

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

RAQUEL DE FÁTIMA RODRIGUES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DO
BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR POR LEVEDURAS ISOLADAS DO BIOMA
AMAZÔNICO**

Recife

2014

RAQUEL DE FÁTIMA RODRIGUES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DO
BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR POR LEVEDURAS ISOLADAS DO BIOMA
AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial do centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dr. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Co-orientador: Prof^o Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

Recife

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Raquel de Fátima Rodrigues de
Produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da
cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico/– Recife: O
Autor, 2014.

65 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Coorientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia
industrial, 2014.

Inclui bibliografia e apêndices

- 1. Etanol 2. Bagaço de cana 3. Leveduras I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro (orientadora) II. Moraes Júnior, Marcos Antônio (coorientador) II. Título**

662.6692

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 172

RAQUEL DE FÁTIMA RODRIGUES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DO
BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR POR LEVEDURAS ISOLADAS DO BIOMA
AMAZÔNICO**

Aprovada em: __/__/__

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Prof^a Dr^a Ester Ribeiro Gouveia

Prof^a Dr^a Fernanda Cristina Bezerra leite

Recife, 27 de fevereiro de 2014.

***Dedico este trabalho a minha família,
especialmente a minha mãe
minha maior incentivadora e
acima de tudo a Jeová Deus que me
guiou no caminho certo a seguir.***

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e compreensão.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial.

A FACEPE pela bolsa de estudo.

A professora Dr^a Tânia Stamford pela orientação e compreensão.

Ao professor Dr^o Marcos Morais pela orientação e que desde a graduação tem demonstrado sua confiança no meu trabalho.

Ao secretário da pós Klayton Cabral pelas gentilezas e prontidão em atender cada pedido com um largo sorriso.

Aos integrantes do Núcleo de Engenharia Metabólica pelo apoio, tenho orgulho de fazer parte deste grupo composto por pessoas tão comprometidas com a pesquisa e com um alto padrão de qualidade científica.

Ao Prof. Carlos Augusto Rosa do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais por ter cedido às linhagens de levedura deste projeto.

Ao professor Dr^o Irapuan Pinheiro (UPE) por permitir as análises no HPLC.

A Issac e Aldenise, técnicos do Labio (laboratório de bioprocessos) pela disposição em ajudar quando necessário.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) por disponibilizar toda a infraestrutura necessária para realização dos experimentos.

A Emmanuel Dutra doutorando do Departamento de Energia Nuclear (DEN) que me ajudou não só com a parte experimental (designificação, hidrólises enzimáticas e coletas de experimentos) mas também no tratamento de dados.

A melhor turma de mestrado: Lívia, Temístocles, Edinaldo, Graciely, Milca, Rafaela, Bruno, Márcia e Mariana. Tenho certeza que não há turma semelhante a nossa em nenhum lugar.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a composição deste trabalho.

RESUMO

A busca por uma fonte de energia que seja renovável e economicamente viável tem incentivado a pesquisa e inovação tecnológica para a utilização de resíduos como substrato que serão convertidos pelos micro-organismos em etanol. O objetivo deste trabalho foi produzir etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico. O bagaço foi submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. Foi realizada a caracterização do bagaço *in natura* e deslignificado. Os experimentos foram realizados em meio sintético contendo xilose como fonte de carbono, sendo as fermentações realizadas a 30°C e 120 rpm. Após o pré – tratamento houve aumento da celulose. Não foram observadas nas hidrólises enzimáticas diferenças significativas, para a eficiência em glicose, quando se variava a carga de sólidos, mas se fixava a carga enzimática. Mas houve diferença significativa para as eficiências em xilose. A carga de enzima de 10 FPU/ g de bagaço com carga de sólidos de 7,5 g (13%) foi escolhida para a fermentação por ter maior concentração de açúcares (celobiose, glicose, xilose) utilizando a menor carga enzimática. Dentre as leveduras utilizadas na fermentação de xilose em meio sintético (*Spathaspora passalidarum*: UFMG HMD 10.2; 14.2; 16.2 e 1.1; *Candida shehatae*: UFMG HM 51.3 e 52.2; *Candida sp* UFMG HMD 25.1; *Spathaspora brasilienses* UFMG HMD 19.3; *Spathaspora suhii* sp UFMG XMD 16.2 e *Spathaspora roraimanensis* UFMG XMD 23.2), a levedura *S. passalidarum* HM 14.2 foi a linhagem que apresentou a maior produção de etanol 16,01 g/L e maior produtividade 0,22 g/L.h. O rendimento da *S. passalidarum* HM 14.2 após 72 h de fermentação do hidrolisado enzimático foi de 0,32 g/g e a produtividade 0,34 g/L.h. *S. passalidarum* HMD 14.2 é a levedura indicada para testes complementares apresentando potencial de aplicabilidade na área industrial na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: Lignocelulose. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática. Etanol.

ABSTRACT

The search for a source of energy that is renewable and economically viable encouraged the research and technological innovation for the use of waste as a substrate to be converted by microorganisms into ethanol. The aim of this work was to produce ethanol from enzymatic hydrolysis of the bagasse of cane sugar by yeasts isolated from the Amazon biome. The bagasse was subjected to pretreatment with alkaline hydrogen peroxide. Characterization of bagasse in nature and deslignificado was performed. The experiments were performed in a synthetic medium containing xylose as a carbon source; the fermentation is carried out at 30 ° C and 120 rpm. After the pretreatment was increased cellulose. There were observed significant differences in the enzymatic hydrolysis to glucose in efficiency when the solids loading varied, but fixed enzyme loading. But there was significant difference for efficiencies in xylose. The enzyme load of 10 FPU / g pulp with solids loading of 7.5 g (13 %) was chosen for the fermentation of sugars having a greater concentration (cellobiose, glucose, xylose) using reduced enzyme loading. Among the yeasts used in fermentation of xylose in synthetic medium (*Spathaspora passalidarum*: UFMG HMD 10.2, 14.2 , 16.2 and 1.1 ; *Candida shehatae*: UFMG HM 51.3 and 52.2; *Candida sp* UFMG HMD 25.1; *Spathaspora brasilienses* UFMG HMD 19.3 ; *Spathaspora suhii* sp UFMG XMD 16.2 and *Spathaspora roraimanensis* UFMG XMD 23.2) the yeast *S. passalidarum* HM 14.2 was the lineage with the highest ethanol 16.01 g / L and greater productivity 0.22 g / L. h. The yield of *S. passalidarum* HM 14.2 after 72 h of fermentation of the enzymatic hydrolyzate was 0.32 g / g and productivity 0.34 g / L. h. *S. passalidarum* 14.2 HMD is yeast suitable for complementary tests have potential applicability in industry in the production of second generation ethanol.

Key-words: Lignocellulose . Pretreatment . Enzymatic Hydrolysis. Ethanol

LISTA DE FIGURAS

Figura	3.1	Ilustração simplificada que mostra a produção de bietanol e principais desafios (retirado de RODRIGUES, 2011).....	17
Figura	3.2	Esquema dos caminhos que podem ser tomados para transformar a hemicelulose e a celulose em etanol. (retirado de GANAPATHY <i>et al</i> , 2010)	19
Figura	3.3	Ação do pré-tratamento sob o material lignocelulósico (retirado de MOSIER <i>et al.</i> , 2005 adaptado de HSU <i>et al.</i> , 1980)	20
Figura	3.4	Molécula de celulose e locais onde atuam a β -glicosidade, celobiohidrolase e endoglucanase (retirado de KUMAR <i>et al.</i> , 2008)	23
Figura	3.5	Fluxograma da via metabólica de obtenção de xilitol e etanol a partir dos açúcares glicose, xilose e arabinose (retirado de Arruda, 2007)	25
Figura	4.1	Sistema de extração com aparelho Soxhlet	29
Figura	5.1	Espectro do FTIR, para o bagaço da com e sem tratamento com o peróxido de hidrogênio alcalino.....	42
Figura	5.2	Eficiência em glicose dos hidrolisados enzimáticos após 72 h, variando a carga de sólidos e carga enzimática.....	44
Figura	5.3	Eficiência em xilose dos hidrolisados enzimáticos após 72 h, variando a carga de sólidos e carga enzimática.....	46
Figura	5.4	Cinética do consumo dos açúcares fermentescíveis total, produção de etanol e biomassa durante a fermentação pela linhagem <i>S. passalidarum</i> HMD 14.2.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela	5.1	Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.....	40
Tabela	5.2	Atividade enzimática da FibreZyme™ LDI	43
Tabela	5.3	Perda de massa após 72 h de hidrólise enzimática à 10 e 20 FPU	47
Tabela	5.4	Parâmetros fermentativos de linhagens fermentadoras de xilose em meio sintético no intervalo de 72h	50
Tabela	5.5	Produção de etanol por diferentes materiais lignocelulósicos e tratamentos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBU	Cellobiose Unity
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
CV	Coeficiente de Variação
DNSA	ácido 3,5 – dinitrosalicílico
EG	Eficiência em glicose
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Eq.	Equação
EX	Eficiência em xilose
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente Neutro
FPU	Filter Paper Unit (Unidades filtro de papel)
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier)
HE	Hidrólise enzimática
HMF	5-hidroximetil-2-furaldeído
LDA	Lignina detergente ácido
OAFEX	Expansão de fibra por ácido oxálico
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Peróxido de Hidrogênio alcalino
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
RPM	Rotações por minuto
YNB	Yeast Nitrogen base medium

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Álcool combustível no Brasil	16
3.2 Composição do bagaço da cana-de-açúcar	18
3.3 Pré-tratamento de material lignocelulósico	19
3.4 Hidrólise enzimática.....	22
3.5 Leveduras na produção de etanol	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Bagaço da cana-de-açúcar	26
4.2 Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar	26
4.3 Caracterização da biomassa	27
4.3.1 Análise do bagaço pré-tratado por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	27
4.3.2 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina	27
4.3.3 Determinação dos extrativos do bagaço	28
4.3.4 Determinação do teor de cinzas totais	29
4.4 Determinação da atividade enzimática	29
4.4.1 Determinação da atividade da xilanase	30
4.4.2 Determinação da atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)	30
4.4.3 Determinação da atividade da avicelase	30
4.4.4 Determinação da atividade da celulase (FPU)	31
4.4.5 Determinação da atividade da β-glucosidase.....	32
4.5 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	33

4.6	Microrganismos	34
4.7	Meios de cultura	35
4.8	Inóculo	35
4.9	Fermentações	36
4.9.1	Fermentação de xilose	36
4.9.2	Fermentação do hidrolisado lignocelulósicos	36
4.9.3	Fermentação do meio sintético	37
4.10	Quantificação do crescimento	37
4.11	Determinação dos carboidratos, glicerol e etanol	38
4.12	Determinação dos açúcares redutores	38
4.13	Determinação de Etanol	38
4.14.	Determinação de Glicerol	39
4.15	Determinação da perda de massa após a hidrólise enzimática	39
4.16	Análise estatística	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1.	Caracterização da biomassa do bagaço de cana com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino	40
5.2	Hidrólise Enzimática do bagaço de cana	43
5.3	Seleção de linhagens de leveduras fermentadoras de xilose	47
5.4	Fermentação do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente	51
6	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICE A - Liberação de glicose e xilose na hidrólise enzimática ao final das 72 h, glicose e xilose presentes no complexo enzimático e eficiência glicose (EG) e xilose (EX) para carga enzimática de 10 FPU...	65
	APÊNDICE B - Liberação de glicose e xilose na hidrólise enzimática ao final das 72 h, glicose e xilose presentes no complexo enzimático e eficiência glicose (EG) e xilose (EX) para carga enzimática de 20 FPU...	65

1 INTRODUÇÃO

A busca por uma fonte de energia que seja renovável e economicamente viável tem incentivado a pesquisa e inovação tecnológica para a utilização de alternativas ao uso do petróleo (GIRIO *et al*, 2010). Dentre estas fontes alternativas, a mais utilizada é o etanol produzido pela fermentação da cana-de-açúcar, da beterraba, e do amido de milho. No particular caso da cana-de-açúcar, a sacarose, que é proveniente do caldo da cana-de-açúcar, é a matéria prima usada para a produção de etanol e o bagaço da cana-de-açúcar representa o principal resíduo gerado neste processo industrial. Neste sentido, o melhor aproveitamento deste resíduo vem sendo estudado para que contribua com o aumento da produção de etanol sem aumentar a área de cana plantada.

O Brasil é o primeiro em tecnologia no ramo sucroalcooleiro, isso se deve principalmente pelo grande incentivo na década de 1970 com o programa Proálcool. (EMBRAPA, 2011). Além disso, as condições climáticas permitem que o Brasil seja capaz de permanecer nesta posição notável, de maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, e possa aumentar ainda mais sua produção sem comprometer a produção de alimentos (CANILHA *et al.*, 2011; CANILHA *et al.*, 2012).

Mesmo com todo esse progresso tecnológico no ramo sucroalcooleiro apenas um terço da cana é aproveitado para produção de etanol, enquanto que os outros dois terços restantes são deixados no campo (a palha) para a decomposição (CORTEZ *et al.*, 2008) ou queima para geração de eletricidade na própria usina, sendo o excedente vendido para o consumo da população (CANILHA *et al.*, 2011). Hoje existe uma grande expectativa quanto ao uso de resíduos lignocelulósicos como alternativas para a geração de biocombustíveis, sendo o bagaço de cana-de-açúcar o substrato de maior relevância para a produção do álcool de segunda geração (SOCCOL *et al*, 2009; CADETE *et al*, 2012b). Se houvesse um maior aproveitamento do resíduo gerado por hectare plantado aumentaria sua produtividade, uma forma de aproveitamento seria o uso do bagaço moído para a produção de etanol de segunda geração e o uso de folhas e partes superiores para a geração de eletricidade (CANILHA *et al.*, 2011).

O bagaço da cana-de-açúcar é um resíduo rico em lignocelulose, um polímero usado para a produção de biocombustíveis (ZALDIVAR *et al*, 2001). A lignocelulose

é composta pelos seguintes polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose e a celulose são compostas na sua estrutura de moléculas de açúcares fermentescíveis. Porém para a utilização do bagaço para a produção de etanol é necessário que este seja pré-tratado para deslignificação e que os açúcares fermentescíveis sejam disponibilizados através da hidrólise enzimática e consumidos na fermentação (CORREIA *et al.*, 2013).

A fermentação alcoólica é um processo microbiológico através do qual os açúcares são metabolizados para a formação de gás carbônico e etanol pela ação das leveduras. Dentre as leveduras envolvidas no processo fermentativo para a produção de álcool a *Saccharomyces cerevisiae* é comumente utilizada no setor industrial. Entretanto esta levedura não possui a capacidade de converter açúcar do tipo pentose em etanol (JOJIMA *et al* 2010, MIRANDA, 2011). Por esse motivo, neste trabalho foram utilizadas leveduras isoladas do bioma brasileiro pelo grupo do professor Carlos Rosa (UFMG) que possuem a capacidade de assimilar xilose e produzir etanol. A seleção desta levedura deve levar a um aproveitamento melhor dos açúcares presentes no bagaço.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o rendimento fermentativo de leveduras isoladas do bioma amazônico utilizando meio sintético contendo xilose e hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar como fontes de carbono para a produção de etanol de segunda geração.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar um isolado dentre as espécies *Spathaspora passalidarum*, *Candida shehatae*, *Candida sp*, *Spathaspora brasilienses*, *Spathaspora suhii* sp e *Spathaspora roraimanensis*, que apresenta maior rendimento na conversão de xilose em etanol em meio sintético;
- Determinar a melhor razão entre carga de sólidos e carga enzimática para produção de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar;
- Caracterizar o perfil fermentativo do isolado utilizando o bagaço de cana hidrolisado enzimaticamente por meio dos parâmetros de produção de etanol rendimento e produtividade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Álcool combustível no Brasil

Na década de 70, foi lançado no Brasil, o Programa Proálcool para incentivo ao setor sucroalcooleiro. Com o Proálcool, houve no país grande desenvolvimento tanto em relação ao plantio da cana-de-açúcar, quanto em relação à produção de etanol. Isso também ocorreu pelo alto preço do petróleo e uso de carros movidos a biocombustíveis. O país hoje é o primeiro em tecnologia no ramo sucroalcooleiro (EMBRAPA, 2011) e o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. (CANILHA *et al.*, 2011; CANILHA *et al.*, 2012).

