

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

**MARIA CAROLINA DE ALBUQUERQUE WANDERLEY**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM BATELADA  
ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*  
UFPEDA 1238 EM PROCESSOS SHF**

**RECIFE**

**2012**

**MARIA CAROLINA DE ALBUQUERQUE WANDERLEY**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM BATELADA  
ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*  
UFPEDA 1238 EM PROCESSOS SHF**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ester Ribeiro Gouveia

Co-orientador: Dr. George Jackson de Moraes Rocha

**RECIFE**

**2012**

**Wanderley, Maria Carolina de Albuquerque**

**Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processos SHF/ Maria Carolina de Albuquerque Wanderley. – Recife: O Autor, 2012.**

**97 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia**

**Coorientador: George Jackson de Moraes Rocha**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas/ Ambientais, 2012.**

**Inclui bibliografia e apêndices**

- 1. Etanol 2. Bagaço de cana 3. *Saccharomyces cerevisiae* I. Gouveia, Ester Ribeiro II. Rocha, George Jackson III. Título.**

**662.6692**

**CDD (22.ED.)**

**UFPE/CCB-2012-091**

MARIA CAROLINA DE ALBUQUERQUE WANDERLEY

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM BATELADA  
ALIMENTADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae*  
UFPEDA 1238 EM PROCESSOS SHF

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Biotecnologia  
Industrial da Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Ester Ribeiro Gouveia  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Glicia Maria Torres Calazans  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Profª Drª Norma Buarque de Gusmão  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 27 de fevereiro de 2012.

*Dedico este trabalho à minha filha, Maria  
Luísa e aos meus pais, Domingos e Josélia.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. À minha filha, Maria Luísa, por me acalmar com seu carinho, seus sorrisos e palavras doces que sempre me fazem esquecer os momentos difíceis. Ao meu namorado, Danilo, por todo amor, companheirismo, respeito e compreensão. À minha irmã, Natália, minha cúmplice e amiga.

À minha orientadora Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia, que representou mais que sua função na minha vida. Não mediu esforços para me apoiar e incentivar, tanto no crescimento acadêmico quanto pessoal. Agradeço por enfrentar junto a mim o desafio da construção deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) e da minha turma de mestrado, que me ajudaram e tornaram mais felizes os dias de trabalho. Ao Departamento de Antibióticos e ao LPB pela disponibilização de sua estrutura e laboratórios. À UFPE e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial por todo incentivo e apoio oferecido.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha pelo enriquecimento deste trabalho e ao Laboratório Nacional de Tecnologia do Bioetanol (CTBE) pela disponibilidade de sua estrutura para análises de parte deste trabalho. Ao Sidnei Ramis de Araújo pelo suporte nas análises de microscopia eletrônica de varredura. À Fernanda Mendes por ajudar nas análises de área superficial realizadas no CTBE.

À Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) pela disponibilidade de seus laboratórios. Prof. Dr. Paulo Suzuki, pelo auxílio concedido durante as análises de difratometria de raios X.

Aos professores participantes da banca avaliadora pela presença e contribuições para este trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) por todo auxílio financeiro concedido (bolsa e auxílio à mobilidade discente).

A todos que acreditaram em mim, espero que um dia eu retribua toda a esperança aqui depositada. É com muito orgulho que concluo mais uma etapa da minha vida, sabendo que 'o que está escrito em mim, comigo ficará guardado'.

*“Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidades, lembrai-vos de que as  
grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

A hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar foi realizada com bagaço pré-tratado por explosão a vapor, com e sem deslignificação com hidróxido de sódio. Após a deslignificação, o teor de celulose na fração sólida aumentou (74,98 %) e o de lignina diminuiu (83,35 %). A hidrólise do bagaço utilizando celulases (10 FPU/g de celulose) e  $\beta$ -glucosidase (5 % ou 10 % v/v do volume adicionado de Celluclast 1.5L), resultou na formação de 16,79 g/L e 40,58 g/L de glicose para o bagaço não-deslignificado (ND) e deslignificado (D), respectivamente. Na hidrólise enzimática em batelada alimentada, foram iniciados experimentos com 8 g de bagaço, e 1 g de material foi adicionado periodicamente após 12, 24 ou 48 horas. Maiores concentrações de glicose foram obtidas quando foi utilizado o intervalo de alimentação de 12 horas, apesar da conversão ser a menor dentre os três casos. A concentração de glicose alcançou 59,69 g/L quando foi utilizado material pré-tratado e deslignificado, com 12 horas de intervalo de alimentação. Fermentações dos hidrolisados foram realizadas utilizando um inóculo padronizado contendo 8 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238. As produtividades volumétricas em etanol nas fermentações dos hidrolisados dos materiais ND e D foram: 0,42 g/L.h e 0,97 g/L.h, respectivamente, ambos com intervalo de 12 horas. Apesar da recuperação em massa após a deslignificação ter sido cerca de 50%, a produção de etanol por tonelada de bagaço foi superior na fermentação do material deslignificado para todos os diferentes intervalos de alimentação. A análise de variância mostrou que a utilização do bagaço D, com intervalo de alimentação de 12 horas, foi a que apresentou o melhor resultado na produção de etanol por tonelada de bagaço.

**Palavras-chave:** bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, batelada alimentada.

## ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of steam explosion sugar cane bagasse with and without delignification with sodium hydroxide was performed. After the delignification, cellulose content in the solid fraction increased (74.98%) and the content of lignin decreased (83.35%). The hydrolysis of sugar cane bagasse using cellulases (10 FPU/g cellulases) and  $\beta$ -glycosidase (5 % v/v or 10 % of the added Celluclast 1.5L amount), resulted in releasing 16.79 g/L and 40.58 g/L sugars for non-delignified (ND) and delignified (D) bagasse, respectively. In fed-batch enzymatic hydrolysis, experiments were started with 8 g bagasse, and 1 g of material was added periodically after 12, 24 or 48 h. Glucose concentrations were higher when the addition period was 12 h, although the conversion have been lower. Glucose concentration reached 59.69 g/L after 60 h in the experiment with the delignified bagasse. Fermentations of hydrolysates were performed using inoculum of 8 g/L of *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238. Ethanol volumetric productivities in the fermentations of the hydrolysates ND and D material were: 0.42 g/L.h (12-h addition period) and 0.97 g/L.h (12-h addition period), respectively. Despite the mass recovery after delignification have been about 50 %, the production of ethanol per ton of bagasse was higher in the fermentation of the delignified material. Analysis of variance showed that the use of delignified bagasse with 12 hours of feeding interval obtained the best result in the production of ethanol per ton of bagasse.

**Keywords:** sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, fed-batch.

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 FONTES ENERGÉTICAS.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....</b>	<b>5</b>
<b>3.3 PRÉ-TRATAMENTOS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....</b>	<b>10</b>
<b>3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA.....</b>	<b>12</b>
<b>3.6 PRODUÇÃO DE ETANOL POR <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 MATERIAL .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1.2 Enzimas .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1.3 Microrganismo .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1.4 Meios de cultura .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5 FERMENTAÇÕES.....</b>	<b>20</b>
<b>4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.6.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.....</b>	<b>21</b>
<b>4.6.2 Análise do bagaço por microscopia eletrônica de varredura.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6.3 Análise de Área Superficial do Bagaço .....</b>	<b>23</b>
<b>4.6.4 Determinação das atividades enzimáticas .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6.5 Quantificação do crescimento.....</b>	<b>27</b>
<b>4.6.6 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, glicerol e etanol.....</b>	<b>28</b>

4.6.7	Determinação de hidroximetilfurfural e de furfural .....	28
4.6.8	Determinação de fenóis totais.....	29
4.7	PARÂMETROS CINÉTICOS.....	29
4.7.1	Velocidade máxima específica de crescimento .....	29
4.7.2	Rendimento em etanol a partir de glicose ( $Y_{P/S}$ ) .....	30
4.7.3	Rendimento em biomassa microbiana ( $Y_{X/S}$ ).....	30
4.7.4	Eficiência da fermentação ( $E_f$ ).....	31
4.7.5	Produtividade volumétrica em produto ( $Q_P$ ) .....	31
4.7.6	Conversão de celulose ( $C_C$ ) .....	32
4.8	RENDIMENTO EM MASSA APÓS OS PRÉ-TRATAMENTOS .....	32
4.9	PRODUÇÃO DE ETANOL EM RELAÇÃO AO BAGAÇO .....	33
4.10	ANÁLISE DE VARIÂNCIA .....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	DESLIGNIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO .....	35
5.2	HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS.....	38
5.2.1	Hidrólises enzimáticas em batelada.....	38
5.2.2	Hidrólises enzimáticas em batelada alimentada.....	40
5.3	SELEÇÃO DA LINHAGEM DE <i>S. CEREVISIAE</i> E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO.....	48
5.4	FERMENTAÇÕES DOS HIDROLISADOS.....	53
6	CONCLUSÕES.....	59
7	REFERÊNCIAS .....	60
	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS .....	71
	APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS .....	97

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>3.1</b>	Fração celulósica de materiais lignocelulósicos.....	6
<b>Figura</b>	<b>3.2</b>	Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico.....	7
<b>Figura</b>	<b>3.3</b>	Estrutura dos alcoóis precursores da lignina.....	7
<b>Figura</b>	<b>3.4</b>	Esquema de um pré-tratamento com vapor.....	9
<b>Figura</b>	<b>3.5</b>	Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico. A endoglucanase atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente, que liberam celobiose, para a $\beta$ -glucosidase .....	11
<b>Figura</b>	<b>3.6</b>	Esquema representativo da fermentação alcoólica.....	14
<b>Figura</b>	<b>3.7</b>	Regeneração de NAD na formação de glicerol.....	16
<b>Figura</b>	<b>5.1</b>	Fotomicrografias do bagaço de cana “in natura” (A), pré-tratado por explosão a vapor (B) e pré-tratado por explosão a vapor com deslignificação (C). As setas representam flocos de medula. Aumento de 100 x.....	36
<b>Figura</b>	<b>5.2</b>	Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas do bagaço pré-tratado, mas não-deslignificado (ND) e pré-tratado e deslignificado (D).....	39
<b>Figura</b>	<b>5.3</b>	Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas em batelada alimentada do bagaço pré-tratado, mas não-deslignificado (A) e pré-tratado e deslignificado (B).....	41
<b>Figura</b>	<b>5.4</b>	Conversões de celulose nas hidrólises em batelada (A) e em batelada alimentada para o bagaço apenas pré-tratado a vapor (B) e pré-tratado e deslignificado (C).....	42
<b>Figura</b>	<b>5.5</b>	Fotomicrografia do material D após a hidrólise enzimática em batelada alimentada, com aumentos de 500 x. Intervalo de alimentação de 12 horas (A). Intervalo de alimentação de 24 horas	

