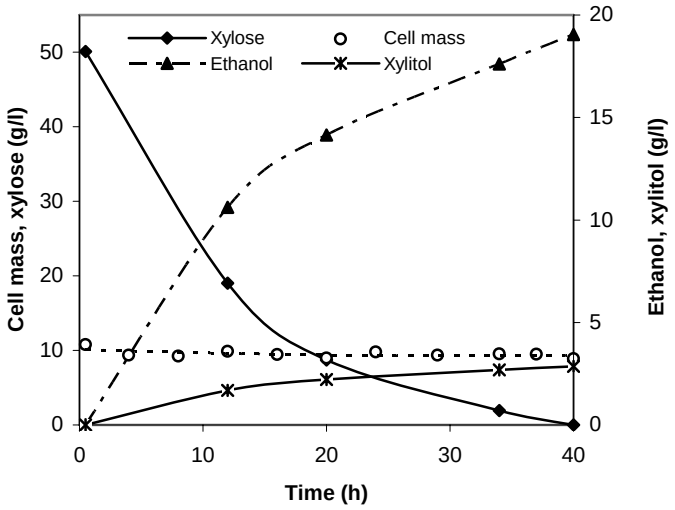


Figure 4. Fermentation performance of hemicellulosic hydrolysate obtained from optimized conditions.

CONCLUSIONS

The severity factor showed inversely proportional effect on ethanol/xylitol ratio, whilst no tendency was observed with the ethanol concentration. Furfural, hydroxymethylfurfural, and acetic acid concentrations have strong influence on the metabolic distribution products during the hydrolysate fermentation. The use of statistical analysis allowed the individual effect of every acid pretreatment factor on hydrolysates fermentability to be determined. Also, the conditions dictated by the statistical analysis were validated experimentally with good agreement with the predictions. In the experimental validation a hydrolysate with 50 g/l of xylose, 6.04 g/l of acetic acid, 0.55 g/l of hydroxylmethylfurfural and 0.09 g/l of furfural was obtained and final ethanol concentration of 20.6 g/l was achieved during fermentation.

REFERENCES

BALAT, Mustafá; BALAT, Havva and OZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, October 2008, vol. 34, no. 5, p. 551-573.

DAVIS, Diana J.; BURLAK, Christopher and MONEY, Nicholas P. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research*, July 2000, vol. 104, no. 7, p. 800-804.

FOGEL, Rafael; GARCIA, Rafaela R.; OLIVEIRA, Rebeca; PALACIO, Denise; MADEIRA, Luciana and PEREIRA Jr., Nei. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and invetigations on its fermetability for production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March 2005, vol. 122, no. 1-3, p. 741-752.

GÁMEZ, Sara; GONZÁLEZ-CABRIALES, Juan Jose; RAMÍREZ, José Alberto; GARROTE, Gil and VÁZQUEZ, Manuel. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, May 2006, vol. 74, no. 1, p. 78-88

JEFFRIES, Thomas W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. June 2006, vol. 17, no. 3, p: 320-326.

JEFFRIES, Tomas W.; GRIGORIEV, Igor V.; GRIMWOOD, Jane; LAPLAZA, José M.; AERTS, Andrea; SALAMOV, Asaf; SCMUTZ, Jeremty; LINDQUIST, Erika; DEHAL, Paramvir; SHAPIRO, Harris; JIN, Yong-Su.; PASSOTH, Volkmar and RICHARDSON, Paul M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, March 2007, vol. 25, no. 3, p. 319-326.

JIN, Yong-Su and Jeffries, Thomas W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, July 2004, vol. 6, no. 3, p. 175-244.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J. and RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, November 2002, vol. 23, no. 5, p. 367-380.

MODIG, Tobias; LIDEN, Gunnar and TAHERZADEH, Mohammad J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical journal*, May 2002, vol. 363, no. 3, p. 769-776.

PALMQVIST, Eva; GRAGE, Halfdan; MEINANDER, Nina Q. and HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoid acid on growth ethanol productivity of yeast.. *Biotechnology and Bioengineering*, April 1999, vol. 63, no. 1, p. 46-55.

PAMPULHA, M.E. and LOREIRO-DIAS, M.C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, December 1990, vol. 34, no. 3, p. 375-380.

PEREIRA Jr., Nei and BU'LOCK, John Desmond. The Ionic Character of the Environment in the Flocculation of *Pichia stipitis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, June 1994, vol. 25, no. 1, p. 51-56.

PEREIRA Jr., Nei; COUTO, Maria Antonieta P.G. and SANTA ANNA, Lidia Maria M. *Series on biotechnology: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery*. Rio de Janeiro, Amigadigital press, 2008. 47 p. ISBN 978-85-903967-3-4.

PHOWCHINDA, O.; DÉLIA-DUPUY M.L. and STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermenting activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, February 1995, vol. 17, no. 2, p. 237-242.

SANTA ANNA, Lídia Maria Melo; PEREIRA Jr, Nei; VARGAS BETANCUR, Gabriel Jaime; BEVILAQUA, Juliana Vaz; GOMES, Absai da Conceição and MENEZES, Emerson Pires. Processo de produção de etanol a partir do hidrolisado da fração hemicelulosica do bagaço de cana-de-açúcar em reator do tipo presa. *Instituto Nacional de Propriedade Industrial*, 2007, patent PI 0505299-9, Brasil.

SCHELL, Daniel J.; FARMER, Jody; NEWMAN, Milli and McMILLAN, James D. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, March 2003, vol. 105, no. 1-3, p. 69-85.

STATSOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0. Available from: www.statsoft.com. Statsoft, Inc., 2002.

SUN, Ye and CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, May 2002, vol. 83, no. 1, p. 1-11.

TOIVARI, Mervi H.; ARISTIDOU, Aristos; RUOHONEN, Laura and PENTTILÄ Merja. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of Xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. *Metabolic Engineering*, July 2001, vol. 3, no. 3, p. 236-249.

VARGAS BETANCUR, Gabriel J. and PEREIRA Jr., Nei. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. (2010) IN PRESS. Available from: http://www.ejbiotechnology.info/content/next/abstract/a11.html#. ISSN 0717-3458.

VERVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; SANTAS, P.; SANTAS, R. and CORLETI, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*, January 2007, vol. 98, no. 2, p. 296–301.

WYMAN, Charles E.; DALE, Bruce E.; ELANDER, Richard T.; HOLTZAPPLE, Mark; LADISCH, Michael R. and LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, December 2005, vol. 96, no. 18, p. 1959-1966.

ZANIN, Gisella M.; SANTANA, Cesar C.; BON, Eelba P.; GIORDANO, Raquel C.L.; De MORAES, Flavio F.; ANDRIETTA, Silvio R.; De CARVALHO NETO, Carlos Coelho; MACEDO, Isaias C.; FO, Djalma Lahr; RAMOS, Luiz P. and FONTANA, José D. Brazilian

bioethanol program. *Applied biochemistry Biotechnology*, March 2000, vol. 84-86, no. 1-9, p. 1147-1161.