De acordo com o Conab (companhia de abastecimento) a previsão para a safra de 2013 / 2014 do total de cana-de-açúcar para ser moída é de 652,02 milhões de toneladas com aumento de 10,7% em relação à safra 2012/2013. Quanto a produção de açúcar estimasse que o aumento seja apenas de 1,23 % chegando a 38,81 milhões de tonelada de açúcar e 27,66 bilhões de litros de etanol. Um dado bastante relevante é que o Brasil quando se trata de produção de etanol perde apenas para os Estados Unidos (EUA) (UNICA, 2013). Levando em consideração que cada tonelada de cana processada pela usina gera entre 270 a 280 Kg de bagaço (CANILHA *et al.*, 2012) a estimativa é que seja gerada nesta safra 2013/2014 cerca de 176 – 182,6 milhões de tonelada de bagaço.

A cada ano o rendimento da produção de cana-de-açúcar vem aumentando e de acordo com o Ministério da Agricultura, para os próximos anos, estima-se um aumento considerável da exportação do açúcar, bem como da produção do álcool combustível. Espera-se que em 2019 sejam exportadas 32,6 milhões de toneladas de açúcar e produzidos 58,8 bilhões de litros de etanol, sendo que destes 50 bilhões serão para o consumo interno (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013). Dentre os estados do país, São Paulo é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar, possuindo 68 % das plantações do Brasil (OGEDA; PETRI, 2010).

Na maioria das usinas os três principais produtos, açúcar, etanol e bioenergia, são obtidos através de um processo industrial integrado como mostra a Figura 3.1 (RODRIGUES, 2011; AMORIM *et al.*, 2011). Considerando apenas a produção de etanol, as etapas envolvidas são: após a cana ser colhida, lavada, moída, e filtrada,

então o caldo, ou suco da cana-de-açúcar, passa pelo processo de decantação, clarificação, concentração e é misturado com o fermento que consiste de células da levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (8-15%). Após o período de 6-8h de fermentação o mosto fermentado é centrifugado para retirar as células de levedura. O mosto fermentado é então destilado para a obtenção do etanol.

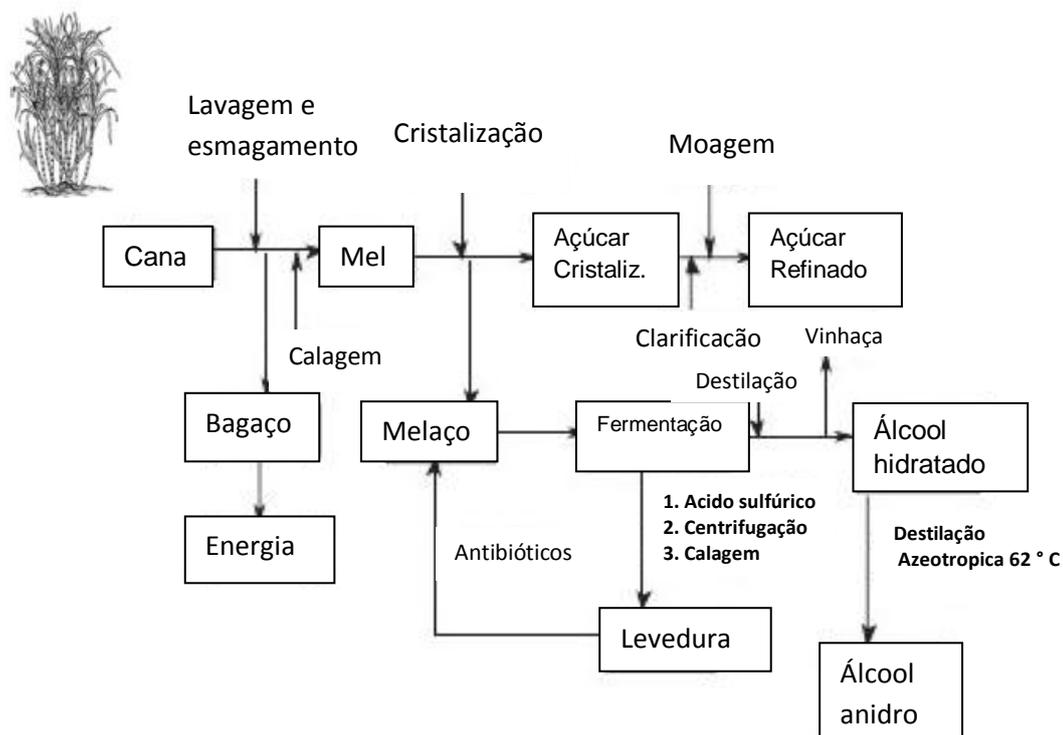


Figura 3.1 - Ilustração simplificada do processo de produção de bioetanol (retirado de RODRIGUES, 2011).

No processo da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar o bagaço é um dos principais resíduos e sua utilização para gerar álcool de 2ª geração (etanol produzido por meio de resíduos ricos em carboidratos e renováveis) poderia representar um ganho para o setor sucroalcooleiro, em razão de que um terço do custo da produção está relacionado com a aquisição da matéria prima e, neste caso, a indústria já possui esta matéria prima em seus pátios. Estes dados potencializam a importância do uso do bagaço para a produção do etanol.

3.2 Composição do bagaço da cana-de-açúcar

A composição do bagaço de cana pode ser dividida em três componentes básicos: hemicelulose (25-35 %), celulose (42-50 %) e lignina (15-25 %). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo formada por hexoses (β -D-glicose, β -D-manose, α -D-galactose), pentoses (β -D-xilose, α -D-arabinose) e ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e ácido α -D-galacturônico). Há gramíneas em que as xilanas (polímero da xilose) podem chegar até a 50 % dessa fração. (KUMAR *et al*, 2008; GÍRIO *et al*, 2010). De acordo com o tipo de resíduo vegetal a estrutura da composição da hemicelulose pode variar (CHANDEL *et al.*, 2011). A hemicelulose possui uma alta flexibilidade e está altamente ligada a celulose, podendo formar correntes que unem microfibrilas de celulose em uma rede uniforme, a qual possui a função de proteção, visto que impedem o contato direto entre as microfibrilas (Fig. 3.3).

A celulose é um homopolissacarídeo linear composta por unidades de glicose com ligações β -(1-4) (KUMAR *et al.*, 2008). Os glucanos (polímeros de glicose) estão ligados um ao outro por ligações de hidrogênio chamadas de “elementar e microfibrilas”. Estas fibras ligam-se uma as outras por intermédio da hemicelulose. Por possuir uma estrutura ordenada (cristalina) e dispor de uma forma de feixes ou microfibrila, isto torna a celulose resistente a ambos os tratamentos químicos e biológicos (RAVEN *et al.*, 1992) A celulose por sua função de sustentação vegetal, apresenta a característica de ser extremamente insolúvel em água (OGEDA, PETRI, 2010).

A lignina é constituída de uma complexidade molecular que a torna difícil de ser degradada. É constituída de unidades de fenilpropano ligadas em estruturas tridimensionais. Quanto maior for a porcentagem de lignina na planta maior será sua resistência à degradação por via química ou enzimática e por isso constitui um desafio na utilização de material lignocelulósico para produção de etanol (TAHERZADEH; KARIMI, 2008) uma vez que esta precisa ser removida.

Assim, para que a celulose e a hemicelulose sejam quebradas em seus componentes monoméricos de açúcares é necessário que haja um pré-tratamento do bagaço para a separação dos três componentes da lignocelulose seguida de uma hidrólise enzimática (Fig. 3.2). Depois dessa hidrólise torna-se possível a

fermentação microbiana desses açúcares em etanol (SHIELDS; BOOPATHY, 2011; AITA *et al*, 2011)

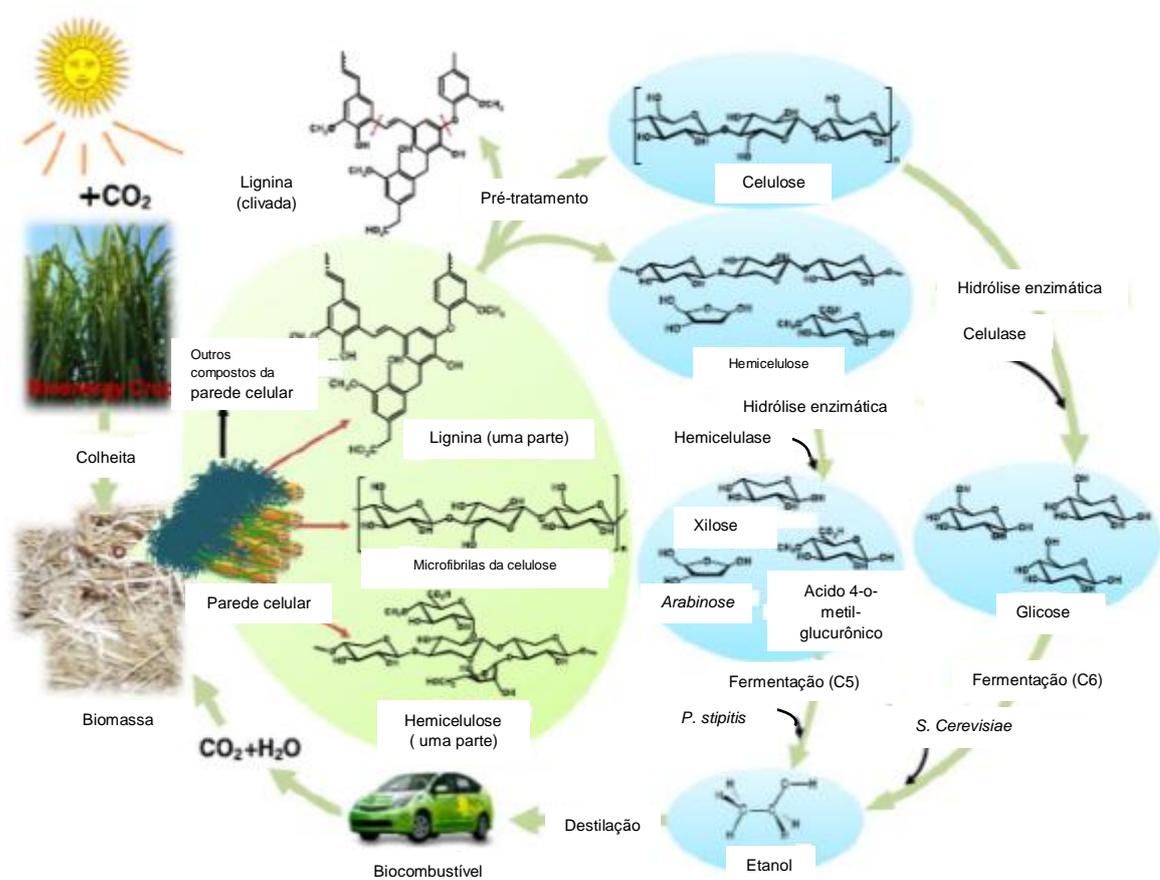


Figura 3.2 - Esquema dos caminhos que podem ser tomados para transformar a hemicelulose e a celulose em etanol (retirado e adaptado de GANAPATHY *et al*, 2010).

3.3 Pré-tratamento de material lignocelulósico

O pré-tratamento do bagaço é o primeiro passo para a produção de biocombustível. Por esse motivo várias pesquisas têm sido desenvolvidas para se estabelecer um pré-tratamento que seja eficaz na obtenção de uma eficiência alta em açúcares fermentescíveis (ROCHA *et al.*, 2013).

Esta etapa é bastante relevante para que ocorra a modificação da biomassa celulósica, tornando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis para ação das enzimas aumentando a eficiência da hidrólise enzimática que resulta na liberação de

açúcares fermentescíveis (MOSIER *et al.*, 2005). A figura 3.3 ilustra a influência do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.

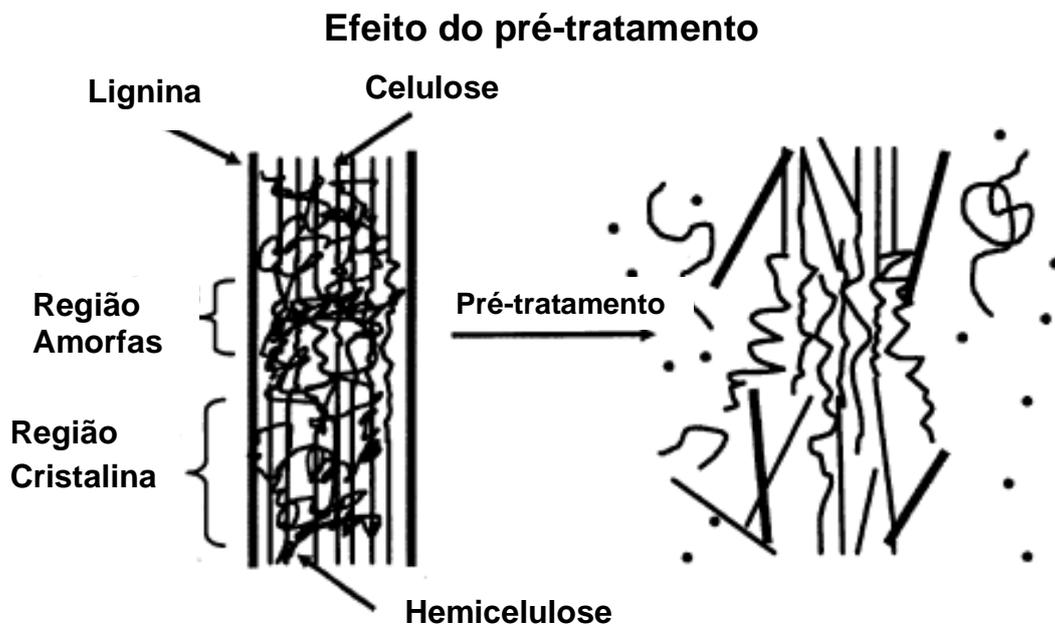


Figura 3.3 – Ação do pré-tratamento sob o material lignocelulósico (retirado de MOSIER *et al.*, 2005 adaptado de HSU *et al.*, 1980)

Diferentes pré-tratamentos tem sido testados e sugeridos nas últimas décadas. Estes podem ser do tipo: biológico (utilizando fungos de diferentes espécies ou bactérias), químico (alcalino, ácido, ozonólise, solventes orgânicos e líquidos iônico), físico-químico (explosão à vapor: SO_2 –explosão à vapor, *liquid hot water*, expansão de fibra com amônia (AFEX), oxidação úmida, micro-ondas, ultrassom e explosão com CO_2) e Físico (Moagem ou vibração- seca ou úmida). Poucas referências existem quanto à comparação dos custos relacionados aos pré-tratamentos (OGEDA; PETRI, 2010; ALVIRA *et al.*, 2010). Em trabalho publicado em 2005, EGGEMAN; ELANDER realizaram uma análise econômica quantitativa de cinco pré-tratamentos (ácido diluído, água quente, explosão fibra amônia (AFLEX), percolação por reciclagem da amônia (ARP) e lime) para a liberação de açúcares da palha do milho, onde afirmaram que fatores como rendimento dos açúcares

(pentose e hexose), carga e atividade enzimática e concentração de sólidos afetaram diretamente a economia do processo.