		(B). Intervalo de alimentação de 48 horas (C).....	44
<b>Figura</b>	<b>5.6</b>	Concentrações de HMF, furfural (A) e compostos fenólicos (B) nos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise enzimática em batelada alimentada do bagaço deslignificado (D) e não-deslignificado (ND).....	46
<b>Figura</b>	<b>5.7</b>	Crescimento das duas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> no meio do inóculo.....	49
<b>Figura</b>	<b>5.8</b>	Efeito do tamanho do inóculo no crescimento durante a produção de etanol.....	50
<b>Figura</b>	<b>5.9</b>	Produtividades e rendimentos em etanol das linhagens UFPEDA 1238 e UFPEDA 1324 durante a padronização do inóculo.....	51
<b>Figura</b>	<b>5.10</b>	Eficiências das linhagens UFPEDA 1238 e UFPEDA 1324 durante a padronização do inóculo .....	52
<b>Figura</b>	<b>5.11</b>	Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ ), rendimento de etanol por grama de glicose ( $Y_{P/S}$ ) e por tonelada de bagaço na fermentação dos hidrolisados enzimáticos.....	54
<b>Figura</b>	<b>5.12</b>	Concentrações de glicerol e ácido acético após 24 horas de fermentação dos hidrolisados enzimáticos.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>4.1</b>	Equações utilizadas para a análise da variância (Callegari-Jacques, 2003) .....	34
<b>Tabela</b>	<b>5.1</b>	Composição do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a deslignificação .....	35
<b>Tabela</b>	<b>5.2</b>	Concentrações de Glicose e Etanol durante as fermentações.....	51
<b>Tabela</b>	<b>5.3</b>	Resultados das fermentações dos hidrolisados enzimáticos dos bagaços não-deslignificado (ND12 – 12 em 12 horas; ND24 – 24 em 24 horas; ND48 – 48 em 48 horas) e deslignificado (D12 – 12 em 12 horas; D24 – 24 em 24 horas; D48 – 48 em 48 horas) .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of Variance
BET	Brunauer, Emmett e Teller
CBH I e II	Celobiohidrolases I e II
CBU	Cellobiose Unity
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cc	Conversão de celulose
CV	Coeficiente de Variação
D	Bagaço deslignificado
DRX	Difratometria de Raios X
EEL-USP	Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo
FPU	Filter Paper Unity
LPB	Laboratório de Processos Biotecnológicos
HMF	Hidroximetilfurfural
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ND	Bagaço não-deslignificado
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
SHF	Sacarificação e Fermentação em Separado

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se em posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas, pelo fato de ser um dos maiores potenciais de matérias-primas renováveis do planeta, pela grande disponibilidade de culturas agrícolas de grande extensão, com destaque para a indústria canavieira, possuir imensa radiação solar, diversidade de clima e pioneirismo na produção de biocombustível em larga escala, o etanol (CGEE, 2010).

Materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa de planta e consistem, principalmente, de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Badhan *et al.*, 2007). A biomassa lignocelulósica fornece matéria-prima de baixo custo para produção de combustíveis e produtos químicos (Rabelo *et al.*, 2011). O bagaço de cana-de-açúcar, para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados em estudos para a bioconversão em etanol, uma vez que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem (Pandey e Soccol, 2000).

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar é necessária para a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, para posterior fermentação e produção de bioetanol (Martín *et al.*, 2007). A idéia de usar a hidrólise enzimática como forma de obtenção de açúcares fermentáveis, em contraposição à hidrólise ácida, deve-se à necessidade de buscar não só maiores eficiências, mas também desenvolver um processo brasileiro aceitável em termos ecológicos. Outro fator considerável é a importância que se minimizem os riscos normalmente associados às altas pressões e temperaturas, presença de líquidos e gases corrosivos e da necessidade de normas especiais de construção, manutenção e operação dos equipamentos que normalmente fazem parte das instalações de hidrólise ácida.

A hidrólise enzimática desses materiais é conduzida por celulasas, sendo que os dois maiores grupos de celulasas que estão envolvidos no processo de hidrólise são: endoglucanases e exoglucanases (Sun e Cheng, 2002). As celulasas quebram a celulose em celobiose, que é subsequente clivada à glicose pela  $\beta$ -glucosidase (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000). A concentração de substrato é um

dos fatores que afeta a produção e a velocidade inicial da hidrólise enzimática da celulose, uma vez que altas concentrações de substrato podem causar inibição pelos produtos formados (Sun e Cheng, 2002).

A hidrólise enzimática para que seja eficiente, é necessário primeiramente submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento, para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático. Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (Adsul *et al.*, 2005). Devido às condições empregadas nos pré-tratamentos térmicos e químicos, também é originada uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais tanto da hidrólise enzimática, quanto da fermentação (Palmqvist e Hahn- Hägerdal, 2000).

A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar e a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* podem ser conduzidas separadas, um processo conhecido como hidrólise e fermentação em separado (SHF) ou juntas, conhecido como Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) (Olofsson *et al.*, 2008).

O tema relacionado ao presente trabalho é bastante atual. Entretanto, há uma escassez de trabalhos na literatura relacionados à SHF, dificultando a discussão dos resultados, principalmente no que diz respeito à utilização do bagaço de cana-de-açúcar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Comparar a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor com e sem deslignificação.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar hidrólises enzimáticas do bagaço de cana-de-açúcar com e sem deslignificação para definir o intervalo de tempo de alimentação em batelada alimentada;
- b) Realizar hidrólises enzimáticas, em batelada alimentada, do bagaço de cana-de-açúcar com e sem deslignificação para determinar a influência da adição de substrato durante o processo;
- c) Selecionar uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando três concentrações de biomassa no inóculo e duas linhagens;
- d) Realizar fermentações dos hidrolisados enzimáticos pela levedura selecionada para analisar a fermentabilidade dos mesmos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fontes Energéticas

Um fenômeno importante do início do século 21 é a transição para uma atividade industrial menos dependente do petróleo, no sentido oposto ao que foi observado ao longo do século 20 (Galembeck *et al.*, 2009).

A busca de fontes de energia sustentáveis e materiais renováveis é cada vez mais frequente. O aumento da demanda energética, o esgotamento de combustíveis fósseis e o acúmulo de CO<sub>2</sub> atmosférico devido à sua queima são os principais motivos que explicam esse fato (Zhang, 2008).

No ano de 1975, o Governo Federal brasileiro impulsionou a industrialização do álcool com a criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) devido à crise internacional do comércio de petróleo iniciada nos anos 70. O programa foi responsável pela grande expansão do cultivo de cana-de-açúcar. A proposta era substituir a gasolina pelo álcool, além de estabelecer cotas de produção e controles de preços (Prudente *et al.*, 2010).

O etanol de primeira geração é obtido a partir da cana-de-açúcar no Brasil, e do milho nos Estados Unidos, e possuem tecnologias bem estabelecidas. Apesar disso, a produção de etanol a partir do milho é mais complexa devido às etapas adicionais ao processo, como gelatinização através do calor e hidrólise enzimática antes da fermentação da glicose a etanol (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010a).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é considerada uma das principais culturas produzidas no Brasil. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira, está estimada em 8.167,5 mil hectares, distribuídos em todos Estados produtores, como São Paulo, que ocupa o primeiro lugar entre os produtores do país, seguido do Paraná, Goiás, Alagoas, Mato Grosso do Sul e Pernambuco. Nos demais Estados, embora as áreas de cultivo sejam menores, apresentam bons índices de produtividade (Brasil, 2010). A cana-de-açúcar é

composta por 12-18% de açúcar, 12-14% de fibras, 0,1-0,3% de cera e 2-3% de cinzas (Banerjee e Pandey, 2002).

Entretanto, algumas questões têm sido discutidas acerca da produção do etanol de primeira geração, como disponibilidade e preços de matéria-prima e abastecimento, alimento versus combustível, área para plantio e uso da água, intensa utilização de insumos agrícolas, entre outras (Kumar e Murthy, 2011).

A indústria sucroalcooleira gera resíduos, como o bagaço e a vinhaça, que são reutilizados na tentativa de minimizar os custos de produção. O bagaço é um tipo de material lignocelulósico excedente das destilarias e usinas e é utilizado como fonte de energia em indústrias de vários setores (Cortez *et al.*, 1992).

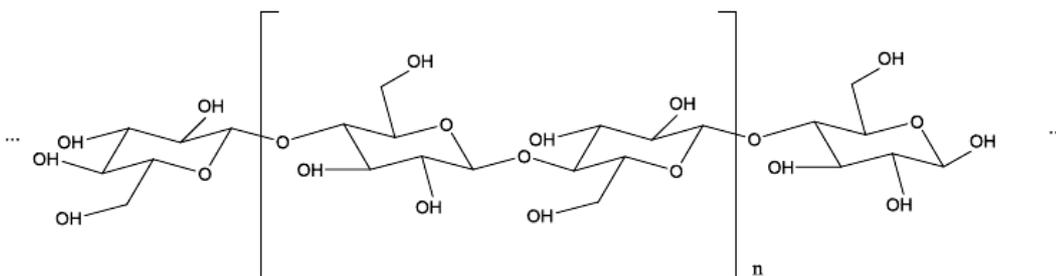
Nos últimos anos, o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos tem aumentado devido à sua utilização como combustível, mas ainda é considerado um desafio (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010b; Martín *et al.*, 2007). Além do que, é necessário que haja uma melhoria das técnicas para conversão de biomassa em etanol antes de sua comercialização (Arantes e Saddler, 2011).

### **3.2 Materiais Lignocelulósicos**

Os materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol devido a sua disponibilidade e baixo custo (Martín *et al.*, 2007; Kumar e Murthy, 2011), além disso, seu uso reduz a emissão de carbono para a atmosfera, são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). A utilização integral dos componentes do bagaço tem sido desejada tanto por razões econômicas como relacionadas ao meio ambiente (Rocha *et al.*, 2011).

As três frações poliméricas que constituem as biomassas lignocelulósicas são: celulose, lignina e hemicelulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, formando uma rede complexa resistente a ataques microbianos. Em termos percentuais, o bagaço é constituído por 32-48% de celulose, 19-24% de hemicelulose, 23-32% de lignina, 3,22-5,5% de cinza, 0,10-0,15% de enxofre, 0,73-0,97% de potássio (Banerjee e Pandey, 2002).

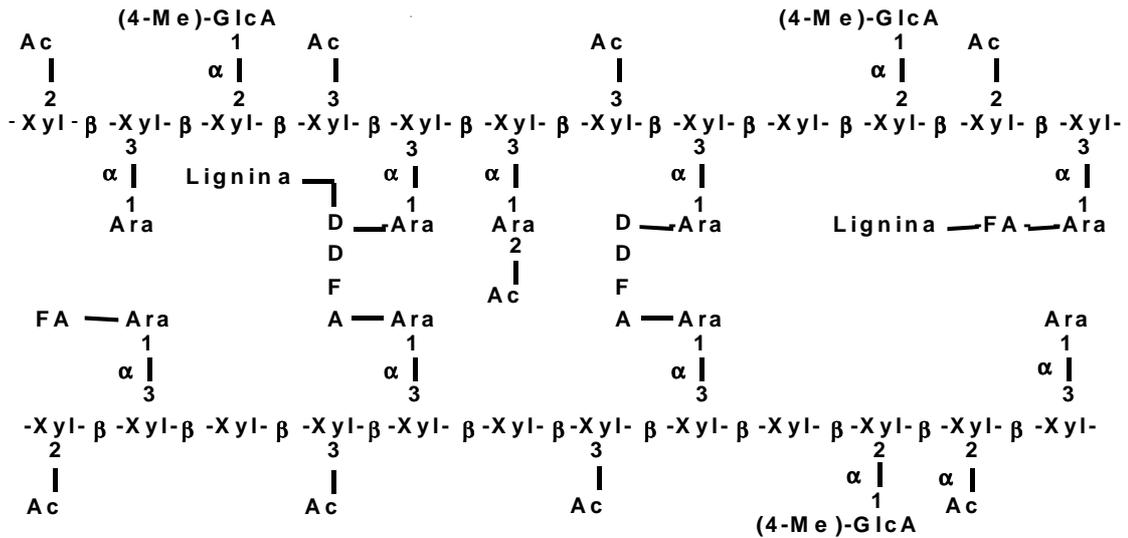
A celulose é um polímero linear associado por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas que possui a celobiose como unidade repetitiva do polímero (Zhang, 2008), como observado na Figura 3.1. Suas moléculas encontram-se dispostas como espirais, ligadas por pontes de hidrogênio inter e intramoleculares, conferindo força e flexibilidade ao material e tornando a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (Castro e Pereira, 2010).



**Figura 3.1** Fração celulósica de materiais lignocelulósicos (Castro e Pereira, 2010).

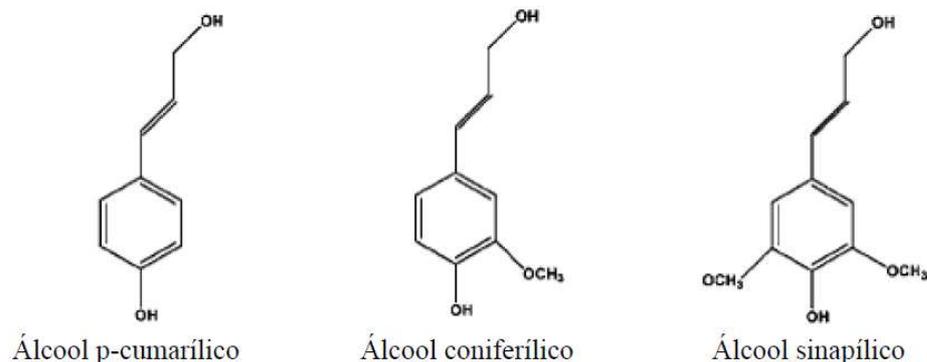
A hemicelulose (Figura 3.2) é um polissacarídeo ramificado formado pela combinação de vários açúcares como pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e desoxiexoses. Também chamada de poliose. De acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero, são classificadas como xilanas, glucomananas e galactanas (Fengel e Wegener, 1989).

A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. As madeiras moles apresentam maior proporção de galactoglucomananas do que xilanas, enquanto as madeiras duras são mais ricas em xilanas (Fengel e Wegener, 1989). A composição de xilanas de gramíneas foi estudada por vários autores, entre eles por (McDougall *et al.*, 1993). Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas se encontra na Figura 3.2.



**Figura 3.2** Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDougall et al., 1993).

Formada por ligações éter biologicamente estáveis, a lignina aumenta a resistência mecânica das plantas e é uma das macromoléculas orgânicas mais importantes e abundantes dentre os materiais lignocelulósicos. É gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos alcoóis hidroxicinâmicos: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 3.3) (Fengel e Wegener, 1989).



**Figura 3.3.** Estrutura dos alcoóis precursors da lignina (adaptado de Yu *et al.*, 2008).

O bagaço é um resíduo que está presente em grande volume em uma usina.

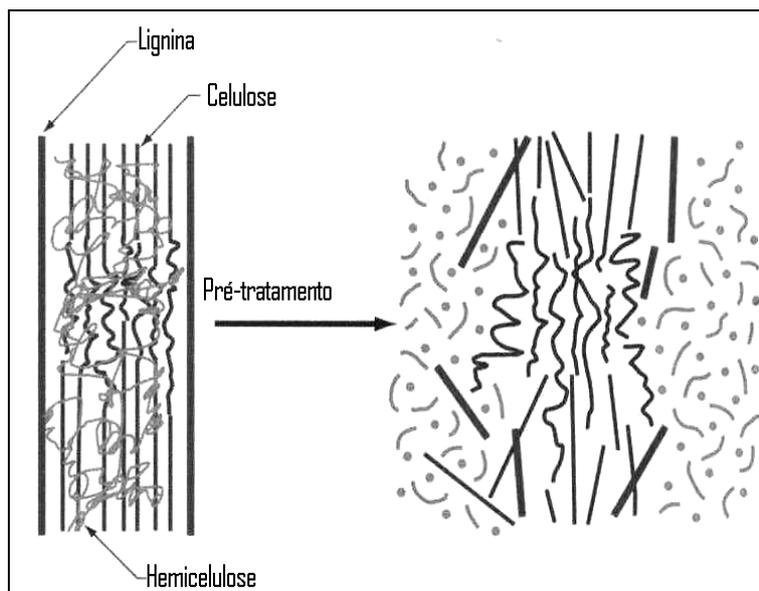
Apesar da sua utilização como fonte de energia elétrica em caldeiras, uma grande quantidade de biomassa remanescente é queimada, contribuindo para o aumento da acidez no solo e provocando poluição atmosférica na forma de fumaça e partículas suspensas no ar, deteriorando a qualidade ambiental da região (Aquino *et al.*, 1999).

A biomassa, entretanto, pode ser processada para obtenção de diversos subprodutos. Os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontamente disponíveis para a bioconversão. São compostos formados por polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, que precisam ser hidrolisados por ácidos ou enzimas, a açúcares fermentáveis (Martín *et al.*, 2007).

Para obtenção rápida da hidrólise enzimática da biomassa com um rendimento alto de açúcares (tanto hexoses como pentoses), as duas principais camadas de proteção em torno da celulose – hemicelulose e lignina – precisam ser removidas ou alteradas sem que haja degradação dos açúcares da hemicelulose (Öhgren *et al.*, 2007).

### **3.3 Pré-Tratamentos do Bagaço de Cana-de-Açúcar**

Devido à estrutura recalcitrante da lignocelulose, uma etapa de pré-tratamento é necessária antes da hidrólise enzimática para tornar a celulose mais acessível ao ataque das enzimas (Galbe e Zacchi, 2002). Em pré-tratamentos pouco severos, como o pré-tratamento a vapor, a recuperação dos açúcares da hemicelulose é alta, embora a hemicelulose residual dificulte o acesso da enzima à celulose. O mesmo acontece com a lignina, que forma uma barreira física ao ataque enzimático, e não é removido totalmente no pré-tratamento a vapor (Hsu, 1996). O efeito do tratamento por explosão a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, sua susceptibilidade à hidrólise ácida e/ou enzimática. Por esta razão, este método de pré-tratamento tem sido proposto para a conversão de biomassa lignocelulósica a etanol (Öhgren *et al.*, 2007). A Figura 3.4 apresenta um esquema de pré-tratamento de material lignocelulósico.



**Figura 3.4.** Esquema de pré-tratamento (Hsu *et al.*, 1980).

Os processos de pré-tratamento e deslignificação têm o objetivo de romper o complexo celulose-hemicelulose-lignina, e são etapas importantes para o fracionamento dos materiais lignocelulósicos em seus componentes principais, logo, estão de acordo com a filosofia da biorrefinaria (Chandra *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2007; Mussatto *et al.*; 2006; Rocha, 2000; Saad *et al.*, 2008).

Os pré-tratamentos tradicionais são realizados de forma severa, destrutiva e não eficientes o bastante. Foram descritos métodos inovadores capazes de separar os três principais constituintes poliméricos da biomassa lignocelulósica e descristalizar a celulose com a mínima alteração química da hemicelulose e lignina (Kumar *et al.*, 2009; Yang e Wyman, 2008).

A deslignificação alcalina é um processo empregado com hidróxido de sódio para extrair a maior parte da lignina, deixando um sólido rico em celulose (Fengel e Wegener, 1984). Esse processo causa um inchaço no material lignocelulósico, o que leva a um aumento na área superficial interna, uma diminuição no grau de polimerização, separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos e ruptura da estrutura da lignina (Fan *et al.*, 1982). Rocha *et al.* (2011) realizaram deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar com o objetivo de diminuir os efeitos inibitórios das enzimas celulolíticas devido à presença da lignina.

### 3.4 Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-De-Açúcar

A hidrólise com ácido diluído é um processo mais rápido e mais fácil do que a hidrólise enzimática. Entretanto, o rendimento em etanol pode diminuir devido à presença de inibidores para a etapa posterior de fermentação, tais como ácidos orgânicos fracos, derivados furânicos e compostos fenólicos gerados durante a hidrólise da lignocelulose (Palmqvist e Hähn-Hagerdal, 2000; Rabelo, *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática é realizada em condições mais amenas, geralmente em pH igual a 4,8 e temperatura entre 45-50 °C e não apresenta problemas de corrosão, como observado nas hidrólises com ácidos e/ou com bases (Duff e Murray, 1996; Rivera *et al.*, 2010). Além disso, a especificidade das enzimas é um fator relevante, pois evita a degradação do produto final de interesse, o etanol (Rabelo *et al.*, 2011).