Um pré-tratamento considerado ideal deve preencher alguns requisitos como: consumir pouca água, não liberar inibidores, ter um bom rendimento em açúcar em pouco tempo, utilizar pouca carga enzimática, ser econômico e compatível com altas cargas de biomassa (BANERJEE *et al.*, 2011).

A hidrólise química é mais comumente utilizada através do uso de agentes oxidantes, ácidos diluídos, solventes orgânicos e posteriormente de agentes alcalinos ou ácidos para elevação ou diminuição do pH do hidrolisado quando necessário (GIRIO *et al.*, 2010).

As principais tecnologias desenvolvidas para o pré-tratamento estão envolvidas com o uso de agentes químicos. Neste tipo de processo, de acordo com o tipo de pré-tratamento escolhido haverá diferentes mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular, que resultam em uma ação enzimática mais eficiente, com rendimentos maiores (OGEDA; PETRI, 2010). Podemos citar, por exemplo, os tratamentos que usam ácidos, os quais hidrolisam a camada da hemicelulose enquanto que os que utilizam base retiram parte da lignina (ALVIRA *et al.*, 2010; MOSIER *et al.*, 2005).

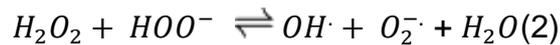
Dentre os pré-tratamentos químicos existentes, o oxidativo utilizando peróxido de hidrogênio alcalino para realizar a deslignificação (retirada parcial da lignina) do bagaço vem despertando interesse pelas suas vantagens que são: baixo custo de energia, visto que é realizado a temperatura e pressão ambiente e fácil disponibilidade de aquisição do H_2O_2 e do NaOH principais reagentes utilizados na reação de deslignificação (BANERJEE *et al.*, 2011) além de não produzir os inibidores furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (CORREIA *et al.*, 2013; SAHA; COTTA, 2007). O resultado após a deslignificação será o resíduo celulósico altamente sensível ao ataque das enzimas que serão usadas na hidrólise. É de extrema relevância entender as reações na formação dos íons envolvidos na deslignificação.

O peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes que possui um caráter bastante versátil, sendo superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Embora tenha alto poder de reação, é um produto metabólico natural em alguns organismos e quando decomposto torna-se oxigênio molecular e água (MATTOS *et al.*, 2003).

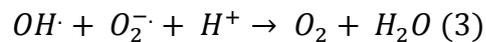
Em meio líquido alcalino o peróxido reage formando o ânion hidroperóxido, como mostra a equação (1).



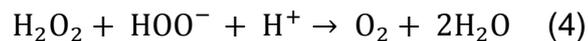
O ânion hidroperóxido nesta solução alcalina pode reagir com H_2O_2 que acarreta a formação do radical hidroxila e superóxido, equação (2).



Os radicais hidroxila e superóxido, na ausência de outros reagentes ou radicais podem combinar-se gerando oxigênio e água, como mostra a equação 3.



Podemos então por meio dessas equações 1,2 e 3 montar a reação global da decomposição do H_2O_2 , equação 4.



São gerados nesta reação 0,5 mol de O_2 para cada mol de H_2O_2 adicionado. Entretanto, quando há presença de outros compostos que podem reagir com os radicais formados na equação 2, ou seja, com o radical hidroxila e o superóxido, o resultado é que uma quantidade menor de O_2 é produzida. Estes radicais formados pela decomposição do H_2O_2 em meio alcalino irão atacar principalmente a estrutura da lignina (GOULD, 1985).

As principais desvantagens citadas (BANERJEE *et al.*, 2011) são o custo do H_2O_2 , o sal residual gerado pela adição de ácido clorídrico para a correção do pH para a hidrólise enzimática e a necessidade da hidrólise enzimática como mais uma etapa para o processo.

3.4 Hidrólise enzimática

A segunda etapa, depois que ocorre o pré-tratamento e a exposição da hemicelulose e celulose com a remoção parcial da lignina é a hidrólise enzimática. A classificação das enzimas é dada pelo tipo de reação que elas catalisam. As que são usadas nas reações de hidrólise, transferem grupos funcionais para a água, são as hidrolases (NELSON; COX, 2011).

A enzima responsável pela quebra do polímero da celulose é a celulase. A enzima celulase é um complexo enzimático, que possui três classes de enzimas que

atuam sinergicamente, ou seja, de forma conjunta. Sendo essas três classes subdivididas em: endo-1,4- β -D-glucanases ou endoglucanases (responsável pela quebra de ligações glicosídicas criando novos terminais) exo-1,4- β -D-glucanases ou celobio-hidrolases (atua nos terminais formados pela endoglucanases, formando a celobiose) e 1,4- β -D-glucosidases que irão quebrar a celobiose em glicose (Figura 3.4) (OGEDA; PETRI, 2010).

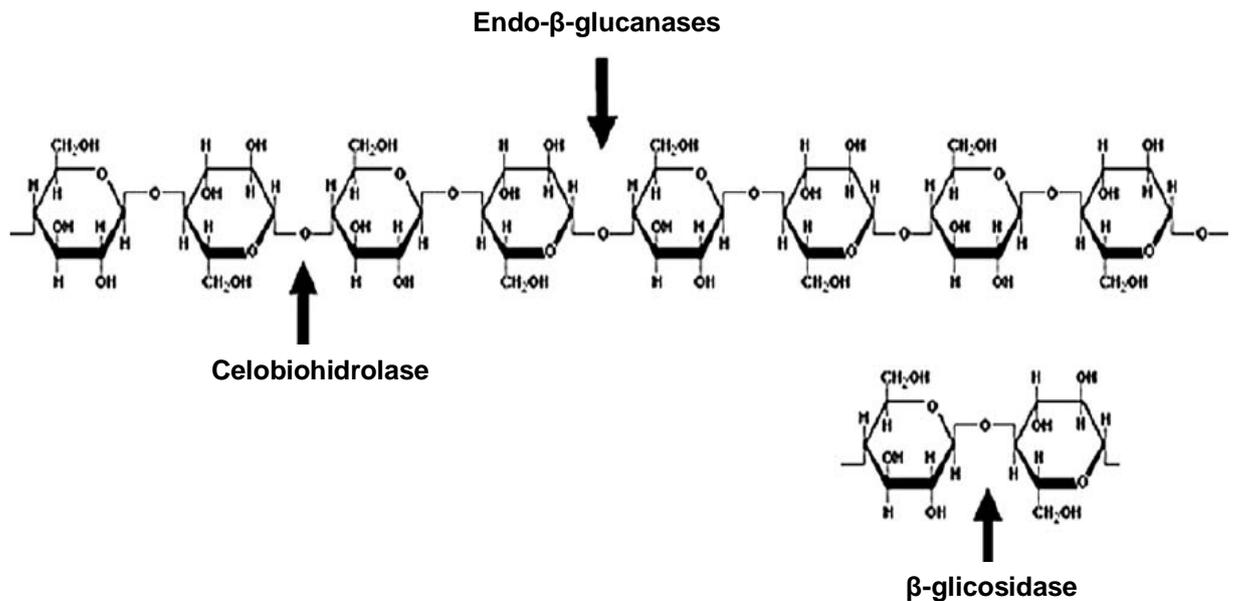


Figura 3.4 - Molécula de celulose e locais onde atuam a β -glicosidase, celobiohidrolase e endoglucanase (retirado de KUMAR *et al.*, 2008).

O segundo maior polissacarídeo presente na natureza é a hemicelulose (o primeiro é a celulose). A quebra dos polímeros da hemicelulose ocorre pela ação conjunta de endoenzimas, que quebram a cadeia principal, das enzimas exoenzimas, que liberam açúcares monoméricos, e das auxiliares, que quebram as cadeias laterais (oligossacarídeos) onde ocorre a liberação de mono ou dissacarídeos dependendo do tipo de hemicelulose. Quanto à quebra das cadeias de xilanos (polissacarídeo de xilose), as enzimas envolvidas nesta hidrólise são: endo-1,4- β -D-xilanase (hidrolisando as ligações β -1,4 da molécula de xilana) e β -xilosidases (hidrolisam xilooligossacarídeos curtos a xilose), estas atuarão na cadeia principal dependendo do xilano envolvido. Outras enzimas que estão envolvidas na quebra da hemicelulose são: α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil xilana esterases e ferruloil esterases (ARO *et al.*, 2005).

A hidrólise enzimática pode ser realizada separadamente da fermentação alcoólica, um processo conhecido como Fermentação e Hidrólise Separada (SHF), ou ambos os processos podem ser realizados ao mesmo tempo como a Fermentação e Sacarificação Simultâneas (SSF). A temperatura ótima de ativação das enzimas fica entre 40-50°C, enquanto que a temperatura que as leveduras desempenham suas funções celulares ocorre entre 28 e 35°C. Sendo assim, embora na SSF a produção de etanol seja rápida, com a glicose formada sendo simultaneamente fermentada a etanol, o fator limitante decorre da diferença de temperatura dos dois processos (SOCCOL *et al.*, 2010). Desta forma, a conversão da lignocelulose em etanol é bastante complexa e seu sucesso depende da eficiência e viabilidade econômica da produção desta energia renovável a um preço competitivo para o setor de transportes (AITA *et al.*, 2011).

3.5 Leveduras na produção de etanol

As leveduras utilizadas como microrganismos fermentadores nas destilarias devem apresentar certas características, como: velocidade de fermentação; tolerância ao álcool; alto rendimento e boa adaptabilidade ao ambiente do processo. Vários trabalhos têm sido realizados para isolamento de linhagens presentes no processo que apresentam estas características (SILVA-FILHO, *et al.*, 2005; BASSO, *et al.* 2008). A *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura utilizada na indústria, entretanto é incapaz de usar a xilose ou arabinose como fonte de carboidrato para produção de etanol (JOJIMA *et al.*, 2010, MIRANDA, 2011). Essa sua incapacidade é devido à ausência na sua rota metabólica de enzimas que convertam xilose a xilitol (xilose redutase) e xilitol a xilulose (xilitol desidrogenase) (Figura 3.5).

As leveduras *Pichia stipitis* e *Candida shehatae* apresentam bons rendimentos em etanol a partir da fermentação de xilose. Recentemente foi descoberta a levedura *Spathaspora passalidarum* que também possui esta capacidade fermentativa, mostrando um bom potencial para ser utilizada na produção de etanol lignocelulósico (NGUYEN *et al.*, 2006; HOU; YAO, 2011). Além disso, linhagens da espécie *Spathaspora* foram isoladas no Brasil e também possuem a capacidade de fermentar xilose (CADETE *et al.*, 2009; CADETE *et al.*, 2012b). A capacidade demonstrada por essas linhagens é possível devido à presença das

enzimas (xilose redutase e xilitol desidrogenase) que possibilitam que a xilose seja metabolizada e prossiga pela via das pentoses (JEFFRIES, 2008) e produza etanol.

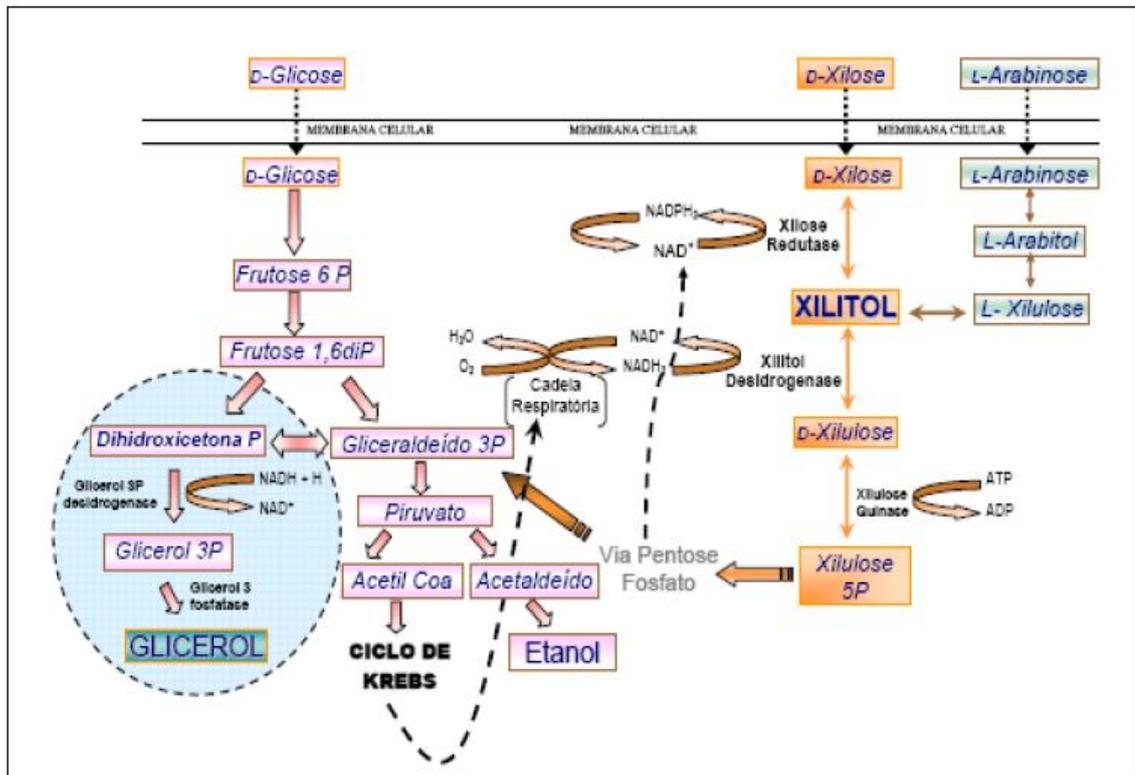


Figura 3.5- Fluxograma da via metabólica de obtenção de xilitol e etanol a partir dos açúcares glicose, xilose e arabinose (retirado de Arruda, 2007).

Nesse contexto de produção de etanol de segunda geração deve-se levar em conta a possibilidade de utilização das duas frações da biomassa pré-tratada: celulose e hemicelulose. Até o momento as pesquisas relacionadas à fermentação de xilose têm focado na utilização da levedura *Pichia stipitis* ou no desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*. Mas os resultados mostram baixas eficiências e necessidade de micro-oxigenação. Por isso, faz-se necessário a busca por outras leveduras que naturalmente possam produzir etanol a partir de xilose em alto rendimento fermentativo. O presente trabalho visa estudar as leveduras que foram isoladas do bioma brasileiro que possuem a capacidade de assimilar e converter xilose a etanol, determinar a carga de sólidos e concentração da enzima para que obtenha a melhor eficiência na produção de açúcares fermentáveis e caracterizar seu perfil fermentativo em bagaço de cana hidrolisado.

5 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bagaço da cana-de-açúcar

O bagaço utilizado neste trabalho foi cedido pela usina Japungu (Santa Rita, PB, Brasil), sendo este previamente esmagado. Para a remoção dos açúcares residuais e impurezas que pudesse existir, o bagaço foi lavado e seco por aproximadamente 48 h a 45°C, logo após este período o mesmo foi processado por um moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas, tipo Willye (Marconi/ MA 680) com malha de peneira de 20 MESH. Este bagaço triturado foi condicionado em sacos no freezer até o uso.

4.2 Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar

Foram pesados 20g de bagaço de cana-de-açúcar já triturado e seco na granulometria de 20 MESH e transferidos para um Erlenmeyer de 1L. Em seguida adicionou-se 160 mL da solução de peróxido de hidrogênio 7,5 % (v/v), 40 mL de hidróxido de sódio 5M, somando o volume final de 200 mL e tendo o pH de 11,5. Uma gota de TWEEN 80 foi adicionada. Os Erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora orbital a 25°C e 150 rpm por 1h , segundo Rabelo *et al.*, (2008).