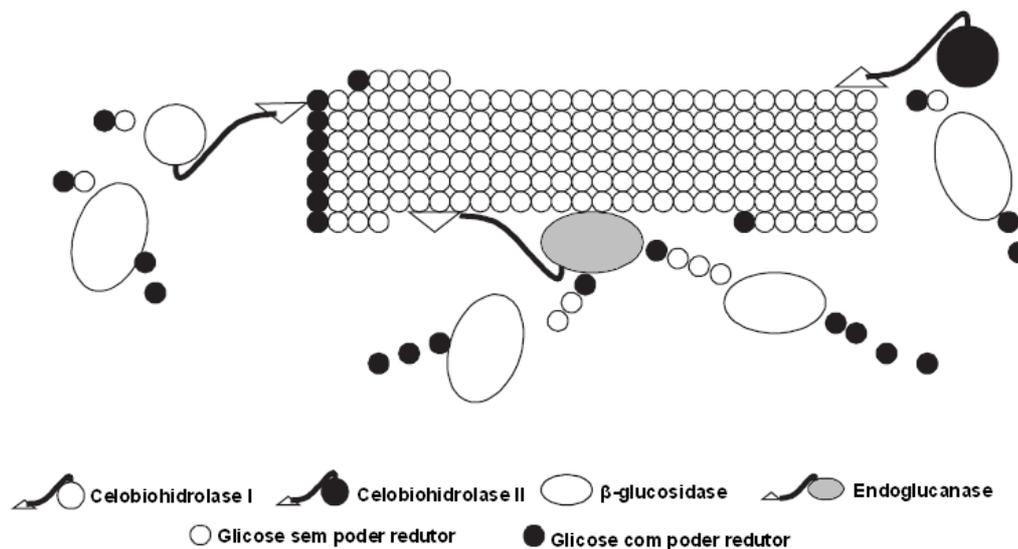
As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, e classificam-se de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. As endoglucanases agem de forma aleatória, clivando ligação beta, dentro da molécula da celulose; as celobiohidrolases (exoglucanases) removem as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e a  $\beta$ -glucosidase quebra celobiose em duas unidades de glicose (Lima *et al.*, 2005).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente. Tal efeito é conhecido como sinergia. São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases (Olsson e Hahn-Hägerdal, 1996; Moloney *et al.*, 1985):

- 1) sinergia endoglucanase-exoglucanase: a endoglucanase, atuando nas regiões amorfas da fibra, disponibiliza terminais redutores e não redutores para atuação de celobiohidrolase I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), e celobiohidrolase II (CBH II), hidrolisa terminais não redutores (NR).
- 2) sinergia exoglucanase-exoglucanase: as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase;
- 3) sinergias exoglucanase- $\beta$ -glucosidase e endoglucanase- $\beta$ -glucosidase: como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglucanase

liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glucosidase (Castro *et al.*, 2010).

A Figura 3.5 ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase na hidrólise da fibra celulósica.



**Figura 3.5.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico. A endoglucanase atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente, que liberam celobiose, substrato para a  $\beta$ -glucosidase (adaptado de Castro *et al.*, 2010).

Na produção de etanol celulósico, a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas de duas formas: em um processo sequencial de hidrólise e fermentação (do inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation* - SHF), ou em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation* - SSF). Drissen *et al.* (2009) afirmam que a escolha entre um dos dois processos é uma solução de compromisso entre temperaturas ótimas da enzima e concentrações inibitórias de glicose de um lado (SHF), *versus* temperaturas sub-ótimas e inibição enzimática por etanol do outro (SSF).

O principal objetivo da SSF é evitar a inibição enzimática da  $\beta$ -glucosidase pelo produto final, a glicose (Olofsson *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010). Alguns trabalhos recentes mostram a aplicação da SSF com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar (Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012).

Na SHF é possível a otimização da temperatura de hidrólise enzimática, independentemente da temperatura de fermentação. Já na SSF, as leveduras não podem ser reutilizadas devido a problemas de separação após contato com a lignina após a fermentação (Olofsson *et al.*, 2008).

### **3.5 Hidrólise Enzimática em Batelada Alimentada**

A batelada alimentada permite o aumento na concentração de substrato e conseqüente aumento na concentração de açúcar no hidrolisado, elevando a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, minimizando a energia de consumo e perdas durante a evaporação e destilação (Wingren *et al.*, 2003; Rudolf *et al.*, 2005). Outra vantagem da batelada alimentada é a redução de problemas de mistura e transferência de calor devido às propriedades reológicas da suspensão fibrosa bastante densa, como a composta pelo material lignocelulósico (Rudolf *et al.*, 2005), uma vez que nesse processo, o substrato é adicionado gradualmente, à medida que vem sendo consumido, mantendo a viscosidade da reação em baixo nível (Chen *et al.*, 2007).

A quantidade de substrato sólido utilizado nas reações de hidrólise enzimática é considerada um parâmetro físico importante que afeta a eficiência da hidrólise da celulose. Alguns autores investigaram o aumento de produção de etanol através do aumento da quantidade de substrato, e foi verificado que essa alternativa não se apresentou inteiramente satisfatória. Varga *et al.* (2004), realizando o processo de sacarificação e fermentação simultâneas, concluiu que uma maior concentração de substrato foi responsável pela inibição fermentativa.

Vargas *et al.* (2004) sugeriram que a redução na produção de etanol ocorreu em razão de que o aumento na quantidade de massa não transferida na reação provavelmente causou a formação de uma goma hidratada. Dessa forma, em concentrações altas do substrato, a enzima não foi capaz de liquefazer o material fibroso pré-tratado, determinando uma baixa taxa de sacarificação e conseqüente menor produção de etanol.

Na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, a concentração de etanol deve ser a mais alta possível com o intuito de minimizar o consumo energético durante a evaporação e destilação (Wingren *et al.*, 2003). Aumentando a

concentração do substrato, a concentração de açúcar também aumenta. Entretanto, uma grande quantidade de substrato inicial pode causar problemas de mistura e transferência de calor devido às propriedades reológicas de uma suspensão muito densa e fibrosa (Rudolf *et al.*, 2005). No processo em batelada alimentada, alguns problemas podem ser evitados, uma vez que o substrato adicionado é hidrolisado gradualmente e a viscosidade da mistura diminui (Chen *et al.*, 2007).

A hidrólise em batelada alimentada tem sido considerada como um processo promissor para a hidrólise de material lignocelulósico por alguns autores (Liao *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Hodge *et al.*, 2009), que recomendam o uso e a otimização deste processo.

Chen *et al.* (2007) realizaram hidrólises enzimáticas em batelada alimentada com o amido de milho como fonte de substrato e reportaram que houve aumento da concentração de glicose nos hidrolisados comparados aos realizados em batelada simples, logo, o rendimento em etanol também foi maior. Além disso, houve redução da dosagem de enzimas utilizada no processo em batelada alimentada. Para degradação de substrato equivalente, a batelada alimentada diminuiu o tempo de reação e aumentou a produtividade em etanol comparada à batelada simples (Chen *et al.*, 2007).

Kuhad *et al.* (2010) conduziram experimentos em batelada alimentada utilizando papel de jornal como matéria-prima e comprovaram que dessa forma, houve uma melhora na produção de açúcares e conseqüentemente, um aumento no rendimento em etanol.

### **3.6 Produção de Etanol por *Saccharomyces cerevisiae***

Os principais microrganismos utilizados na produção industrial de etanol são as leveduras. Dentre as mais utilizadas, estão as do gênero *Saccharomyces* que utilizam hexoses como matéria-prima. Leveduras como *Kluyveromyces fragilis* e *Candida* sp. utilizam lactoses e pentoses. Algumas bactérias, como as do gênero *Zymomonas* também são capazes de produzir etanol (Shuler e Kargi, 2002).

*Saccharomyces cerevisiae* possui alta eficiência fermentativa na produção de etanol. Este fato tem permitido a seleção de linhagens industriais com características

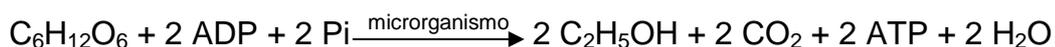
adquiridas que as tornam superiores produtores de etanol mais tolerantes aos produtos da fermentação (Amorim, 2005). Algumas dessas características são: não necessitam de oxigenação, apresentam pH ótimo baixo e são tolerantes à alta concentração de etanol (Martín *et al.*, 2002).

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbica da hexose na produção de álcool e CO<sub>2</sub> (Lima e Marcondes, 2002). Após a conversão da glicose em piruvato, pela glicólise, o piruvato é convertido em etanol e CO<sub>2</sub> em um processo de dois passos. No primeiro passo, o piruvato sofre uma descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela piruvato descarboxilase. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A piruvato descarboxilase requer Mg<sup>2+</sup> e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato. No segundo passo, por ação da álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o NADH derivado da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase fornecendo o poder redutor (Figura 3.6) (Nelson e Cox, 2002).



**Figura 3.6.** Esquema representativo da fermentação alcoólica (Nelson e Cox, 2002).

De maneira simplificada, a estequiometria da fermentação alcoólica pode ser representada pela equação abaixo, utilizando a glicose como fonte de carbono (Shuler e Kargi, 2002).



Dessa forma, temos que o rendimento teórico em etanol a partir da glicose é de 0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub>, enquanto que o rendimento de CO<sub>2</sub> é de 0,489 g<sub>CO<sub>2</sub></sub>/g<sub>glicose</sub>.

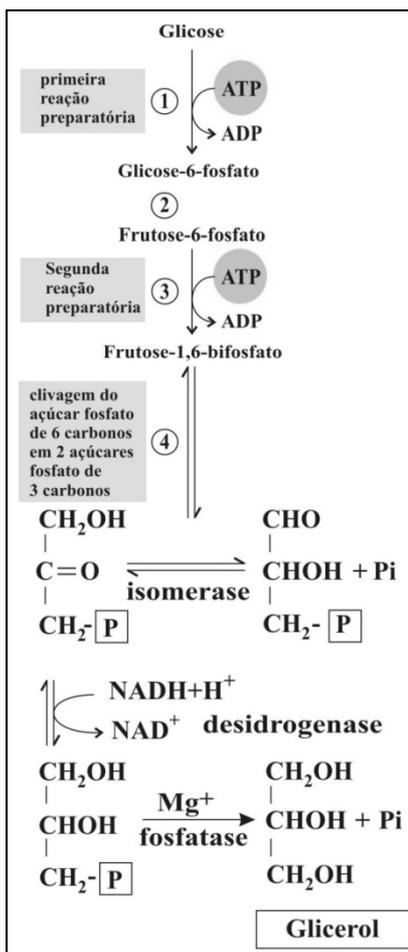
Anaerobicamente, o metabolismo do açúcar pela levedura gera uma forma de energia (adenosina trifosfato – ATP) que será empregada na realização de diversas

funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e  $\text{CO}_2$  resultantes constituem produtos de excreção para a célula na ausência de oxigênio (Lima *et al.*, 2001).

Durante a fermentação, as leveduras podem sofrer alguns estresses como deficiência nutricional, altas temperaturas, contaminações, acúmulo de etanol. Tais fatores influenciam no crescimento celular e produção de etanol e podem afetar severamente as leveduras, reduzindo a viabilidade celular e diminuindo o rendimento em etanol (Bai *et al.*, 2008).

A formação de subprodutos durante a fermentação depende de uma série de fatores. Os principais são o tipo de matéria-prima, a linhagem de levedura empregada e o processo de fabricação de etanol. Frequentemente encontram-se os seguintes produtos, considerados inibidores da fermentação: glicerol, ácido succínico, ácido acético, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, gás sulfídrico e furfural (Menezes, 1980; Martín *et al.*, 2007).

O glicerol é um subproduto, cuja formação compete pela utilização do poder redutor do NADH (Figura 3.7). O objetivo da produção do glicerol é a regeneração do excesso de NADH produzido na biossíntese e manutenção do balanço redox intracelular (Palmqvist *et al.*, 1999). A formação de glicerol pela levedura está relacionada com a estabilização osmótica do organismo (Munene *et al.*, 2002), já que é dada como resposta ao estresse osmótico ao qual a célula está sendo submetida, devido à alta concentração de açúcar no mosto de fermentação (Yalçin; Ozbas, 2004). Comparando-se o metabolismo em termos energéticos, a via aeróbia é mais eficiente em produção de energia que a via anaeróbia, gerando assim mais ATP para manutenção celular (Martins, 2009).