Em seguida o material deslignificado foi filtrado e a fração sólida lavada com 1,5L de água destilada a temperatura de 65 - 70 °C para a remoção da lignina e sólidos solúveis. Logo após a lavagem a fração sólida foi para a estufa de circulação de ar a 60 °C por 48 h. Após este tempo pesou-se o material para verificar a perda de massa pelo tratamento em relação ao inicial. Conforme a equação 4.1.

$$PM (\%) = \frac{PI - PF}{PI} \times 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde:

PM (%) = Perda de massa (em porcentagem)

PF = Peso final (em g)

PI = Peso Inicial (em g)

4.3 Caracterização da biomassa

4.3.1 Análise do bagaço pré-tratado por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O bagaço *in natura* e pré-tratado (deslignificado) foram lavados e secos a 65 °C até peso constante e foram submetidas à análise de FTIR. Os espectros foram coletados em espectrômetro Vertex 70 (Bruker optics, Alemanha) com resolução de 4 cm⁻¹ sendo efetuadas 64 scans por amostra numa faixa de número de ondas de 500 a 4500 cm⁻¹ no modo de atenuação total de refletância (ATR).

4.3.2 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina

A caracterização do bagaço antes e depois do pré-tratamento quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina foram realizadas segundo a metodologia de Van Soest (1963) e foram expressos em base seca.

Pesou-se 0,5 g de biomassa seca e foi acondicionada em saquinhos próprios para digestão. O saquinho foi adicionado em recipiente plástico contendo 80 mL de solução detergente neutro. O sistema foi submetido a aquecimento a 100°C por 1h em autoclave. Após este tempo o saquinho foi removido e lavado (3X) com água quente (~100°C). Em seguida foi para a secagem em estufa a 105°C por 72h. Depois desse período retirou-se o saquinho da estufa e pesou-o até peso constante para determinação do resíduo FDN (fibra detergente neutro). O FDN foi calculado de acordo com a equação 4.2.

$$\text{FDN}(\%) = \frac{(\text{Psaq} + \text{Pam}) - (\text{Psaq} + \text{Prfdn})}{\text{Pam}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde:

FDN (%) = Fibra detergente ácido (em porcentagem);

Psaq.= Peso do saquinho;

Prfdn = Peso resíduo fibra detergente ácido;

Pam. = Peso da amostra

Este saquinho depois de pesado passou pelo processo detergente ácido, onde o mesmo foi adicionado em recipiente plástico contendo 80 mL de solução detergente ácida. O sistema foi submetido a aquecimento a 100 °C por 1 h em autoclave. Após este tempo o saquinho foi removido e lavado (3X) com água quente (~100°C). Em seguida seguiu para a secagem em estufa a 105 °C por 72 h. A Equação 4.3 foi usada para determinação do FDA (fibra detergente ácido). O último peso da etapa FDN foi usado como peso inicial do FDA.

Eq. 4.3

$$\text{FDA} = \frac{\text{Prfdn} - \text{Psaq}}{\text{Pam}} \times 100$$

Após a determinação do FDA, o resíduo remanescente no saquinho foi submetido a hidrólise com H₂SO₄ 72 % por 3 h com agitação manual a cada 30 min. Logo após este tempo foi lavado (3X) e em seguida foi para a secagem em estufa a 105 °C por 72 h. Esta última etapa foi realizada para quantificar a lignina detergente ácido (LDA). A Equação (4) foi usada para determinação de lignina detergente ácido (LDA). O último peso da etapa FDA foi usado como peso inicial do LDA.

$$\text{LDA} = \frac{\text{Pfda} - \text{Psaq.}}{\text{Pam.}} \times 100 \quad \text{Eq.4.4}$$

A hemicelulose foi calculada pela diferença entre FDN e FDA. E a celulose foi calculada pela diferença FDA e LDA.

4.3.3 Determinação dos extrativos do bagaço

O bagaço *in natura* seco e moído (20 MESH) foi pesado e empacotado em filtros previamente secos e pesados para extração. A extração foi realizada em um aparelho de Soxhlet, utilizando-se etanol 96% como solvente extrator, por um período de 8 horas. Ao final, o material foi seco em estufa, a 105 °C, até peso constante. E pela diferença de massa do bagaço antes e depois da extração podemos determinar os extrativos, ou seja, componentes não estruturais como ceras, clorofila, sacarose, cinzas entre outros (SLUITER *et al.*, 2005).



Figura 4.1 – Sistema de extração com aparelho Soxhlet (foto do autor).

4.3.4 Determinação do teor de cinzas totais

Para determinação do teor de cinzas totais (em triplicata), foram pesados aproximadamente 2 g de bagaço moído (base seca) em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados. Estes materiais foram inicialmente calcinados a 300 °C por aproximadamente 1 hora e, então, a 800 °C por 2 horas. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e a massa de cinzas determinada em balança analítica pela diferença de peso inicial e final.

4.4 Determinação da atividade enzimática

A enzima utilizada no experimento foi FibreZyme™ LDI (Dyadic International Inc., Jupiter, USA), sendo esta um “preparado” enzimático onde verificou-se a atividade para: xilanase, CMCase, avicelase, β -glicosidase e celulase. Os métodos seguiram os parâmetros da IUPAC (GHOSE, 1987 e WOOD E BHAT, 1988). Para as análises de atividade enzimática a enzima foi diluída em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8.

4.4.1 Determinação da atividade da xilanase

Para a determinação da atividade de xilanase foi utilizado o xilano de Birchwood (SIGMA, USA), onde foi preparada uma solução 1 % (m/v) em tampão citrato 50 mM pH 4,8 deste substrato. Foi pipetado em um tubo de ensaio (10 cm x 1 mm) 75 μ L do substrato mais 50 μ L da enzima diluída (100, 1000 e 10.000 vezes) foi levado ao banho Maria a 50°C por 10 minutos. Após este tempo a reação foi interrompida com a adição de 125 μ L do reagente DNSA e submetida a um banho fervente por 5 minutos. Após o banho fervente foi adicionado 1 mL de água destilada e submetida a leitura espectrofotométricas a um comprimento de onda de 540 nm. A atividade da xilanase foi quantificada pelo método de Miller (1959) onde uma unidade enzimática irá corresponder a 1 μ M de açúcar redutor equivalente de xilose, por minuto por mL.

4.4.2 Determinação da atividade da Carboximetilcelulase (CMCase)

Para a determinação da atividade de CMCase foi utilizado o carboximetilcelulose (CMC) (SIGMA, USA), onde foi preparada uma solução 1 % (m/v) em tampão citrato 50 mM pH 4,8 deste substrato. Foi pipetado em um tubo de ensaio (10 cm x 1 mm) 375 μ L do substrato mais 250 μ L da enzima diluída (100 e 1000 vezes) foi levado ao banho Maria a 50 °C por 30 minutos. Após este tempo a reação foi interrompida com a adição de 125 μ L do reagente DNSA e submetida a um banho fervente por 5 minutos. Após o banho fervente foi adicionado 1250 μ L de água destilada e submetidas a leituras espectrofotométricas a um comprimento de onda de 540 nm. A atividade CMCase foi quantificada em unidades internacionais (UI) a qual uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ Mol de açúcares redutores equivalente de glicose por minuto.

4.4.3 Determinação da atividade da avicelase

Para a determinação da atividade de Avicelase foi utilizado o Avicel (SIGMA, USA), onde foi preparada uma solução 1 % (m/v) em tampão citrato 50 mM pH 4,8

deste substrato. Foi pipetado em um tubo de ensaio (10 cm x 1 mm) 375 μ L do substrato mais 250 μ L da enzima diluída (100 e 1000 vezes) foi levado ao banho Maria a 50 °C por 30 minutos. Após este tempo a reação foi interrompida com a adição de 125 μ L do reagente DNSA e submetida a um banho fervente por 5 minutos. Após o banho fervente foi adicionado 1250 μ L de água destilada e submetidas a leituras espectrofotométricas a um comprimento de onda de 540 nm. A atividade avicelásica foi quantificada a qual uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ Mol de açúcares redutores equivalente de glicose por minuto.

4.4.4 Determinação da atividade da celulase (FPU)

A atividade da celulase foi quantificada em unidades de papel filtro (FPU – *Filter Paper Units*) conforme metodologia proposta por GHOSE (1987) e WOOD e BHAT, (1988).

Visto que durante as reações parte da concentração da glicose pode vir do próprio complexo enzimático, são necessários tubos controles que são: enzima sem o substrato e substrato sem enzima que terão as absorvâncias descontadas dos valores dos tubos reacionais da enzima mais o substrato.

Em um tubo de ensaio foi adicionada uma fita de papel Whatman n°1 pesando 50 mg e 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. Os tubos foram colocados em um banho Maria a 50 °C. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de cada uma das enzimas previamente diluídas em tampão citrato e os tubos foram encubados por exatamente 60 minutos. Decorrido o tempo à reação foi interrompida adicionando 1,5 mL da solução de DNSA. Em seguida levado para banho fervente por 5 min. Depois que esfriou por alguns minutos foram adicionados 10,5 mL de água destilada. Os tubos foram homogeneizados e a leitura realizada em espectro fotômetro a 540 nm. Também foram preparados tubos contendo controles. O Branco reacional foi preparado adicionando 1,5 mL do tampão citrato e após os 60 minutos de reação aplicou-se o método DNSA.

O tubo controle do substrato sem enzima foi preparado adicionando 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de filtro de papel enrolado, que ao final de 60 minutos, também foi analisado pelo método DNSA. Para o preparo dos tubos controle da

enzima sem substrato, adicionou-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL da enzima (um tubo para cada diluição realizada), que ao final do tempo reacional foi adicionado o DNSA e fervido e lido em espectrofotômetro.

Uma unidade da atividade de enzima celulase (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de filtro de papel por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação. A equação abaixo foi usada para calcular a atividade (RABELO, 2007).

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 \times [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{Eq. 4.5}$$

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]}$$

4.4.5. Determinação da atividade da β -glucosidase

Seguindo o método usado por WOOD e BHAT (1988) com algumas modificações foi determinada a atividade de β -glucosidase utilizando a celobiose (SIGMA, USA) como substrato. Foi preparada uma solução 15 mM em tampão citrato 50 mM pH 4,8 deste substrato. A enzima foi diluída 1:1000 e a partir desta diluição foram realizadas mais quatro diluições em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Foi adicionado em tubos de ensaio 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e estes foram colocados em banho maria a 50 °C. Logo após o equilíbrio da temperatura foi adicionado em cada tubo, 1,0 mL da solução de celobiose 15 mmol/L e os tubos foram encubados por 30 minutos. Ao término deste tempo os tubos foram sujeitos a um banho de gelo.

Foram enumerados 4 tubos controle da enzima, onde se adicionou 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e 1,0 mL do tampão citrato. Ao final do tempo reacional, aplicou-se o método enzimático Glicose GOD-PAP. Ao tubo controle do substrato adicionou 1,0 mL do substrato celobiose e 1,0 mL do tampão citrato que ao final de 30 minutos de reação também foi analisado pelo método enzimático Glicose GOD-PAP.

De posse das leituras das absorbâncias, foi construída uma curva de calibração onde se relaciona a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 1,0 mL dessa enzima diluída,

determinando assim a atividade enzimática da β -glicosidase. A atividade β -glicosidase foi determinada da seguinte forma: uma unidade baseia-se na liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 μmol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação. A equação abaixo foi usada para calcular a atividade (RABELO, 2007).

$$\text{CBU/mL} = \frac{0,5}{(0,1816 \times 1,0 \times 30 \times [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{Eq. 4.6}$$

$$\text{CBU/mL} = \frac{0,0926}{[\text{enzima diluída}]}$$

4.5 Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço designificado foi pesado em triplicatas de: 1, 2, 3, 4, 5 e 7,5 g de massa seca para o volume fixo de 50 mL de tampão e enzima (correspondendo aproximadamente as porcentagens: 1,96; 3,84; 5,64; 7,44; 9,0 e 13%). A enzima foi adicionada de acordo com a carga estabelecida de 10 e 20 FPU para cada 1 g de sólido. A hidrólise enzimática foi realizada em meio tamponado (tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8), sob agitação 150 rpm, temperatura de 50 °C por 72 h. As dosagens dos açúcares liberados foram realizadas por CLAE.

A eficiência da enzima para cada tratamento levou em consideração a glicose que foi liberada no decorrer da hidrólise em função do tempo, segundo a equação 4.7.

$$EG (\%) = \frac{\text{Glicose HE}}{1,11 \times F \times \text{Biomassa}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.7}$$

Onde:

EG (%) = Eficiência em glicose (em porcentagem);

Glicose HE = concentração de glicose no hidrolisado enzimático (em g/L);

F = concentração de celulose no bagaço pré-tratado (em g);

1,11 = fator de correção que corresponde a adição de moléculas de água ao resíduo anidroglicose em celulose

Biomassa: concentração da carga de sólidos lignocelulósica no experimento (em g/L);

De forma análoga, a eficiência de hidrólise em termos de xilose liberada foi calculada segundo a equação 4.8 (MAEDA *et al.*, 2011; CAO *et al.*, 2012; KARAGÖZ *et al.*, 2012, GOUVEIA *et al.*, 2009).

$$EX (\%) = \frac{\text{Xilose HE}}{1,14 \times F \times \text{Biomassa}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.8}$$

Onde:

EX (%) = Eficiência em xilose (em porcentagem);

Xilose_{HE} = concentração da xilose no hidrolisado enzimático (em g/L);

F = concentração de hemicelulose no bagaço pré-tratado (em g);

1,14 = fator de correção que corresponde à adição de moléculas de água ao resíduo Hemicelulósico;

Biomassa: concentração da carga de sólidos lignocelulósica no experimento (em g/L).

4.6 Microrganismos

Foram utilizadas 10 linhagens de leveduras: *Spathaspora passalidarum*: UFMG HMD 10.2; 14.2; 16.2 e 1.1; *Candida shehatae*: UFMG HM 51.3 e 52.2; *Candida sp* UFMG HMD 25.1; *Spathaspora brasilienses* UFMG HMD 19.3; *Spathaspora suhii* sp UFMG XMD 16.2 e *Spathaspora roraimanensis* UFMG XMD 23.2. Estas leveduras foram isoladas pelo grupo de pesquisa do professor Carlos Rosa (UFMG), a partir de amostras de madeira em decomposição coletadas em duas áreas no estado de Roraima, região norte do Brasil. Essas áreas pertencem a reservas florestais localizadas no município de São João da Baliza (00° 57' 02'' N e 59° 54' 41'' W) e Mucajaí (2° 25' N e 60° 54' W). A vegetação predominante é caracterizada como pertencente ao bioma Amazônia.

Para a preservação dessas linhagens foram utilizados métodos de curto prazo (repique em placa), médio prazo (óleo mineral) e longo prazo (Criopreservação)

(SOLA *et al.*, 2012). Para o método de curto prazo, as linhagens foram repicadas em placas com meio sólido YPD (20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 20 g/L de Agar e 10 g/l de extrato de levedura) levadas a estufa a 30 °C por um período de 24 à 48 h e após esse período guardadas em geladeira (4 – 8 °C). Para médio prazo, após o crescimento das linhagens em tubos com meio YPD inclinado, foi adicionado óleo mineral esterilizado sobre a cultura e estocadas a temperatura ambiente (22 – 25 °C). Para a preservação em longo prazo, após o crescimento da cultura em meio líquido YPD pipetou-se a cultura no tubo criogênico e adicionou-se 50% do volume de glicerol 100% e foram estocados a - 80 °C. Os métodos de preservação a médio e longo prazo foram feitos em triplicata.