**Figura 3.7.** Regeneração de NAD na formação de glicerol (Fonte: Nelson e Cox, 2002 modificada).

O etanol também possui efeito inibitório para a fermentação alcoólica. Alterações da composição da camada lipídica da membrana, síntese de proteínas estressoras, modulação dos processos de troca iônica, redução de atividades metabólicas que conduzem à inibição do transporte de glicose, diminuindo a viabilidade, formação de produto e causando estresse hídrico (Hallsworth, 1998; Martini *et al.*, 2004). A toxicidade do etanol em concentrações elevadas (acima de 10% p:v) limita o rendimento e a produtividade durante a fermentação industrial e diminui a tolerância da levedura à temperaturas mais altas (Walker-Capriolo *et al.*, 1985).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor a 200°C, por 7 minutos, proveniente da Usina Vale do Rosário, em São Paulo, cedido pelo Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia da USP. Antes de ser utilizado, este material (ND – não deslignificado), foi lavado com água destilada aquecida, para a remoção de parte da hemicelulose que após o pré-tratamento com vapor ainda fica aderida ao material e pode diminuir a eficiência da hidrólise da celulose (Oghren *et al.*, 2007). O rendimento do processo de pré-tratamento com vapor foi de 66% (Rocha & Silva, 2006). As hidrólises enzimáticas foram realizadas com este material deslignificado ou não.

#### 4.1.2 Enzimas

Foram usadas preparações comerciais de celulasas (Celluclast 1,5 L) e  $\beta$ -glucosidase (Novozym 188), ambas produzidas pela Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca). As atividades enzimáticas da Celluclast (69,5 FPU/mL e 13,7 CBU/mL) e da  $\beta$ -glucosidase ( $13,4 \times 10^2$  CBU/mL) foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Ghose (1897). As enzimas foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

### 4.1.3 Microrganismo

Foram utilizadas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 e UFPEDA 1324 (Pedra 2), pertencentes à Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### 4.1.4 Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para a conservação da levedura continha: glicose (20 g/L), extrato de levedura (4 g/L), peptona (3 g/L) e ágar (15 g/L). Na preparação do inóculo foi utilizado o mesmo meio, mas sem adição de ágar. O pH foi ajustado para 7,0 em ambos os meios.

Os meios de fermentação para padronização do inóculo foram preparados à base de glicose (100 g/L), e suplementados com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L), extrato de levedura (4 g/L) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,75 g/L). Os meios de fermentação à base de hidrolisado enzimático foram feitos nas mesmas condições da padronização do inóculo, exceto pela adição de glicose. O pH dos meios de fermentação foi ajustado para 5,5.

## 4.2 Deslignificação do Bagaço Pré-Tratado por Explosão a Vapor

O processo de deslignificação foi realizado em reator do tipo autoclave eletrônica, modelo: AU/E-20, do fabricante REGMED INDÚSTRIA TÉCNICA DE PRECISÃO LTDA. Foram transferidos para o reator, 0,5 Kg de bagaço pré-tratado com vapor, 10 L de água destilada e 100 g de NaOH. A mistura permaneceu a 100° C, durante 1 hora, sob leve agitação. Após a deslignificação, o material pré-tratado foi separado do licor, por filtração. Foram efetuadas lavagens com água destilada aquecida, para a retirada da lignina que ainda estivesse impregnada no material, o qual, posteriormente, foi seco em estufa a 60°C (Santos & Gouveia, 2009).

### 4.3 Hidrólises Enzimáticas

Foram realizadas hidrólises enzimáticas em batelada e em batelada alimentada, em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com 8 g de bagaço, 100 mL de tampão citrato de sódio (pH 4,8) e preparações comerciais de celulases e  $\beta$ -glucosidase. A carga de enzimas foi de 10 FPU/g celulose para ambos os bagaços, 5 % V/V do volume utilizado da Celluclast (Santos, 2011; Santos *et al*, 2012), de  $\beta$ -glucosidase para ambos os bagaços.

Os frascos, em todas as hidrólises enzimáticas, foram mantidos em mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific Incubator Shaker C25KC), a 50 °C e rotação 0,64 g. Todas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, Minispin) por 10 min na rotação de 2844,8 g, sendo os sobrenadante, filtrado em membrana de 0,45  $\mu$ m e utilizados para a quantificação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência. A partir das hidrólises em batelada simples foram definidos os intervalos de tempo e a massa de bagaço utilizada na batelada alimentada.

### 4.4 Padronização do Inóculo

Nesta etapa, foram avaliadas três diferentes concentrações de biomassa de duas linhagens de *S. cerevisiae*, denominados de inóculo I, II e III, com base em experimentos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB), que puderam definir tanto as duas melhores linhagens de *S. cerevisiae* bem como as concentrações de biomassa utilizadas. Os experimentos foram conduzidos em duplicata. As linhagens foram repicadas em tubos de ensaio contendo o meio de conservação (item 4.1.4), o qual foi mantido em estufa a 30°C durante 24 horas. Após esse período, o inóculo foi preparado através de outro repique em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de inoculo (item 4.2.4), o qual foi submetido à rotação de 1,78 g e à temperatura de 30°C, por 12 horas, em mesa incubadora rotativa da New Brunswick Scientific C25KC.

No Inóculo I, um volume de 10 mL da suspensão microbiana foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do meio de fermentação

(item 4.1.4). No Inóculo II, todo o volume de suspensão de um frasco de Erlenmeyer, após 12 horas, foi filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade. A biomassa foi re-suspensa em 10 mL água destilada estéril e, em seguida, transferida para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio de fermentação. No Inóculo III, foi repetido o procedimento do inóculo II, sendo filtrado todo o volume de suspensão de dois frascos de Erlenmeyer. Foi realizada a quantificação do crescimento nos três diferentes tipos de inóculo.

#### 4.5 Fermentações

Para selecionar o inóculo adequado, as fermentações foram realizadas com as concentrações dos componentes do meio de cultura descritos no item 3.1.4. Nas fermentações com os hidrolisados enzimáticos, o meio de cultura foi preparado dissolvendo-se os componentes, com exceção da glicose, no hidrolisado.

A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 foi repicada em tubos de ensaio contendo o meio de conservação (item 4.1.4), o qual foi mantido em estufa a 30°C durante 24 horas. Após esse período, o inóculo foi preparado através de outro repique em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de inóculo (item 4.2.4), o qual foi acondicionado a rotação de 1,78 g e a 30°C, por 12 horas, em mesa incubadora rotativa da New Brunswick Scientific C25KC.

Após esse período, todo o volume de suspensão de um frasco de Erlenmeyer, com 12 horas de crescimento, foi filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . A biomassa foi re-suspensa em 10 mL água destilada estéril, ficando a uma concentração de 40 g/L de biomassa. Em seguida, uma alíquota do concentrado de células foi transferida para os frascos de fermentação de maneira que todos os experimentos fossem conduzidos em uma concentração de 4 g/L de biomassa.

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata a 34°C, durante 24 horas de acordo com experimentos prévios realizados no LPB, que determinaram essa temperatura como a ideal devido à contaminação no processo industrial.

## 4.6 Métodos Analíticos

### 4.6.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

Para a caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi utilizada uma metodologia descrita por Rocha *et al.* (1997) e, recentemente validada por Gouveia *et al.* (2009). Amostras de 2 g (moída a 20 mesh em moinho Wiley) de bagaço pré-tratado com vapor deslignificado ou não, foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado (Tecnal, modelo TE-2005) a 45° C por 7 min. As amostras foram transferidas para frascos de Erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Para a hidrólise dos oligômeros restantes, os Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121 °C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados até a temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro quantitativo faixa preta. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel.

Lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason modificado por Rocha *et al.* (1997). O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a Equação 4.1:

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde:

%L<sub>Ki</sub> – Lignina Klason insolúvel

M<sub>k</sub> – massa de lignina insolúvel seca

M<sub>C</sub> – massa de cinzas

$M_A$  - massa da amostra seca

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plµs). O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 4.2 (Rocha *et al.*, 2011).

$$C_{lig} = 4,187 \cdot 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde:

$C_{lig}$  - concentração de lignina solúvel, em g/L.

$A_T$  - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm.

$A_{pd} = c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2$  = absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações  $c_1$  e  $c_2$  foram determinadas previamente por CLAE e  $\varepsilon_1$  e  $\varepsilon_2$  são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L.g<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

Antes da determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C<sub>18</sub> (Phenomenex), num sistema manifold conectado a uma bomba de vácuo. Para as análises de furfural e de hidroximetilfurfural, uma amostra do hidrolisado foi filtrada em membrana de 0,45 µm. Ao determinar carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF, é possível se calcular os teores de celulose e de hemicelulose utilizando os seguintes fatores de conversão (Gouveia *et al.*, 2009): celulose (0,90 x massa de glicose; 0,95 x massa de celobiose; 1,20 x massa de HMF; 3,09 x massa de ácido fórmico); hemicelulose (0,88 x massa de xilose; 0,88 x massa de arabinose; 0,72 x massa de ácido acético; 1,37 x massa de furfural).

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, o papel de filtro contendo o bagaço foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente pesado. A amostra foi calcinada lentamente até 300°C e mais 2 horas a 800°C, em uma mufla (Fornitec, modelo MDS 15X15X30). Na determinação das cinzas totais, foram pesados 2 g do bagaço em cadinho de porcelana previamente pesado. Por

diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 4.3.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} * 100 \quad \text{Eq. 4.3}$$

Onde:

% Cinzas – percentual em massa de cinzas;

$M_C$  – massa de cinzas (em g);

$M_A$  – massa da amostra base seca (em g).

#### **4.6.2 Análise do bagaço por microscopia eletrônica de varredura**

Inicialmente, as amostras do bagaço foram presas em um suporte com auxílio de fita de carbono e submetidas ao recobrimento metálico com ouro, de espessura de 7  $\mu\text{m}$ , com uma voltagem de 40 mA sob atmosfera de argônio.

As amostras metalizadas foram submetidas à análise de MEV em um microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 1450 VP, equipamento disponível no Centro de Nanociência e Nanotecnologia do Laboratório Nacional Tecnologia de Luz Síncrotron, operando a 20 kW e utilizando detector de elétrons secundário. As amostras foram dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras do bagaço antes e depois da deslignificação, bem como após as hidrólises enzimáticas.