4.7 Meios de cultura

Os meios de cultura mineral e YPD foram utilizados para produzir biomassa. O meio mineral é composto por 2 % de glicose e 0,67 % de YNB (Yeast Nitrogen base, M139, HIMEDIA) completo. Para 100 mL de meio foram adicionados: 6,65 mL de YNB completo e 93,350 mL da solução de glicose a 20 g/L, em seguida filtrado em filtro 0,22 micrometro estéril (pH ~ 5,0). O meio de cultura YPD (10 g / L Extrato de levedura, 20 g / L peptona e 20 g / L glicose) esterilizado por autoclavação por 20 minutos a 121 °C (pH ~ 6,3).

Para o meio fermentativo sintético contendo apenas xilose foi utilizada a seguinte composição para 100 mL de meio sintético: 6,65 mL de YNB completo e 120 g/L de xilose. O meio fermentativo sintético contendo as misturas de açúcares proporcionais ao hidrolisado enzimático possui a composição para 100 mL de: 6,65 mL de YNB completo, 13 % celobiose; 53,65 % glicose; 30 % xilose e 3,36 % arabinose.

4.8 Inóculo

A produção de biomassa foi iniciada pelo repique do microrganismo em frascos Erlenmeyers de 1000 mL contendo 100 mL de meio para crescimento os quais foram incubados a 30 °C e 120 rpm por 16 horas. Em seguida, foram adicionados 200 mL do meio de crescimento a estes mesmos frascos e as culturas

incubadas nas mesmas condições por mais 24 horas. Este procedimento foi repetido por mais um dia até que o volume de aproximadamente 500 mL fosse atingido. Dependendo da velocidade de crescimento da linhagem, a geração de biomassa pode levar até uma semana. Após esse período de crescimento, toda a biomassa foi recuperada por meio de centrifugação em tubo falcon estéril de 50 mL por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento foi repetido com mais adição da cultura crescida ao tubo contendo o sedimento celular até que tenham sido obtidos 5 g de peso úmido celular. Isto foi conferido pela diferença de massa entre o tubo contendo o sedimento celular e o peso desse mesmo tubo antes da coleta das células.

4.9 Fermentações

4.9.1 Fermentação de xilose

As fermentações foram realizadas utilizando-se aproximadamente 10 % (m/v) de biomassa inicial referente a volume do meio que foi fermentado, preparada conforme o item 4.7. Então, para 5 g de biomassa utilizou-se o volume de meio suficiente para se atingir 50 mL de volume. Depois de homogeneizado em equipamento vortex até que todo o sedimento seja suspenso, foi transferido para frasco Erlenmeyer de 125 mL estéril e incubado em shaker a 30° C e 120 rpm. Os ensaios de fermentação foram realizados em duplicata. Uma alíquota de cada lote do meio de fermentação foi armazenada para dosagem do açúcar inicial. Amostras de 1 mL foram retiradas em intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas e centrifugados por 5 min. a 10000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL e armazenado a -20°C para a quantificação do consumo de açúcar, produção de glicerol e etanol. Foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* NRRL 7124 como controle positivo para as fermentações em xilose.

4.9.2 Fermentação do hidrolisado lignocelulósico

Os ensaios de fermentação foram realizados com a carga de sólidos de 7,5 g (13%) hidrolisada enzimaticamente com a carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço. A biomassa utilizada nestes ensaios de fermentação foi crescida em meio YPD,

durante o período de 24 a 72 h. As fermentações foram conduzidas de forma análoga ao item 4.9.1. Os pontos de coletas foram de: 0, 6, 24, 30, 48 e 72 h. O crescimento de biomassa durante o ensaio fermentativo foi verificado por quantificação do peso seco. Não foi adicionado ao hidrolisado fermentado nenhuma suplementação.

4.9.3 Fermentação do meio sintético

As fermentações foram conduzidas de forma análoga ao item 4.9.1 utilizando as mesmas proporções de açúcares do hidrolisado enzimático fermentado do item 9.4.2 (13 % celobiose; 53,65 % glicose; 30 % xilose e 3,36 % arabinose). Nesta fermentação sintética foi adicionado o YNB (10X). Os pontos de coletas foram de: 0, 6, 24, 30, 48 e 72 h. O crescimento de biomassa durante o ensaio fermentativo foi verificado por quantificação do peso seco.

4.10 Quantificação do crescimento

Em cada ponto coletado da fermentação do hidrolisado foi realizada a quantificação do crescimento. Após retirar o sobrenadante centrifugado do volume de 1 mL (alíquota coletada) a biomassa celular foi resuspendida em 10 mL de água destilada e homogeneizada. Em seguida foi filtrada em um sistema de bomba á vácuo com a membrana 0,45 µm previamente seca por 2h á 105°C e pesada. Após a filtração a membrana contendo a biomassa foi seca novamente a 105°C por 2h até peso constante. Depois de 45-50 minutos no dessecador foi pesada. O peso seco (PS) foi calculado da seguinte forma:

$$PS = \frac{P2 - P1}{V} \quad \text{Eq. 4.9}$$

Onde:

P1 = é o peso da membrana seca sem a biomassa (em g);

P2 = é o peso da membrana seca com a biomassa (em g);

V = Volume da amostra utilizado na filtração (em L).

4.11 Determinação dos carboidratos, glicerol e etanol

A quantificação dos açúcares, glicerol e etanol produzidos das fermentações foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Agilent série 1200. A coluna cromatográfica utilizada foi a Aminex HPX 87H⁺ (300 x 7,8mm, Bio-Rad) a 50° C e fase móvel H₂SO₄ 5 mM numa vazão de 0,6mL/min. Empregando o detector índice de refração (RI) (Agilent). As amostras foram previamente diluídas e filtradas em membrana 0,22 µm.

4.12 Determinação dos açúcares redutores

O consumo de açúcar redutor foi quantificado pelo método que utiliza o ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNSA) descrito por MILLER (1959). Neste método, o açúcar contendo extremidades redutoras presente na amostra será reduzido pelo ácido gerando um composto de coloração marrom avermelhado que pode ser quantificado por espectrometria a 540 nm. Para isso, 1,0 mL da amostra (sobrenadante da fermentação) foi misturado em tubo de ensaio com 1,0 mL do reagente DNSA e a mistura encubada em banho maria a 100° C por 5 minutos. Depois da incubação, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e diluída com 8,0 mL de água destilada para leitura no espectrômetro. O mesmo tratamento foi realizado para construção de uma curva de calibração com 1 mL de soluções de xilose nas concentrações de 0,4; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8 e 2,0 g/L, com R²=0,9985 á 0,9999.

4.13 Determinação de Etanol

O etanol foi dosado em um cromatógrafo modelo CG 5800, com coluna aço ø 1,8 x 2,0 m, corrente de 12 v, pressão 70 *psi* e temperatura de 100° C por condutividade térmica. O volume de 5 µL da amostra do sobrenadante das fermentações foi injetado com auxílio de uma microseringa. Para a quantificação das amostras, uma curva de calibração foi construída utilizando soluções padrão de etanol nas concentrações de 10, 5, 4, 3, 2, 1 g/L com o R² = 0,9992.

4.14. Determinação de Glicerol

A dosagem do glicerol foi realizada por um kit enzimático de triglicerídeos (Liquid stable mono reagente, LABORLAB, Brasil) segundo instruções do fabricante. A curva de calibração foi construída com solução de glicerol nas concentrações de: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L, onde obteve-se o $R^2 = 0,9989$ a $0,9997$.

4.15 Determinação da perda de massa após a hidrólise enzimática

Após o período de 72 h de hidrólise enzimática, foi separada por filtração a fração sólida da líquida. A fração sólida foi lavada com aproximadamente 500 mL de água quente (65 -70 ° C) para retirar qualquer residual de açúcar e de enzima. Em seguida a fração sólida foi cuidadosamente retirada do filtro e acondicionada em um recipiente próprio para secagem em estufa a 45° C por 48 h. Sendo calculada a perda de massa (PM) pela equação 4. 10.

$$PM(\%) = (P_i - P_f) \times 100 \quad \text{Eq. 4.9}$$

Onde:

PM (%) = Perda de massa (em porcentagem);

P_i = Peso inicial do bagaço deslignificado (em g);

P_f = Peso final do bagaço hidrolisado (em g).

4.16 Análise estatística

O desenho experimental utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática foi inteiramente casualizado e todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos para eficiência em glicose e xilose e a perda de massa após a hidrólise enzimática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as medias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de $p \leq 0,05$ usando o Software ASSISTAT (Silva e Azevedo, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da biomassa do bagaço de cana com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

O bagaço cedido pela usina Japungu (Santa Rita, PB, Brasil) e utilizado nos experimentos foi caracterizado para a determinação dos seus componentes básicos (celulose, hemicelulose e lignina) com e sem pré - tratamento. A determinação destes compostos logo após o pré – tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é primordial para se verificar a eficácia da deslignificação, bem como o teor da celulose e hemicelulose para calcular a eficiência da enzima na conversão das cadeias dos polissacarídeos em seus monômeros.

Na tabela 5.1 estão apresentados os resultados da caracterização do bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela 5.1 – Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Biomassa do bagaço da Cana	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	LDA (%)*	Extrativos (%)	Cinzas (%)
<i>In natura</i>	39,21 ± 1,1	37,86 ± 0,1	11,82 ± 1,5	6,3 ± 0,06	2,22 ± 0,14
Deslignificado	56,13 ± 0,3	30,20 ± 2,4	6,58 ± 0,7	ND	2,52 ± 0,08

* LDA- Lignina Detergente Ácido; ND- Não determinado.

A composição média dos compostos do bagaço da cana-de-açúcar *in natura* pode variar entre 42 - 50 % para a celulose, 25 - 30 % para hemicelulose, 20 – 25 % para lignina e 5 – 8 % para os extrativos (KUMAR *et al.*, 2008;). Verificamos que os resultados obtidos estão dentro do esperado pela literatura.

O baixo teor de lignina obtido (11,82 ± 1,5 %) pode ser explicado pelo fato de parte da lignina ser removida pelo tratamento detergente ácido que precede a digestão pelo ácido sulfúrico, sendo uma característica desse método de lignina detergente ácido (Hatfield; Fukushima, 2005). Alguns fatores na cultura da cana como fase de crescimento, o genótipo, fração morfológica e condições ambientais

podem influenciar quanto ao teor de lignina na biomassa lignocelulósica (FREI, 2013).

A perda de massa média no pré-tratamento do bagaço após a deslignificação foi de $42,8 \pm 0,24$ % utilizando uma solução com concentração de 7,5 % H_2O_2 (v/v). Comparando com outros substratos, Banerjee *et al.* (2011) obtiveram uma perda de massa de aproximadamente 35 % utilizando palha de milho com uma concentração menor de H_2O_2 (0,125g de H_2O_2 / 1 g de biomassa). Perda superior de massa foi encontrada por Saha e Cotta (2007) sendo de 53 ± 1 % (m/m), utilizando casca de arroz pré-tratada com solução de 7,5 % H_2O_2 (v/v). Esta perda de massa está relacionada com a solubilização de parte da lignina, extrativos, cinzas e pequenas frações de carboidratos para a fase líquida da reação. A fração líquida do pré-tratamento foi analisada por HPLC e o total dos açúcares perdidos foi menor que 1 g/L (0,83 g/L).

O pré-tratamento da biomassa é bastante relevante para que ocorra a modificação da biomassa celulósica, tornando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis (MOSIER *et al.*, 2005). Foi observado um pequeno decréscimo na porcentagem da hemicelulose, já citado como uma interessante característica do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (CORREIA *et al.*, 2013). A perda de massa da lignina detergente ácido após o pré - tratamento foi de 44 %, indicando a solubilização destes componentes na solução de peróxido alcalino. Os teores de celulose aumentaram 43,15 % após a etapa de pré-tratamento, visto que há perda de frações de hemicelulose e lignina. Martín *et al.* (2012) utilizaram um método alcalino (NaOH) para deslignificar o bagaço de cana explodido que eliminou mais de 90% da lignina e a celulose aumentou em 64%. O fato de o bagaço ser explodido otimizou a deslignificação, pois o processo de explosão causa modificações químicas e físicas no bagaço, entre elas a perda de parte da hemicelulose , que forma correntes que unem microfibrilas de celulose e também possui a função de proteção (MOSIER *et al.*, 2005).

A análise de FTIR foi realizada para detectar mudanças nos grupos funcionais que poderiam ter ocorrido pelo pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino resultados estes apresentados na figura 5.1.

Neste espectro há várias bandas (vibrações de onda) no intervalo de 3500 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} . Observa-se que as bandas 1242 cm^{-1} , 1510,20 cm^{-1} e 1730,16 cm^{-1} presentes no bagaço *in natura* não estão presentes no bagaço pré-tratado.

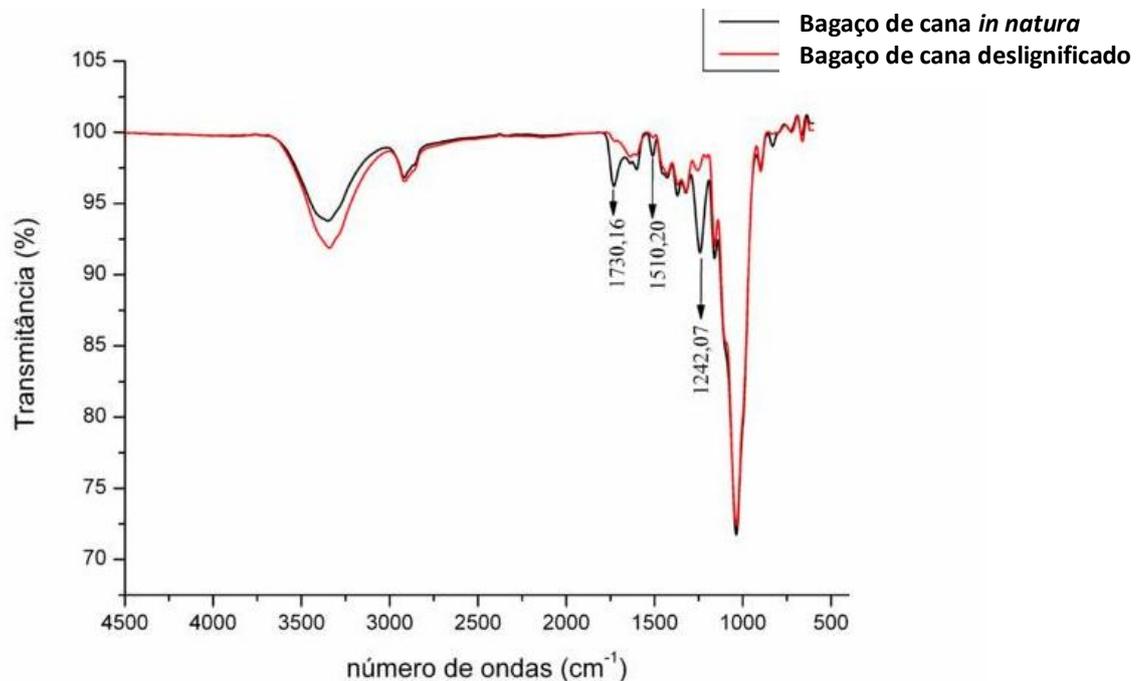


Figura 5.1- Espectro do FTIR, para o bagaço da com e sem tratamento com o peróxido de hidrogênio alcalino.

As bandas que estão no intervalo de 1200-1000 cm^{-1} , estão relacionadas com a celulose e a hemicelulose, principalmente as bandas de 1037 cm^{-1} (ligações C-O) e 1164 cm^{-1} (ligações C-O-C). A absorvância de 1242,07 cm^{-1} encontra-se no intervalo onde mostra o alongamento da ligação C-O, que é uma característica da hemicelulose e lignina (CHANDEL *et al.*, 2013). Observa-se na Figura 5.1 que a banda 1242 cm^{-1} está presente no material *in natura* (sem tratamento) e não é observado no material que sofreu o tratamento com peróxido alcalino confirmando assim a perda de lignina e hemicelulose. A banda 1510,20 cm^{-1} está relacionada com vibrações de anéis aromáticos em ligninas (1500 - 1550 cm^{-1}) e revela que o material deslignificado estava livre de ligação de lignina, como preconizado por Correia *et al.* (2013). Observou-se o decréscimo da banda 1730,16 cm^{-1} presente no material *in natura*, sendo esta banda relacionada a alongamento não conjugados de

C=O presentes em hemicelulose como também em lignina (CHANDEL *et al.*,2013). O decréscimo destas três bandas ($1242,07\text{ cm}^{-1}$, $1510,20\text{ cm}^{-1}$ e $1730,16\text{ cm}^{-1}$) confirma a eficiência do pré-tratamento, no qual houve uma eficiente capacidade na remoção de lignina como já confirmado em trabalhos anteriores (RABELO *et al.*, 2008; RABELO *et al.*; 2011; SAHA; COTTA, 2007). O aumento da celulose presente no bagaço é uma característica deste tipo de pré-tratamento de deslignificação e foi confirmada pelo aumento da banda entre 3500 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} , que esta relacionada à estrutura cristalina da celulose (CHANDEL *et al.*,2013).

5.2. Hidrólise Enzimática do bagaço de cana

A enzima FibreZyme™ LDI é um complexo enzimático utilizado na indústria de papel no tratamento do efluente. Para o seu uso na hidrólise do bagaço de cana, foi necessário determinar as atividades enzimáticas apresentadas por este complexo. As reações de atividades para as enzimas celulase, xilanase, avicelase, CMCase e β -glicosidase foram realizadas em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8 e temperatura de 50 °C. Suas medidas resultaram nas atividades na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Atividade enzimática da FibreZyme™ LDI.

FibreZyme™ LDI	Atividade
FPase (atividade filtro de papel)	11,563 FPU/mL
Xilanase	788,94 \pm 63,04 U/mL
β – glicosidase	10 CBU/mL
Avicelase	5,9 \pm 0,34 U/mL
CMCase	174,97 \pm 6,72 U/mL

Para cada grama de bagaço deslignificado foi adicionada a carga enzimática de 10 ou 20 FPU, sendo as cargas de sólidos de 1, 2, 3, 4, 5 e 7,5 g. As reações de hidrólises tiveram uma duração de 72 h e as amostras retiradas foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência para calcular as eficiências em glicose e xilose liberados.

Os resultados de eficiência na conversão da celulose em glicose da hidrólise enzimática utilizando 10 e 20 FPU como cargas enzimáticas são mostrados na figura

5.2. Esses dados mostram que não houveram diferenças significativas entre as eficiências quando se variava a carga de sólidos, com carga enzimática fixa ($p < 0,05$).

As eficiências em glicose para as cargas de sólidos tratadas com 20 FPU de carga enzimática apresentaram maior eficiência se comparada com a de 10 FPU. Porém, a carga de sólido de 7,5 g (13%) obteve valor próximo da eficiência para 10 e 20 FPU, sendo respectivamente $60,1 \pm 5,9 \%$ e $64,8 \pm 4,8 \%$. Diante desses dados, a carga de sólidos de 7,5 g (13%) e carga enzimática de 10 FPU foi escolhida para ser usada na hidrólise enzimática do bagaço devido ao fato de que quanto maior a carga de sólidos maior será a concentração de açúcares disponibilizados para a conversão a etanol. A carga enzimática de 10 FPU tem sido utilizada frequentemente em laboratórios por ter um perfil de hidrólise com elevados níveis de produção de glicose em períodos aceitáveis (48 - 72 h) a um custo razoável (SUN; CHENG, 2002)

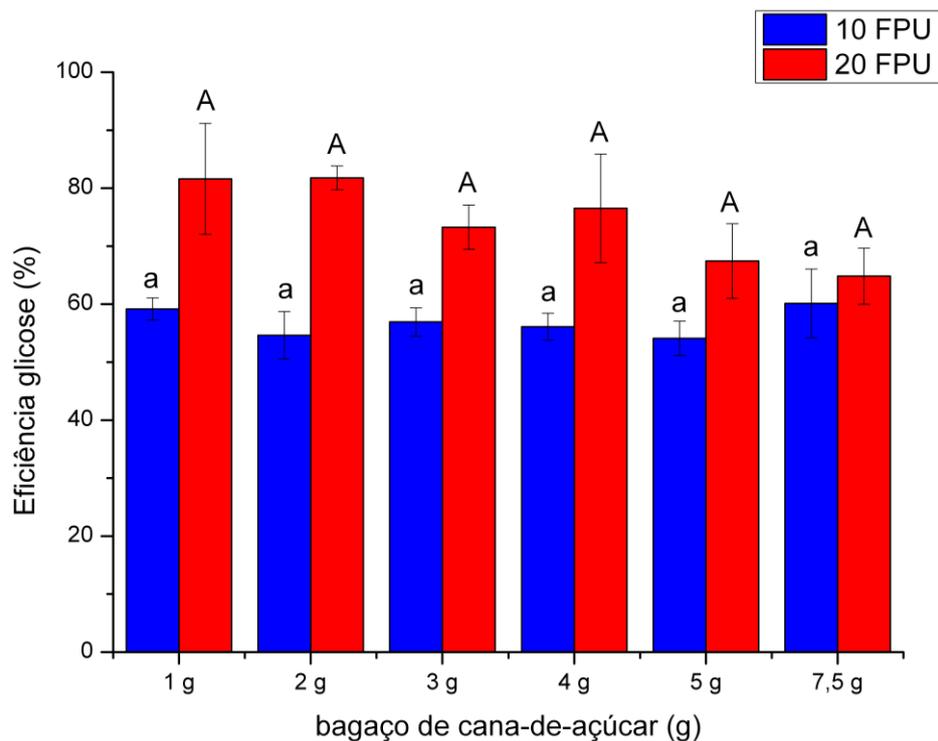


Figura 5.2 – Eficiência em glicose dos hidrolisados enzimáticos após 72 h, variando a cargas de sólidos e carga enzimática. Valores para $n = 3 \pm DP$. Média com mesma letra minúscula para 10 FPU / maiúscula para 20 PFU na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV % = 6,26 (10 FPU) e CV % = 8,91 (20 FPU)

Em seu estudo utilizando a palha de milho, Banerjee *et al.* (2011) pré-trataram a biomassa com H₂O₂ alcalino, carga enzimática de 15 mg/g glucana (correspondendo a 4,5 a 7,2 FPU/ g de glucana) e cargas de sólidos de 2, 6, 8 e 10% obtendo-se rendimentos de 70 %, 70 %, 74 % e 82 % respectivamente em 48 h de hidrólise. As eficiências em liberação de glicose foram maiores do que as obtidas no presente trabalho, com cargas de sólidos muito próximos (1,96; 3,84; 5,64; 7,44 e 9,0 %) e carga enzimática de 10 FPU. Isto pode ser explicado devido a diferença entre a biomassa lignocelulósica (palha de milho) e ao coquetel enzimático (três enzimas otimizado em trabalho anterior) utilizado quando comparado a este trabalho. Entretanto, os resultados deste trabalho foram próximos em eficiências em glicose aos obtidos por Shen *et al.* (2011) que obtiveram eficiências entre 56 % e 70 % em 72 h, para as cargas de sólidos entre 2 a 12 % da biomassa de sorgo sacarino submetida a um pré-tratamento a 190 °C com SO₂, carga enzimática de 10FPU. No presente trabalho, as eficiências ficaram entre 54,1 e 60,1% utilizando a mesma carga enzimática e cargas de sólidos equivalentes.

As hidrólises com carga enzimática de 20 FPU (figura 5.2) resultaram nas eficiências 81,6; 81,7; 73,3; 76,5; 67,4 e 64,8 % referente às cargas de sólido de 1, 2, 3, 4, 5 e 7,5 g respectivamente. Apesar da análise estatística não revelar diferenças significativas, há um decréscimo na eficiência de hidrólise que pode ser atribuído ao aumento da carga de sólido e consequente aumento do teor de lignina, a qual se liga irreversivelmente a celulase e como consequência bloqueia o acesso da celulase a celulose (SUN; CHENG *et al.*, 2002). Uma segunda explicação é a presença de alto teor de glicose no complexo enzimático fibreZymeTM que variou de 1,3 a 8,1 g/L referente a carga enzimática de 10 FPU sendo o aumento deste açúcar diretamente proporcional ao aumento da carga de sólidos (APÊNDICE A). E para a carga enzimática de 20 FPU o dobro dessas concentrações de glicose foi encontrado (APÊNDICE B). Esta glicose presente na enzima pode ter causado um efeito de inibição da celulase ao atingir certa concentração no decorrer da hidrólise enzimática à medida que mais glicose foi liberada (SUN; CHENG *et al.*, 2002; MODENBACH *et al.*, 2013). Vale salientar que neste trabalho a glicose presente na enzima foi descontada dos cálculos de eficiência da hidrólise.

A figura 5.3 mostra os resultados das eficiências de conversão da xilana (hemicelulose) em xilose. Foi observado que houve diferenças significativas entre as eficiências quando se variava a carga de sólidos. As eficiências em xilose para 20

FPU ficaram entre 47,14 – 70,5 % e para 10 FPU ficaram entre 43,22 a 54,2 %. Sendo que a última carga de sólidos de 7,5 g (13%) a eficiência em xilose das cargas enzimáticas de 10 e 20 FPU foram praticamente a mesma (54,2 e 53,9%) com médias de xilose de 24,1 e 25,7 g/L respectivamente.

Wress *et al.* (2009) utilizando um pré-tratamento com ácido diluído em digestor a vapor e alta carga de massa seca de 45 % (p/p) obtiveram rendimentos superiores a 80%. Os resultados de rendimento em xilose de 7,5 g (13%) de bagaço deslignificado com carga enzimática de 10 FPU parecem promissores quando comparados com aqueles da literatura por não requerer um alto gasto de energia necessário em tratamentos com vapor. Banerjee *et al.*, (2011) utilizando palha de milho tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (0,5 g H₂O₂ / g de biomassa) obteve a eficiência em xilose de 75,1 % na hidrólise enzimática (coquetel com três enzimas), estando dentro do intervalo de eficiências encontrados neste trabalho para carga enzimática de 20 FPU.

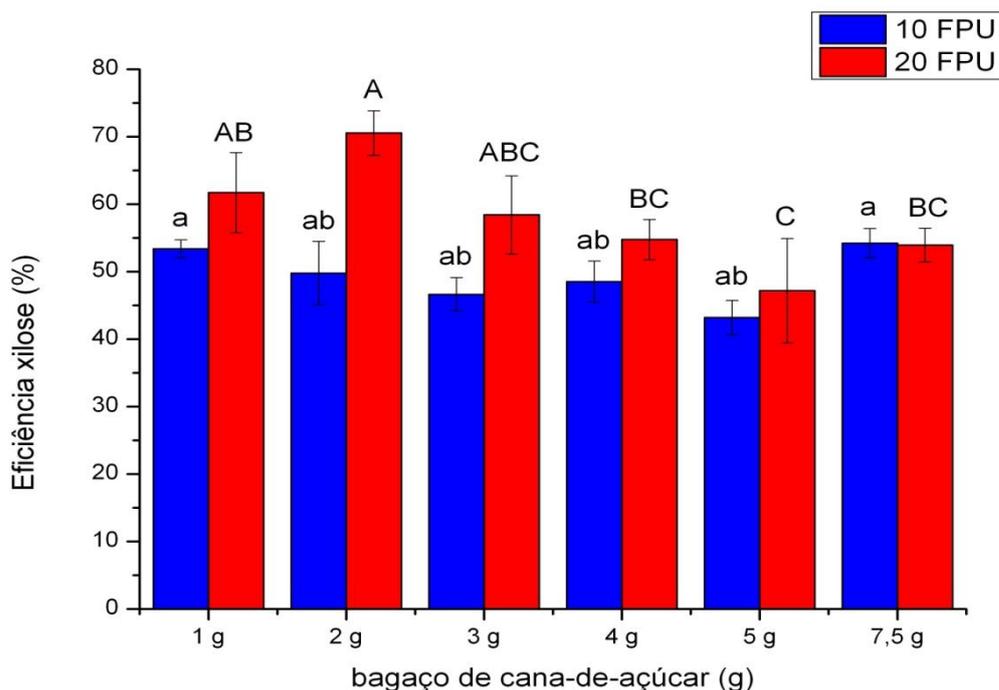


Figura 5. 3 – Eficiência em xilose dos hidrolisados enzimáticos após 72 h, variando a cargas de sólidos e carga enzimática. Valores para $n = 3 \pm DP$. Média com mesma letra minúscula para 10 FPU / maiúscula para 20 PFU na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV %= 5,89 (10 FPU) e CV% = 8,78 (20 FPU).

Além da eficiência da hidrólise da celulose em glicose e hemicelulose em xilose, também foram quantificadas as perdas de massa após a etapa de hidrólise enzimática com a FibreZyme nas doses de 10 e 20 FPU/ g biomassa (tabela 5.3). O aumento da carga enzimática não afetou a perda de massa para diferentes cargas de sólidos empregadas. No entanto, os resultados indicam haver diferenças significativas entre as cargas de sólidos para a carga enzimática de 20 FPU. As porcentagens de perda de massa variaram entre $82,98 \pm 1,24$ (%) e $86,43 \pm 3,44$ (%) para 10 FPU e $82,06 \pm 0,86$ (%) e $90,45 \pm 0,62$ (%) para 20FPU. Saha; Cotta *et al.* (2007), obtiveram uma perda de 81 ± 1 % para 15 % de sólidos, utilizando uma carga enzimática de 0,12 mL/ g casca de arroz de cada enzima (Celluclast, Novozyme 188 e Viscostar 150 L). Pelos resultados obtidos no trabalho, podemos afirmar que estas eficiências de hidrólise são bastante promissoras para o uso em resíduos lignocelulósicos.

Tabela 5.3 – Perda de massa após 72 h de hidrólise enzimática à 10 e 20 FPU/g de bagaço.

Carga de Sólidos (g)	10 FPU	20 FPU
1	$86,43 \pm 3,44$ % ab	$90,45 \pm 0,62$ % a
2	$89,86 \pm 0,46$ % a	$88,92 \pm 1,53$ % ab
3	$86,45 \pm 0,08$ % ab	$85,93 \pm 0,84$ % bc
4	$86,22 \pm 3,13$ % ab	$86,95 \pm 1,16$ % b
5	$84,90 \pm 0,89$ % ab	$83,26 \pm 1,55$ % cd
7,5	$82,98 \pm 1,24$ % ab	$82,05 \pm 0,86$ % d

Valores para $n= 3 \pm$ desvio padrão. Média com mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Seleção de linhagens de leveduras fermentadoras de xilose

Ensaio de fermentação foram realizados utilizando meio sintético e condições semelhantes ao processo industrial, como elevada concentração de biomassa (10%) e alto teor de açúcar inicial (120 g/L de xilose). Dez linhagens foram testadas para sua capacidade fermentativa de conversão de xilose a etanol durante o período de 72 h com a intenção de selecionar aquela que apresentasse o melhor rendimento associado a melhor taxa de consumo do açúcar.