#### **4.6.3 Análise de Área Superficial do Bagaço**

O modelo de BET (Brunauer, Emmett e Teller) é muito usado para análises de área superficial. O método se baseia em um modelo de adsorção multicamadas (Gelb & Gubbins, 1998). A equação fundamental de BET (Brunauer, 1938) é descrita por:

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{n\left(1-\frac{P}{P_0}\right)} = \frac{1}{n_m c} + \frac{c-1}{n_m c} \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad \text{Eq. 4.4}$$

Onde:

$(P/P_0)$  é a pressão relativa

$n$  é a quantidade de massa adsorvida

$n_m$  é a capacidade da monocamada de BET

$c$  é geralmente relacionado com o calor de adsorção, e é dado por:

$$c = \exp\left(\frac{(q^{st} - q_L)}{RT}\right) \quad \text{Eq. 4.5}$$

Onde:

$q^{st}$  é o calor de adsorção da monocamada

$q_L$  é o calor de condensação

$R$  é a constante universal dos gases

$T$  é a temperatura em Kelvin

De acordo com Gelb & Gubbins (1998), os dados de adsorção são convencionalmente plotados por:

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{n\left(1-\frac{P}{P_0}\right)} \text{ vs } \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad \text{Eq. 4.6}$$

E o  $n_m$  e o  $c$  são parâmetros determinados a partir da inclinação e interceptação da reta resultante do gráfico.

Foram obtidos dados de área superficial específica calculada pela equação de BET utilizando-se um porosímetro por adsorção de nitrogênio (N<sub>2</sub>) da Micromeritics (ASAP 2020). As amostras de bagaço deslignificado foram tratadas por 22 horas para retirada de toda água remanescente. A isoterma de adsorção foi construída na faixa de pressão relativa ( $P_0 - P$ ) de 0,01 a 0,35.

#### 4.6.4 Determinação das atividades enzimáticas

As determinações das atividades das celulasas (endo e exoglucanases) e  $\beta$ -glucosidase foram realizadas conforme as metodologias propostas por Ghose (1987).

Para as celulasas foram preparados tubos ensaios, controles, brancos e padrões da glicose. Os tubos de ensaios continham 50 mg do substrato (Papel de filtro Watman), 1 mL do tampão citrato de sódio (50 mM, pH = 4,8) e 0,5 mL da enzima diluída. Os tubos controles da enzima não continham o substrato e o tubo controle do substrato não continha a enzima. Os tubos padrões da glicose continham 0,5 mL da diluição da glicose e 1 mL do tampão. Foram feitas quatro diluições, em tampão de citrato de sódio, da solução estoque de glicose (3,35 mg/0,5mL; 2,5 mg/0,5 mL; 1,65 mg/0,5 mL; 1,0 mg/0,5 mL). Os tubos foram incubados em banho termostático (Tecnal, modelo TE-2005) a 50°C por 60 min. Após o período de incubação, foram adicionados 3 mL de ácido dinitrossalicílico (DNSA) para interromper a reação enzimática. Para dosar os açúcares redutores totais, os tubos foram colocados exatamente por 5 min em banho de água fervente. Em seguida, os tubos foram resfriados até atingir a temperatura ambiente. Antes de proceder à leitura da absorbância no espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plus) a 540 nm, foram adicionados 5 mL de água destilada. A curva de calibração de glicose foi obtida através do gráfico com os valores de absorbância e de concentração de glicose.

Usando a curva de calibração da glicose, foi possível determinar sua concentração liberada em cada reação enzimática. A concentração da enzima foi estimada para exatamente 2 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (definição de Filter Paper Unity - FPU), pela equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima. O cálculo para a atividade celulolítica foi obtido a partir da Equação 4.7.

$$1\text{IU} = 1\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ de substrato convertido} = 0,18\text{mg}\cdot\text{min}^{-1} \text{ quando o produto é glicose}$$

A quantidade absoluta de glicose liberada na medida em FPU a uma diluição crítica é 2 mg, assim,

$$2 \text{ mg glicose} = 2 / (0,18 * 0,5 * 60) \mu\text{mol. min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,37 \mu\text{mol. min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Portanto, a quantidade estimada de enzima, que libera 2 mg de glicose na reação contém 0,37 unidades, é:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{Diluição da enzima que libera 2mg de glicose}} \quad \text{Eq. 4.7.}$$

A determinação da atividade da  $\beta$ -glucosidase foi realizada pela quantificação da glicose liberada na reação, utilizando-se celobiose como substrato.

As análises de tal enzima foram realizadas em duas etapas. Inicialmente foi realizado o ensaio enzimático, o qual consistiu na incubação, em tubos de ensaio, de 1,0 mL das amostras das diluições da enzima, com um 1,0 mL de uma solução de celobiose a 15 mM (preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8) em banho-maria (Tecnal, modelo TE-2005) a 50°C, durante 30 minutos. Após este período, os tubos foram levados para a água fervente, durante 5 minutos, para interrupção da reação enzimática, sendo logo após, resfriados em banho de gelo.

A segunda etapa consistiu na determinação da concentração de glicose formada no ensaio enzimático. Esta quantificação foi realizada utilizando-se um kit de glicose (GLICOSE PAP Liquiform, da Labtest), o qual contém o reagente GOD-POD composto por um sistema enzimático (glicose oxidase e peroxidase), responsável pela reação com as moléculas de glicose e formação de compostos de cor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração deste carboidrato presente. Dessa forma, 30  $\mu$ L das amostras resultantes dos ensaios enzimáticos foram incubados com 3,0 mL do reagente GOD-POD, em banho-maria (Tecnal, modelo TE-2005) a 37°C, durante 15 minutos. Nas análises também foram preparados tubos controles das enzimas, isto é, sem celobiose.

O kit também contém um padrão composto por glicose a 100 mg/dL, o qual também foi incluído nas análises. Um volume de 30  $\mu$ L do padrão reagiu com 3,0 mL do reagente GOD-POD, também a 37°C, durante 15 minutos.

Assim, as absorvâncias de todas as amostras foram determinadas em espectrofotômetro (Femto, modelo 700 pl $\mu$ s) a 505 nm. Antes de tais leituras, a

absorbância zero do espectrofotômetro foi estabelecida, através da leitura do branco, composto, apenas, do reagente GOD-POD.

A concentração da glicose liberada foi estimada pela Equação 4.8:

$$\text{Glicose} = \frac{\text{Absorvância do teste}}{\text{Absorvância do padrão}} * 100 \quad \text{Eq. 4.8.}$$

As absorbâncias do teste foram obtidas subtraindo-se as absorbâncias das amostras resultantes após reações enzimáticas pelas absorbâncias dos controles das enzimas.

Os valores de glicose obtidos em mg/dL foram convertidos em mg/mL. Dessa forma, foi possível determinar a concentração de glicose liberada em cada reação enzimática. A atividade enzimática foi estimada para exatamente 1 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (unidade de celobiose, CBU), através da equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima.

A atividade da  $\beta$ -glucosidase foi estimada pela Equação 4.9. A quantidade absoluta de glicose liberada na medida em CBU a uma diluição crítica é 1 mg, assim, é

$$1 \text{ mg glicose} = 0,5 / (0,18 * 1 * 30) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = 0,0926 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Portanto, a quantidade estimada de enzima, que libera 1 mg de glicose na reação, é:

$$\text{CBU} = \frac{0,0926}{\text{Diluição da enzima que libera 1mg de glicose}} \quad \text{Eq. 4.9.}$$

#### 4.6.5 Quantificação do crescimento

A quantificação do crescimento foi realizada de duas formas, dependendo da etapa realizada. Na padronização do inóculo, o crescimento microbiano foi

quantificado por absorvância a 660 nm em espectrofotômetro (Femto, modelo 700 plus). Na etapa das fermentações dos hidrolisados enzimáticos, a quantificação foi por análise gravimétrica. Um volume de 5 mL de suspensão microbiana foi filtrado em membrana de 0,45 µm, a qual foi seca em estufa, a 80°C, até massa constante. A concentração de biomassa (X – em g/L) foi obtida utilizando-se a Equação 4.10:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad \text{Eq. 4.10.}$$

Onde:

$m_2$  = massa da membrana com a biomassa, após secagem (em g);

$m_1$  = massa da membrana sem biomassa (em g);

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

#### **4.6.6 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, glicerol e etanol**

As determinações das concentrações de carboidratos, ácidos orgânicos, glicerol e etanol foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo líquido da Agilent HP 1100. As condições cromatográficas foram: coluna Aminex HPX-87H<sup>+</sup>, ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, detecção por índice de refração. Vazão de 0,6 mL/min e temperatura de 50°C.

#### **4.6.7 Determinação de hidroximetilfurfural e de furfural**

A determinação de hidroximetilfurfural (HMF) e de furfural também foi realizada por CLAE em cromatógrafo líquido da Agilent HP 1100. Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna C-18 (Beckman), acetonitrila 11,2% V/V e ácido acético (1%) 88,8% V/V como fase móvel, detecção UV em 274 nm, vazão de 0,8 mL/min e 25°C.

#### 4.6.8 Determinação de fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). O reagente de folin é uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup> porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras. De acordo com este método, a 0,5 mL do hidrolisado, adicionaram-se 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10 %) e 2,0 mL de carbonato de sódio (7,5 %), incubando-se em banho termostático (Tecnal, modelo TE-2005) a 50° C, durante 5 minutos. Para a preparação do branco, o mesmo procedimento foi utilizado, com a substituição da amostra por água destilada.

Para a quantificação da concentração de fenóis totais foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de ácido gálico, nas mesmas condições do método colorimétrico de folin-ciocalteu.

### 4.7 Parâmetros Cinéticos

#### 4.7.1 Velocidade máxima específica de crescimento

A velocidade de crescimento é constante e máxima durante a fase exponencial de crescimento, e é diretamente proporcional à concentração de substrato. Então, temos que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot X \quad \text{Eq. 4.11}$$

Onde:

X é a concentração de biomassa

Integrando esta equação e considerando um determinado tempo compreendido entre  $t$  e  $t_1$ , tem-se:

$$\ln \frac{X}{X_i} = \mu_{máx} \cdot (t - t_1) \quad \text{Eq. 4.12}$$

A partir de um gráfico plotado relacionando  $\ln (X/X_i)$  e  $(t - t_1)$ , foi traçada uma reta e definida sua equação, onde o coeficiente angular da equação da reta corresponde à  $\mu_{máx}$ .

#### 4.7.2 Rendimento em etanol a partir de glicose ( $Y_{P/S}$ )

O coeficiente de rendimento ( $Y_{P/S}$ ) relaciona a produção de etanol com a concentração do substrato.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta E}{\Delta S} \quad \text{Eq. 4.13}$$

Onde:

$\Delta E$  - ( $E_f - E_i$ ) Variação da concentração de etanol (em g/L);

$\Delta S$  - ( $S_i - S_f$ ) - Variação da concentração de glicose (em g/L).

#### 4.7.3 Rendimento em biomassa microbiana ( $Y_{X/S}$ )

O coeficiente de rendimento ( $Y_{X/S}$ ) relaciona a população microbiana com a concentração do substrato.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{Eq. 4.14}$$

Onde:

$X - X_i$  - Variação da concentração de biomassa (em g/L);

$\Delta S - (S_i - S_f)$  - Variação da concentração de glicose (em g/L).