Todas as linhagens testadas foram capazes de consumir xilose como fonte de carbono. As porcentagens do consumo de xilose variaram de 13,12 % a 43 %, referentes ao período de 72 h de fermentação (Tabela 5.4). Estes resultados foram diferentes dos encontrados por Cadete *et al.*, (2012b) que verificaram consumos de 52,3 % a 100 % em 48 h em meio sintético (50 g/L de xilose, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) utilizando as linhagens de *S. stipitis*, *Candida sp.*, *S. passalidarum*, *Candida amazonensis* e novas espécies de *Spathaspora* posteriormente identificadas como *S. brasiliensis* sp. nov., *S. suhii* sp. nov e *S. roraimanensis* sp. nov. (CADETE *et al.*, 2012a). Este alto consumo de xilose pode ser justificado pelo uso de peptona e extrato de leveduras que são fontes de nitrogênio e vitaminas do complexo B na sua composição, diferentemente do meio utilizado neste trabalho. Consumo (84% em 96 h) de xilose também foi constatado por Da Cunha-Pereira *et al.* (2011) utilizando uma linhagem de *S. arborariae* UFMG-HM 19.1a em meio sintético (20 g/L de xilose, 20 g/L de glicose e 10 g/L de arabinose). Agbogbo *et al.* (2006) utilizando a linhagem de *Pichia stipitis* CBS 6054 em meio fermentativo (60 g/L de xilose e uma solução nutriente contendo: 1,7 g de YNB; 2,27 g de uréia e 6,56 g de peptona em 20 mL de água) obtiveram uma eficiência de 79 % em 72 h, sendo necessários 120 horas de fermentação para o consumo total do açúcar. Vale salientar que esses desempenhos no consumo da xilose podem está diretamente relacionados com a suplementação desses meios fermentativos por peptona, extrato de levedura e ureia.

O resultado da *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2 dentre as linhagens da espécie *Spathaspora* foi a que apresentou maior concentração de etanol (16,01 g/L) e dentre as linhagens de *Candida*, a linhagem HM 52.2 produziu 12,0 g/L de etanol (Tabela 5.4). Neste trabalho as novas espécies de *Spathaspora* (*S. brasiliensis* sp. nov., *S. suhii* sp. nov e *S. roraimanensis* sp. nov) foram as que apresentaram as menores produções de etanol. Hickert *et al.* (2013) utilizando a *Candida shehatae* HM 52.2 em meio sintético (xilose 20 g/L, glicose 20 g/L, arabinose 10 g/L, extrato de levedura 3 g/L e peptona 5g/L) em 60 h de fermentação obtiveram uma concentração média de etanol de 15 g/L, sendo próxima a produção obtida utilizando apenas xilose como fonte de carbono e sem suplementação. Da Cunha-Pereira *et al.* (2011) verificaram que *S. arborariae* UFMG-HMD19.1a produziu 15 g/L de etanol em 72 h.

Os rendimentos em etanol a partir da xilose obtidos nas fermentações variaram de 0,08 a 0,34 g/g. Os melhores rendimentos obtidos levando em consideração a maior produção de etanol foram das linhagens *S. passalidarum* HMD 10.2 e HMD 14.2 com rendimento de 0,30 e 0,29 g/g, respectivamente. Cadete *et al.* (2012 b) utilizando a linhagem *S. passalidarum* HMD 10.2 obtiveram um semelhante rendimento de 0,33 g/g.

No presente trabalho a levedura *Pichia stipitis* NRRL 7124 foi utilizada como linhagem de referência nos ensaios fermentativos em xilose obtendo rendimento em etanol de 0,29 g/g. Agbogbo *et al.* (2006) utilizando a *Pichia stipitis* CBS 6054 obtiveram rendimento em etanol de 0,44 g/g e Jeffries *et al.* (2007) demonstrou que uma linhagem da *Pichia stipitis*, conhecida por sua capacidade de fermentar pentose poderia ter rendimentos em etanol entre 0,35 e 0,44 g/g em xilose. O baixo rendimento da linhagem de referência, comparado com estes trabalhos citados em que foi realizada a suplementação (peptona, extrato de levedura, ureia e outros) do meio fermentativo, serve de parâmetro para as outras linhagens e indica que a não suplementação diminui a produção de etanol e conseqüentemente o rendimento.

Os resultados de produtividade (Qp) em etanol variaram entre 0,03 e 0,22 g/L.h respectivamente para *S. roraimanensis* sp. nov e a *S. passalidarum* HMD 14.2. A produtividade em etanol observada para a linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 é comparável aquela observada por Da Cunha-Pereira *et al.* (2011) para a linhagem *S. arborariae* UFMG-HM 19.1a, a qual obteve 0,21 g/L.h.

No estudo desenvolvido por Ferreira *et al.* (2011) utilizando a linhagem *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* UFMG - IMH 43.2, foi avaliado o efeito da suplementação do meio fermentativo (hidrolisado de hemicelulose do bagaço de cana – de – açúcar) com extrato de levedura, ureia e $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$. Estes resultados mostraram que o extrato de levedura interfere diretamente na produção de etanol por ser uma rica fonte de aminoácidos e vitaminas. Entretanto, torna-se economicamente inviável sua adição em escala industrial pelo fato do etanol ser um produto de baixo valor agregado. Visando a mimetização de parâmetros industriais, neste presente trabalho não houve suplementações do meio fermentativo.

Diante dos resultados obtidos (Tabela 5.4), podemos indicar a linhagem de *S. passalidarum* HMD 14.2 como promissora para a fermentação do bagaço pré-tratado e hidrolisado enzimaticamente, por apresentar um bom rendimento em etanol sob condições de alta concentração em xilose (~120g/L) como única fonte de carbono.

Tabela 5.4 – Parâmetros fermentativos de linhagens fermentadoras de xilose em meio sintético no intervalo de 72h.

Espécie da Levedura	Linhagem da levedura	Xilose Consumida (%)	$Y_{p/s}^{et}$ (g/g)	Qp (g/L.h)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	H (%)
<i>P. stipitis</i>	NRRL 7124	19,5	0,29	0,11	0,12±0,05	7,83±0,0	56,9
<i>Candida shehatae</i>	HM 51.3	27,85	0,23	0,12	0,48±0,07	8,3±0,33	45,1
<i>Candida shehatae</i>	HM 52.2	38,2	0,25	0,16	1,22±0,38	12,0±3,26	49,0
<i>Candida sp</i>	HMD 25.1	13,12	0,34	0,07	1,05±0,35	5,16±3,92	66,7
<i>S. passalidarum</i>	HMD 1.1	30,0	0,18	0,10	0,998 ±0,03	7,49 ±0,43	35,3
<i>S. passalidarum</i>	HMD 16.2	21,74	0,23	0,10	0,905±0,144	7,02±1,73	45,1
<i>S. passalidarum</i>	HMD 10.2	37,07	0,30	0,20	0,629 ±0,126	14,35 ±0,05	58,8
<i>S. passalidarum</i>	HMD 14.2	42,7	0,29	0,22	0,0±0,0	16,01 ±0,85	56,9
<i>S. suhii</i> sp. nov.	XMD 16.2	36,6	0,10	0,05	0,435±0,3	3,96±0,52	19,6
<i>S. roraimanensis</i> sp. nov.	XMD 23.2	20,44	0,10	0,03	0,59±0,01	2,19±0,08	19,6
<i>S. brasiliensis</i> sp. nov.	HMD 19.3	26,77	0,08	0,04	2,62±2,25	2,52±0,60	15,7

Xilose consumida (%) – consume de xylose em relação à concentração inicial. $Y_{p/s}^{et}$ (g/g) – Rendimento em etanol : Etanol produzido/ xilose consumida. Qp (g/L.h) – produtividade em etanol: concentração do etanol (g/L) / tempo (h) de fermentação. H (%) – Eficiência da fermentação: porcentagem do máximo teórico [(0,51 (etanolg/L/ xilose g/L)] em etanol.

5.4 Fermentação do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente

Os resultados da cinética de consumo da fermentação realizada com o bagaço deslignificado e hidrolisado enzimaticamente com carga de sólido de 7,5 g (13 %) e carga enzimática de 10 FPU (combinação esta escolhida por apresentar uma boa eficiência de hidrólise) utilizando a linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 estão apresentados na Figura 5.4. Ao final de 72 h de hidrólise enzimática, a fração líquida resultante foi utilizada para os ensaios de fermentação. Ao final da fermentação foram consumidos 77,92 % dos açúcares fermentescíveis totais (celobiose, glicose, xilose), produzindo $24,14 \pm 1,55$ g/L de etanol, resultando em um rendimento de 0,32 g/g e produtividade em etanol (Q_p) de 0,34 g/L.h. Foram realizadas fermentações em meio sintético com aproximadamente as mesmas proporções de açúcares do hidrolisado enzimático (13 % celobiose; 53,65 % glicose ; 30 % xilose e 3,36 % arabinose) como controle. Nestas fermentações com meio sintético, foram consumidos 78,58 % dos açúcares fermentescíveis que produziram $24,8 \pm 0,8$ g/L de etanol (figura 5.4). Neste ensaio, a linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 atingiu rendimento de 0,36 g/g e produtividade (Q_p) de 0,34 g/L.h em etanol. O aumento de da produção de etanol observado no hidrolisado e meio sintético em relação à fermentação com meio contendo apenas xilose é explicado pela presença da glicose e seu consumo como açúcar preferencial pelos microrganismos.

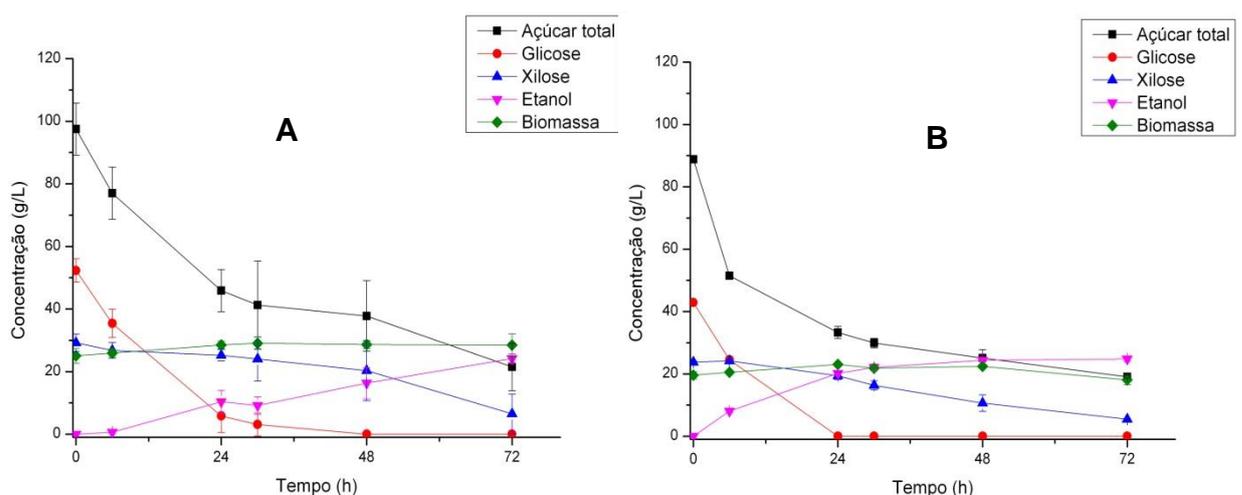


Figura 5.4 – Cinética do consumo dos açúcares fermentescíveis total, produção de etanol e biomassa durante a fermentação pela linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2. (A) - hidrolisado enzimático (13% bagaço e 10 FPU) e (B) - meio sintético (proporções de açúcar do hidrolisado enzimático).

Toda a glicose do hidrolisado foi consumida nas primeiras 48 h de fermentação; já no meio sintético o consumo total da glicose foi observado nas primeiras 24 h do ensaio. A xilose foi coconsumida lentamente enquanto havia glicose presente no meio. Porém ao final das 72 h ainda havia xilose residual, além de celobiose e arabinose (açúcar total), tanto na fermentação do hidrolisado enzimático como no meio sintético. A linhagem apresentou uma coassimilação dos açúcares, característica essa verificada por Long *et al.* (2012) utilizando a linhagem de *Spathaspora passalidarum* NN 245. Diante do exposto podemos presumir que o açúcar não consumido encontra-se na porcentagem residual da fermentação.

Cadete *et al.* (2012b) avaliaram o desempenho fermentativo de algumas leveduras em hemicelulose hidrolisada do bagaço da cana contendo xilose, glicose e arabinose, suplementado com extrato de levedura, dentre elas estavam às linhagens de *Spathaspora passalidarum* UFMG – HMD 1.1 e UFMG – HMD 14.1. Como resultado, a linhagem *Spathaspora passalidarum* UFMG – HMD 1.1 e UFMG – HMD 14.1 em um período de 96 h, consumiram respectivamente 84,9 e 91,0 % do açúcar total, sendo maior do que observado no presente trabalho. Entretanto, valores inferiores de rendimentos em etanol (0,20 e 0,18 g/g), produtividade (0,09 e 0,10 g/L.h) e produção de etanol (8,8 e 9,5 g/L) foram observados naquele trabalho quando comparados ao do presente trabalho com a linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 em ambas condições (hidrolisado e meio sintético). Na mesma direção, Ferreira *et al.* (2011) utilizaram a linhagem de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* UFMG – IMH 43.2 na fermentação do hidrolisado da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar com a concentração de 30 g/ L de xilose e 5g/L de extrato de levedura e obtiveram um alto consumo do açúcar de 93,3%, porém a produção de etanol de apenas 6,4 g/L, rendimento de 0,19 g/g e produtividade de 0,13 g/L.h, dados esses inferiores aos da *S. passalidarum* HMD 14.2 em ambas condições (hidrolisado e meio sintético). Já experimentos de fermentação de hidrolisado de casca de arroz pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e coquetéis enzimáticos, contendo 16,3 g/l de açúcares totais e suplementado, com a linhagem recombinante de *E. coli* FBR5 apresentaram os valores de 8,2 g/L de produção de etanol e 0,49 g/g de rendimento no período de 24 h. Já na fermentação da palha de trigo tratada da mesma forma, o hidrolisado contendo 41,5 g/L de açúcares totais com a mesma suplementação que a casca de arroz produziu 18,9 g/L de etanol com rendimento de 0,40 g/g. (SAHA; COTTA, 2006, 2007).

Embora esses resultados de rendimento em etanol sejam maiores que o obtido pela *S. passalidarum* HMD 14.2, o fato do meio está suplementado contribui para a produção de etanol, assim como a utilização de um recombinante de *E. coli* (linhagem FBR5) que pode fermentar misturas de açúcares para produzir etanol sem que ocorra repressão catabólica tão forte quanto em leveduras..

Estudo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 e bagaço de cana-de-açúcar explodido, deslignificado e hidrolisado enzimaticamente relatou produção de etanol de 23,3 g/L , rendimento 0,39 g/g e produtividade de 0,97 g/L.h (WANDERLEY *et al.*, 2013). Comparando estes dados com os obtidos neste trabalho, apontamos a levedura *S. passalidarum* HMD 14.2 como promissora quanto a produção de etanol. Ou seja, quando comparados os dados deste trabalho com os dados já publicados na literatura (Tabela 5.5), o desempenho fermentativo demonstrado pela linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 apresenta um potencial de aplicabilidade na área industrial por apresentar uma boa produção de etanol que refletiu na produtividade e rendimento no hidrolisado enzimático do bagaço. Durante as fermentações do hidrolisado e do meio sintético, neste trabalho houve o consumo de boa parte da xilose, aproximadamente 80 %, pela *S. passalidarum* HMD 14.2, podendo assim ser indicada a futuros testes envolvendo outras variedades de resíduo para a produção de etanol de segunda geração.

Tabela 5.5 – Produção de etanol por diferentes materiais lignocelulósicos e tratamentos.