#### 4.7.4 Eficiência da fermentação ( $E_f$ )

A eficiência fermentativa é calculada pela relação entre o rendimento real do processo e o rendimento teórico definido pela literatura, igual a 0,511.

$$E_f = \frac{(Y_{P/S})_r}{(Y_{P/S})_t} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4.15}$$

Onde:

$(Y_{P/S})_r$  - rendimento real (em g/g)

$(Y_{P/S})_t$  - rendimento teórico = 0,511 (em g/g).

#### 4.7.5 Produtividade volumétrica em produto ( $Q_p$ )

A produtividade é definida pela relação entre a concentração final de etanol obtida após a fermentação e o tempo final do processo.

$$Q_p = \frac{E}{t} \quad \text{Eq. 4.16}$$

Onde:

E - Concentração final de etanol (em g/L);

t - Tempo final da fermentação (em h).

#### 4.7.6 Conversão de celulose ( $C_c$ )

A conversão de celulose é calculada utilizando-se a concentração de glicose obtida após a hidrólise enzimática e relacionando-a com a concentração de biomassa utilizada para converter a celulose em glicose.

$$C_c (\%) = \frac{\text{Glicose}_{\text{HE}} \times 0,9}{\text{Carga sólidos} \times \text{Celulose}_{\text{Sólido}}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.17}$$

Onde:

Glicose<sub>HE</sub>: concentração de glicose no hidrolisado enzimático (em g/L);

0,9: fator considerando a razão de massa molecular entre a glicose anidra contida na celulose e a glicose livre;

Carga de sólidos: concentração da biomassa lignocelulósica no experimento (em g/L);

Celulose<sub>Sólido</sub>: teor de celulose na biomassa lignocelulósica (em %).

#### 4.8 Rendimento em Massa Após os Pré-Tratamentos

A equação que define o rendimento em massa foi desenvolvida a partir do presente trabalho, e relaciona a massa de bagaço recuperada ao final do processo de pré-tratamento a vapor ou deslignificação, e a massa utilizada no início do processo.

$$\text{Rendimento em massa} = \frac{M_{Bgf}}{M_{Bgi}} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4.18}$$

Onde:

$M_{Bgi}$  = Massa de bagaço colocada no início do pré-tratamento (a vapor ou deslignificação)

$M_{Bgf}$  = Massa de bagaço recuperada após o pré-tratamento

#### 4.9 Produção de Etanol em Relação ao Bagaço

A equação a seguir também foi desenvolvida a partir do presente trabalho, e é obtida relacionando-se a concentração final de etanol produzida após a fermentação dos hidrolisados enzimáticos com a massa total de bagaço utilizada no processo como um todo, levando-se em consideração as perdas dos pré-tratamentos.

$$L_{e\text{ tanol}} / TON_{\text{bagaço}} = \frac{\left(\frac{E}{0,789}\right) \times 10^{-3}}{Bg \times 10^{-6}} \quad \text{Eq. 4.19}$$

Onde:

E = Concentração final de etanol ;

0,789 = a densidade do etanol (em g/mL);

Bg = a massa de bagaço em g utilizada, considerando a recuperação no pré-tratamento por explosão a vapor e na deslignificação.

#### 4.10 Análise de Variância

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para os resultados de produção de etanol, para avaliar a significância estatística, utilizando o programa Excel (Office 2003). Segundo a ANOVA, a variação total é igual a variação entre os tratamentos mais a variação dentro dos tratamentos (Callegari-Jacques, 2003).

Se não há diferença entre os tratamentos, então a Variância Entre deve ser igual à Variância Dentro e a razão F entre elas é 1. Para testar a significância do valor de F obtido no experimento, isto é, verificar se o valor de F calculado difere de 1 ao acaso ou por efeito dos tratamentos, compara-se este valor com um F tabelado.

Este último estipula o limite para uma diferença aleatória entre as variâncias Entre e Dentro. Se  $F$  calculado for menor que  $F$  tabelado, conclui-se que não há diferença entre os tratamentos, já que a variação observada entre tratamentos é da mesma ordem daquela observada dentro dos tratamentos. Se  $F$  calculado for maior do que  $F$  tabelado, então há diferença significativa entre os tratamentos.

Para obter o  $F_{\text{calculado}}$  utiliza-se a equação 4.20.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{MQ_E}{MQ_D} \quad \text{Eq. 4.20}$$

Na qual,  $MQ_E$  é a Média Quadrática Entre Grupos e  $MQ_D$  é a Média Quadrática Dentro dos Grupos.

A Tabela 4.1 apresenta todas as equações utilizadas para a análise de variância.

**Tabela 4.1.** Equações utilizadas para a análise da variância (Callegari-Jacques, 2003).

<b>Causas de variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>MQ</b>	<b><math>F_{\text{calculado}}</math></b>	<b><math>F_{\text{tabelado}}</math></b>
<i>Entre grupos (tratamentos)</i>	$SQ_E = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2$	$gl_E = k - 1$	$\frac{SQ_E}{k - 1}$	$\frac{MQ_E}{MQ_D}$	$F_{\alpha, gl_E, gl_D}$
<i>Dentro dos grupos (resíduo)</i>	$SQ_D = \sum_{i=1}^k \left[ \sum_{j=1}^{n_i} (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 \right]$	$gl_D = (\sum n_i) - k$	$\frac{SQ_D}{(\sum n_i) - k}$		

SQ – Soma Quadrática,  $SQ_E$  – Soma Quadrática Entre Grupos,  $SQ_D$  – Soma Quadrática Dentro Grupos, GL – Graus de Liberdade, MQ – Média Quadrática,  $k$  – número total de grupos,  $n_i$  – número de observações em cada grupo,  $F_{\alpha, gl_E, gl_D}$  – Valor do teste F tabelado,  $F_{\text{calculado}}$  – Valor de F calculado,  $F_{\text{tabelado}}$  – Valor de F tabelado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Deslignificação e Caracterização do Bagaço

Após a deslignificação (Seção 4.2), o bagaço (D ou ND) foi caracterizado, e suas composições descritas na Tabela 5.1. O teor de celulose na fração sólida apresentou um aumento de 74,98%, enquanto que a lignina diminuiu 83,35% em relação ao bagaço pré-tratado com explosão a vapor (Gouveia *et al.*, 2009) como resultado da solubilização da lignina. O hidróxido de sódio causa dilatação, aumentando a área superficial interna da celulose e diminuindo o grau de polimerização, o que provoca a ruptura da estrutura da lignina (Taherzadeh e Karimi, 2008). A remoção da lignina foi superior à mencionada (24-55%) por Kumar *et al.* (2009) para a deslignificação alcalina.

**Tabela 5.1.** Composição do bagaço de cana-de-açúcar antes e após a deslignificação

<b>Bagaço</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
ND	49,66 ± 1,22	7,94 ± 0,57	34,59 ± 1,24
D	87,29 ± 2,22	6,88 ± 0,69	5,68 ± 0,13

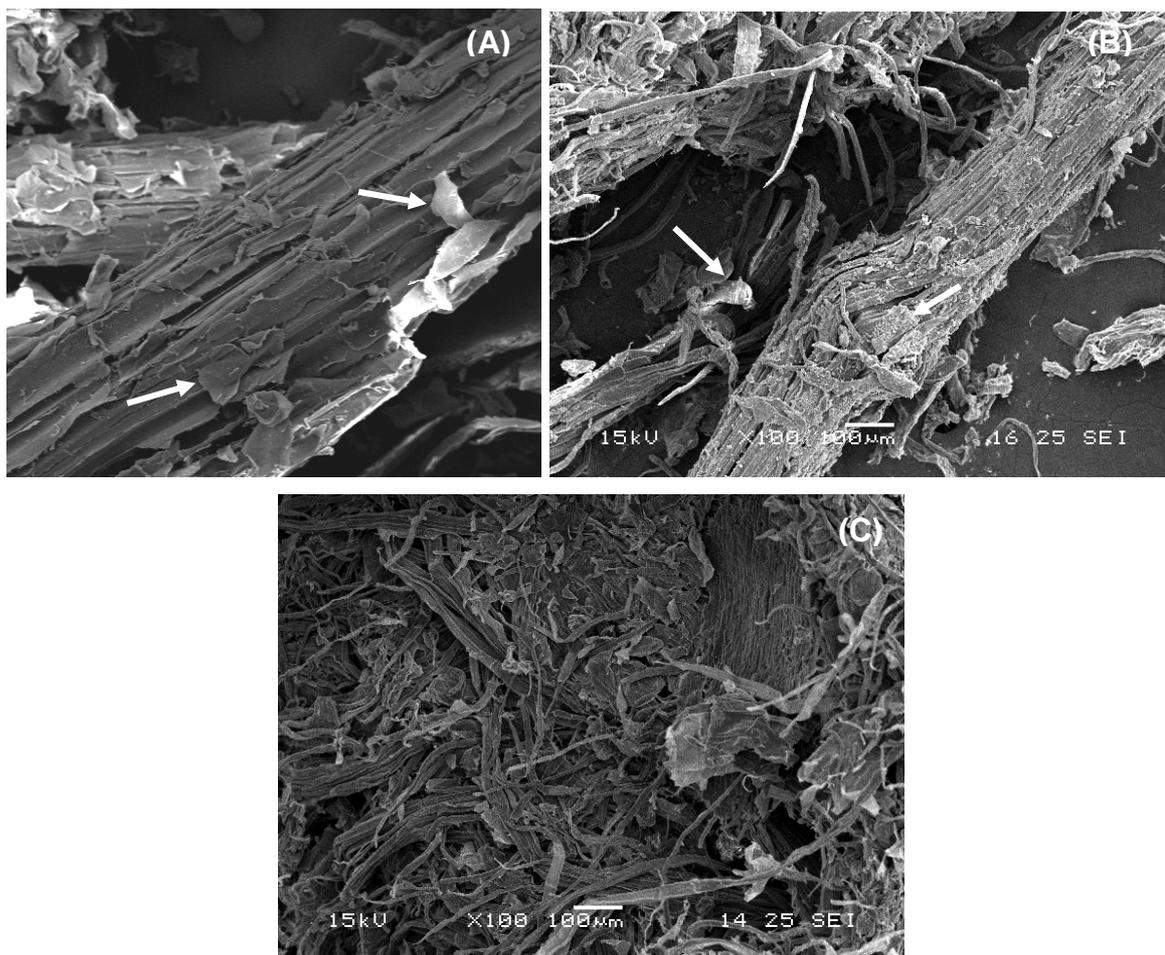
A redução de lignina e hemicelulose com relação ao bagaço pré-tratado a vapor pode refletir em uma melhora na conversão enzimática da celulose já que tanto a hemicelulose quanto a lignina formam uma camada protetora ao redor da celulose, reduzindo a eficiência do ataque enzimático (Öhgren *et al.*, 2007).

A grande remoção da lignina pode ser atribuída ao pré-tratamento de explosão a vapor realizado antes da etapa de deslignificação. Durante a explosão a vapor ocorre hidrólise parcial e solubilização da hemicelulose, a lignina é redistribuída e, até certo ponto, retirada do material (Pan *et al.*, 2005).