SUBSTRATO	TRATAMENTO	LINHAGEM	ETANOL (g/L)	$Y_{p/s}^{et}$ (g/g)	QP (g/L. h)	SUPLEMENTAÇÃO	CONSUMO (%)	TEMPO (H)	REFERÊNCIA
Palha de trigo	PHA + HE	<i>Escherichia coli</i> FBR5	18,9	0,46	0,39	Extrato de levedura + Triptona	~100	48	SAHA; COTTA, (2006)
Casca de arroz	PHA + HE	<i>Escherichia coli</i> FBR5	8,2	0,49	0,34	Extrato de levedura + Triptona	~100	24	SAHA; COTTA, (2007)
Palha de cevada	PHA + HE	<i>Escherichia coli</i> FBR5	11,9	0,45	0,50	Extrato de levedura + Triptona	100	24	SAHA; COTTA, (2010)
Casca de arroz	Ácido diluído (H ₂ SO ₄)	<i>Spathaspora arborariae</i> HM 19.1 A	15,0	0,45	0,16	Não	~65	96	DA CUNHA <i>et al.</i> , (2011)
Bagaço de Cana (Hemicelulose)	Ácido diluído (H ₂ SO ₄)	<i>Scheffersomyces stipitis</i> UFMG-IMH 43.2	6,4	0,19	0,13	Extrato de levedura	100	48	FERREIRA <i>et al.</i> , (2011)
Palha de milho	PHA + HE	<i>S. cerevisiae</i> GLBRC Y35 (modificada)	13,7	0,40	0,11	Ureia +YNB	85,25	120	BANERJEE <i>et al.</i> , (2012)
Bagaço de Cana (hemicelulose)	Ácido diluído (H ₂ SO ₄)	<i>Spathaspora passalidarum</i> UFMG – HMD 1.1 e HMD 14.1	8,8/ 9,5	0,20/ 0,18	0,09/ 0,10	Extrato de levedura + peptona	84.9/ 91,0	96	CADETE <i>et al.</i> , (2012)
Bagaço de Cana	Explosão a vapor + delignificação+ HE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFPEDA 1238,	23,38	0,39	0,97	Extrato de levedura + (NH ₄) ₂ SO ₄ + KH ₂ PO ₄ + MgSO ₄ ·7H ₂ O	100	24	WANDERLEY <i>et al.</i> , (2013)
Bagaço de cana	OAFEX + HE	<i>Candida shehatae</i> HM 52.2	4,83	0,28	0,20	Extrato de levedura + extrato de Malte+ sulfato de amônio	100	24	CHANDEL <i>et al.</i> , (2013)
Bagaço de cana	PHA + HE	<i>Spathaspora passalidarum</i> HMD 14.2	24,14	0,32	0,34	Não	77,92	72	Neste trabalho
Meio sintético		<i>Spathaspora passalidarum</i> HMD 14.2	24,8	0,36	0,34		78,58	72	Neste trabalho

PHA- Peróxido de Hidrogênio alcalino; HE- Hidrólise enzimática; OAFEX – expansão de fibra por ácido oxálico; Sulfato de amônio - (NH₄)₂SO₄; Fosfato de dipotássio - KH₂PO₄; Sulfato de magnésio heptahidratado - MgSO₄ . 7H₂O.

6. CONCLUSÕES

- O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino mostrou-se eficiente na deslignificação do bagaço da cana-de-açúcar, sendo confirmado pela caracterização através do método de Van Soest e pela técnica de FTIR.
- Em relação à hidrólise enzimática, foi observado que a carga de enzima de 10 FPU/ g de bagaço, com carga de sólidos de 7,5 g (13%) foi a melhor em termos de eficiência em glicose levando em consideração alta concentração de açúcares e carga de enzima.
- As linhagens isoladas do bioma amazônico utilizadas assimilaram e converteram xilose a etanol em meio sintético, apesar de rendimentos bem variáveis.
- A linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 apresentou maior produção de etanol (16 g/L) e produtividade (0,22 g/L.h) em meio sintético apenas com xilose como substrato.
- A produção de etanol e a produtividade da linhagem *S. passalidarum* HMD 14.2 na fermentação do hidrolisado enzimático aumentaram em relação ao meio sintético contendo apenas xilose.
- *S. passalidarum* HMD 14.2 é a levedura indicada para testes complementares apresentando potencial de aplicabilidade na área industrial na produção de etanol de segunda geração.

REFERÊNCIAS

AGBOGBO, F.K. Coward-Kelly G., Torry-Smith, M., Wenger, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v.41, p. 2333–2336, 2006.

AGUARONE E. LIMA. A.U BORZANI W. **Biotechnologia de Alimentos e Bebidas produzidos por fermentação**. Edgard Blucher LTDA, 243 p. 1983.

AITA G.A., Salvi, D.A., Walker M.S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. **Bioresource Technology**, v.102, p. 4444–4448, 2011.

AMORIM, H.V.; Lopes, M.L.; de Castro Oliveira, J.V.; Buckeridge, M.S.; Goldman, G.H.; Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.1, p.1267–1275, 2011.

ARO N, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.

ARRUDA, P. V. Efeito do glicerol na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FIT20037. Dissertação de Mestrado, EEL, USP, Lorena-SP, p. 75, 2007.

BANERJEE, G.; CAR, S.; LIU, T.; WILLIAMS, D.L.; MEZA, S.L.; WALTON, J.D.; HODGE, D.B. Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.109, n.4, p.922-931, 2012.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J.S.; HODGE, D.B.; WALTON, J.D. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and

enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, n.1, p.1-15, 2011.

BASSO L. C. Amorim H. V. Oliveira A. J., Lopes M.L .Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1155–1163, 2008.

BRETHAUER. S.C.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology** xxx, 2009.

CADETE, R.M. Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulasas e xilanasas associadas à madeira em decomposição. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 109 p. 2009.

CADETE, R.M.; SANTOS, R.;MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.;STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.; LACHANCE, M.A.;ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. xx, p.1338–1342, 2009.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.; MOURO, A.; PROMPT, A.H.; GOMES, F.C.; STAMBUK, B.U.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie Van Leeuwenhoek, PLoS ONE**, v. 7, p 1-11, 2012a.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S. S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A., ROSA, C.A. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose- Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-11, 2012b.

CANILHA ,L.; SANTOS,V.T.O.; ROCHA,G.J.M.; ALMEIDA E SILVA J.B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.;FERRAZ , A.; MILAGRES A.M.F.; CARVALHO, W., A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p.1467–1475, 2011.

CANILHA, L.; CHANDEL, A.K.; DOS SANTOS MILESSI, T.S.; ANTUNES, F.A.F.; WAGNER FREITAS, L.C.; FELIPE, M.G. A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p 1-15. 2012.

CAO, W.; SUN, C.; LIU, R.; YIN, R.; WU, X. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v.111, p.215-221, 2012.

CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology**. Rev. 6, p. 08–20. 2011.

Conab (Companhia Nacional de Abastecimento-National Supply Company), 2012. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Terceiro Levantamento da Safra 2013/2014. Disponível em :
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_20_10_56_08_boletim_cana_portugues_-_dez_2013_3o_lev_-_original.pdf

CORREIA, J. A. C.; Marques Júnior, J. E.; Gonçalves, L. R. B.; Rocha, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 249-256, 2013.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S., GÓMEZ, E. O. Biomassa para Bioenergia.1. Ed. Campinas: Editora UNICAMP, 2008.

DA CUNHA-PEREIRA,F.; HICKERT,L.R.; SEHNEM, N.T.; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M A.Z.; Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218–4225, 2011.

EGGEMAN T., ELANDER R. T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 2019-2025, 2005

EMBRAPA. http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeacucar/arvore/CONTAG01_7_711200516715.html, Acesso realizado no dia 1 de maio de 2011.

FERREIRA, A.D.; MUSSATO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.;, SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v.28, p 547–554, 2011.

FREI, M. Lignin – characterization of a multifaceted crop component. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-25, 2013.

GANAPATHY, S. VAIL, D.R.; XU, J.; BURNER, D.M.; LAY JR; J.O.; GE, X.; WEATHERS, P.J. Review Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. **Engineering in Life Sciences**, v.10, n. 1, p. 8–18, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure Applied Chemistry**, v. 59, p. 257 - 268, 1987.

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

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, J. G. M.. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-deaçúcar. **Química Nova**, v.32, p.1500-1503, 2009

JEFFRIES, T.W. Engineering the *Pichia stipitis* genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates. (Wall JD, Harwood CS & Demain A, eds), **ASM Press**, Washington, DC. p. 37 – 47, 2008.

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. Genome sequence of the lignocellulose-

bioconverting and xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, n.3, p. 319–326, 2007.

JOJIMA, T. CRISPINUS, A. OMUMASABA, MASAYUKI INUI , HIDEAKI YUKAWA. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p.471– 480, 2010.

HOU, X; YAU, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2591-2601, 2011.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S. Can lignin be accurately measured ? **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 832–839, 2005.

HICKERT,L.R.; DA CUNHA-PEREIRA,F.; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M A.Z.; Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 508–514, 2013.

KARAGÖZ, P.; VAITKEVICIUTE-ROCHA, I.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 349-357, 2012.

KUMAR, R.; SOMPAL, SINGH.; · O.M. V. SINGH. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008.

LONG, T. M.; SU, Y.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the Beetle associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. **AEM**, v. 78, p. 5492-5500, 2012.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA, N.; JR, POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1196–1201, 2011.

MARTÍN. C.; ROCHA. G. J. M.; SANTOS, J. R. A.; WANDERLEY. M. C. A. AND GOUVEIA. E.R. Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, v. 35, p. 1927-1930, 2012.

MATTOS ET AL., Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n.3, p. 373-380, 2003.

MILLER, L.G, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, A. R. Deleção do gene PGI1 da levedura *Pichia stipitis* para aumentar o rendimento fermentativo a etanol. Dissertação de mestrado. Departamento de ciências Biológicas. UFPE. Recife, 2011

Ministério da Agricultura, <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>, acesso realizado no dia 2 de setembro de 2013.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and bioenergy**, v.56, p. 526 -544, 2013.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH. M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5.ed. Porto Alegre : Artmed, 1274p, 2011.

NGUYEN, N.H.; SUH, S.O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose- fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232–1241, 2006.

OGEDA, T.L; PETRI, D. F. S. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA. **QUIMICA. NOVA**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010

RABELO, S. C.; AMEZQUITA, N.A.; ANDRADE, R.R, MACIEL FILHO, R.; Costa, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v.35, n.7, p. 2600 - 2607, 2011.

RABELO, S.C.; MACIELFILHO, R.; COSTA, A.C. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.144, n.1, p.87-100, 2008.

RAVEN, P.H. EVERT , R.F. EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 6. ed.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v.34, n.7 , p.1242-1254, 2011.

SAHA, B.C.; COTTA, M.A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 449 – 453, 2006.

SAHA, B.C. e COTTA, M.A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, n.4, p.528-532, 2007.

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

SALMAN, A. K. D.; FERREIRA, A. C. D.; SOARES, J. P. G. S.; SOUZA, J. P. Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos. Documento 136, EMBRAPA, maio, 2010.

SHEN, F.; ZHONG, Y.; SADDLER, J.N.S.; LIU, R. Relatively High-Substrate Consistency Hydrolysis of Steam-Pretreated Sweet Sorghum Bagasse at Relatively Low Cellulase Loading. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.165, p.1024–1036, 2011.

SHIELDS, S.; BOOPATHY, R., Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cane. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p.142-146, 2011.

SILVA, F. A. S e AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA-FILHO, E.A.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; DE MORAIS, J.O.F., DE MORAIS JR, M.A.; SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuelethanol fermentation process assessed by PCR fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p.13–23, 2005.

SLUITER, A., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Technical Report NREL/TP – 510 - 42619. Issue Date: 7/17/2005.

SOCCOL,C.R.,VANDEMBERGUE,L.P.S.,MEDEIROS,A.B.P.,KARP,S.G.,BUCKERIDGE,M.,RAMOS,L.P.,PITARELO, A.P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L.M.F. FERRARA, M.A., BOM, E.P.S., MORAES, L.M.P., ARAÚJO,J.A.,TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology** 101, 4820-4825, 2010.

SOLA, M.C, OLIVEIRA, A.P, FEISTEL, J.C., MINAFRA E REZENDE, C.S. Manutenção de microorganismos: conservação e viabilidade, **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1398-1418, 2012.

SUN, Y., CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic bagasses for ethanol production: a review. **Bioresource Technolog**, v. 83, p. 1–11, 2002.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **Internacional Journal Molecular Science**, v.9, p. 1621-1651, 2008.

UNICA - União da indústria de cana-de-açúcar. .
<http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes/>, acesso realizado em 3 de setembro de 2013.

ZALDIVAR · J. NIELSEN · L. OLSSON. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p.17–34, 2001.

WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, C.; DE MORAES ROCHA, G. J.; GOUVEIA, E. R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448 – 453, 2013.

WEISS, N.D.; NAGLE, N.J.; TUCKER, M.P.; ELANDER, R.T. High xylose yields from dilute acid pretreatment of corn stover under process–relevant conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.155, p. 418 – 428, 2009.

WOOD, T. M., BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. In: W. A. Wood and S. T. Kellog (eds.), *Methods in enzymology*. **Academic Press**, San Diego, CA. v.160, p. 87 - 116, 1987

APÊNDICE A – Liberação de glicose e xilose na hidrólise enzimática ao final das 72 h, glicose e xilose presentes no complexo enzimático e eficiência da glicose (EG) e xilose (EX) para carga enzimática de 10 FPU.

Carga de Sólidos (g)	Hidrolisado		Enzima		EG ¹ (%)	EX ² (%)
	Glic (g/L)	Xil (g/L)	Glic (g/L)	Xil (g/L)		
1	7,2	3,58	0,89	1,0	59,17 ± 1,89	53,4 ± 1,35
2	13,11	5,54	1,88	2,27	54,64 ± 4,1	49,78 ± 4,7
3	23,85	8,99	3,88	4,96	56,93 ± 2,44	46,6 ± 2,46
4	25,95	12,35	4,11	5,23	56,11 ± 2,32	48,5 ± 3,03
5	30,26	13,29	5,35	7,29	54,10 ± 2,94	43,2 ± 2,53
7,5	48,58	24,12	8,15	10,2	60,12 ± 5,95	54,2 ± 2,17

- 1- As eficiências em glicose foram calculadas pela diferença da glicose do hidrolisado menos a glicose da enzima.
- 2- As eficiências em xilose foram calculadas pela diferença da xilose do hidrolisado menos a xilose da enzima.

APÊNDICE B – Liberação de glicose e xilose na hidrólise enzimática ao final das 72 h, glicose e xilose presentes no complexo enzimático e eficiência glicose (EG) e xilose (EX) para carga enzimática de 20 FPU.

Carga de Sólidos (g)	Hidrolisado		Enzima		EG ¹ (%)	EX ² (%)
	Glic (g/L)	Xil (g/L)	Glic (g/L)	Xil (g/L)		
1	9,94	4,52	1,6	2,25	81,6 ± 9,56	61,72 ± 5,93
2	19,6	9,26	4,33	5,55	81,77 ± 2,05	70,5 ± 3,32
3	25,68	11,27	6,67	8,92	73,25 ± 3,81	58,4 ± 5,8
4	35,38	15,54	9,44	12,86	76,5 ± 9,36	54,74 ± 2,99
5	37,73	14,51	14,1	19,42	67,44 ± 6,43	47,14 ± 7,72
7,5	52,4	25,74	16,0	20,45	64,84 ± 4,85	53,92 ± 2,51

- 1- As eficiências em glicose foram calculadas pela diferença da glicose do hidrolisado menos a glicose da enzima.
- 2- As eficiências em xilose foram calculadas pela diferença da xilose do hidrolisado menos a xilose da enzima.