Apesar de ocorrer um aumento no teor de celulose após a deslignificação, o rendimento do processo foi de aproximadamente 50%, o que pode contribuir para a

diminuição do rendimento global do processo de conversão de biomassa a etanol. Segundo Fengel e Wegener (1989), o processo de deslignificação alcalina não é seletivo apenas para a lignina, podendo degradar também os carboidratos, incluindo a celulose.

Os resultados da microscopia eletrônica estão representados na Figura 5.1, com aumentos de 100 x.



**Figura 5.1.** Fotomicrografias do bagaço de cana “in natura” (A), pré-tratado por explosão a vapor (B) e pré-tratado por explosão a vapor com deslignificação (C). As setas representam flocos de medula. Aumento de 100 x.

A fotomicrografia do bagaço “in natura” (Figura 5.1 A) permite observar, com um aumento de 100x, a presença de flocos de medula (setas), bem como uma estrutura compacta, com fibras unidas pela presença de hemicelulose e lignina. Após o pré-tratamento a vapor, verifica-se que houve uma fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico (Figura 5.1 B), preservando uma grande parte do material, evidenciando que embora o pré-tratamento tenha

proporcionado uma abertura na estrutura morfológica do bagaço, ainda contém uma boa parte do material unida, dificultando a acessibilidade de reagentes químicos ou biológicos.

Observa-se também que o efeito do pré-tratamento não removeu totalmente os elementos parenquimatosos da superfície das fibras, preservando uma grande quantidade de flocos de medula, evidenciado nas setas das fotomicrografias da Figura 5.1 B (aumento de 100x).

A fotomicrografia do bagaço deslignificado está apresentada na Figura 5.1 C (aumento de 100x). Após a etapa de deslignificação alcalina do bagaço pré-tratado, verifica-se que as fibras estão mais nítidas e bem mais soltas (desempacotadas) que às do material apenas pré-tratado a vapor (Figura 5.1 B), visualmente com maior área superficial, corroborando com os valores de área superficial analisadas por BET, tornando a biomassa mais acessível à atuação das enzimas para uma melhor conversão enzimática da fração celulósica.

As fotomicrografias evidenciam que grande parte dos elementos parenquimáticos (flocos de medula) provavelmente foram hidrolisados pela ação alcalina da deslignificação.

A remoção da lignina por deslignificação alcalina deixa as fibras desempacotadas e abre a estrutura, tornando-as mais acessíveis à ação enzimática. As análises de área superficial e porosidade revelaram que uma área maior foi encontrada para o bagaço deslignificado ( $1,34 \pm 0,02 \text{ m}^2/\text{g}$ ), comparada ao material não-deslignificado ( $1,24 \pm 0,03 \text{ m}^2/\text{g}$ ), o que está de acordo com os resultados das fotomicrografias (Figuras 5.2 e 5.3).

De acordo com Silva (2009), após a etapa de deslignificação alcalina é possível observar grandes quantidades de fibras celulósicas livres de flocos de medula. Isso mostra que a etapa de pré-tratamento seguido da deslignificação pode proporcionar uma melhor disponibilidade da celulose para processos subsequentes, tais como para a conversão enzimática da celulose em glicose, no processo de obtenção de etanol celulósico.

Wolf (2011) realizou pré-tratamento organossolve do bagaço de cana, que realiza deslignificação do material lignocelulósico empregando solventes orgânicos recuperáveis, com diferentes condições de tempo e temperatura, e mostrou que houve uma maior abertura e fragmentação dos tecidos vegetais quando comparado

ao bagaço “in natura”, tornando as fibras de celulose mais expostas à ação das enzimas.

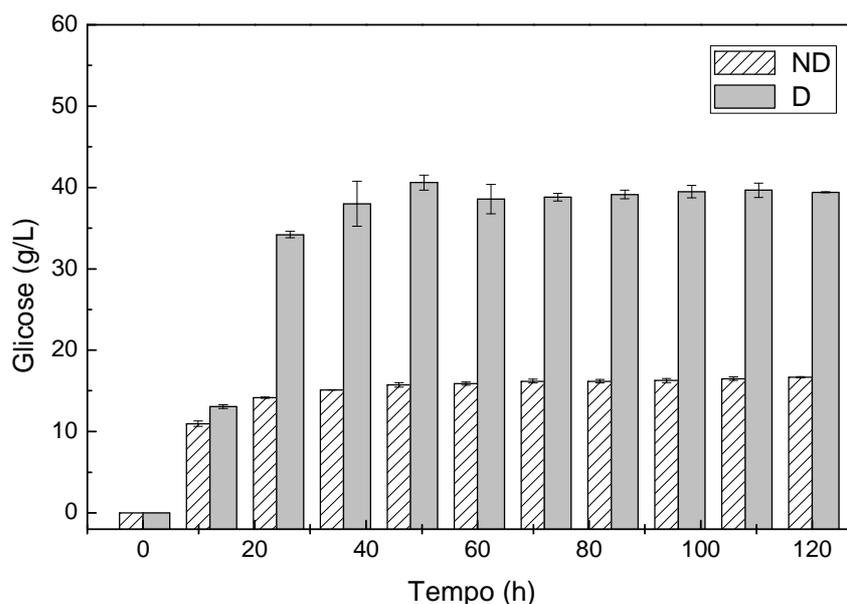
A Figura 5.1 corrobora com as análises químicas, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa (Silva, 2009).

## **5.2 Hidrólises Enzimáticas**

### **5.2.1 Hidrólises enzimáticas em batelada**

A concentração de celobiose foi inferior a 1 g/L após 24 horas, durante a hidrólise do material ND, o que indica que a carga de  $\beta$ -glucosidase (5% v/v) foi suficiente para converter celobiose em glicose. Por outro lado, essa carga não foi suficiente na hidrólise do material D, uma vez que a concentração de celobiose ficou em torno de 5 g/L. Baseado nesses resultados, as hidrólises do material D foram realizadas com 10% v/v. Após 60 horas, a concentração de celobiose foi menor que 2 g/L. Todos os resultados mostrados no presente trabalho foram obtidos utilizando-se 5% v/v e 10% v/v de  $\beta$ -glucosidase para os materiais ND e D, respectivamente.

O efeito da deslignificação durante a hidrólise enzimática foi observado claramente. A concentração de glicose atingiu 40,58 g/L após 48 horas de hidrólise do material D, enquanto que para o material ND, a máxima concentração de glicose ficou abaixo de 16,49 g/L, após 72 horas (Figura 5.2). Também é notável a alta taxa de reação para a hidrólise do material D, que após 24 horas atingiu 34 g/L, o que equivale a 81% da concentração máxima alcançada.



**Figura 5.2.** Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas do bagaço pré-tratado, mas não-designificado (ND) e pré-tratado e designificado (D).

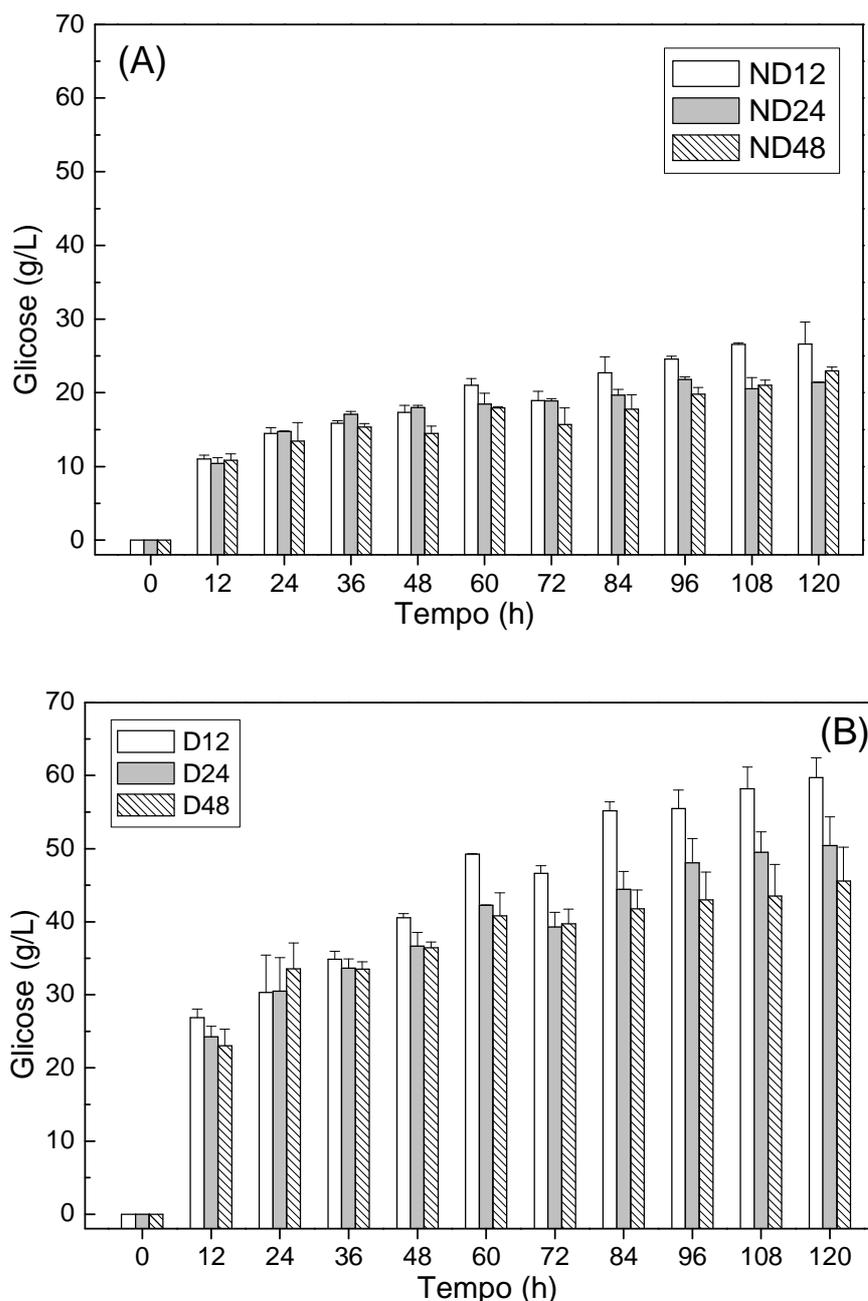
Santos *et al.* (2010) obtiveram 50 g/L de glucose após 48 horas de hidrólise em batelada de bagaço D, similar ao material do presente estudo (8 g em tampão citrate de sódio), utilizando carga enzimática de 37 FPU/g cellulose. Com relação à carga utilizada ser apenas 10 FPU/g de cellulose, comparando os resultados encontrados com Santos *et al.* (2010), parece ter sido suficiente. Lee and Fan, 1982 reportaram que inicialmente as enzimas adsorvem na superfície da fibra e formam uma única camada de tal forma que o restante da enzima pode ser adsorvido formando camadas adicionais. Esta enzima adsorvida superficialmente sobre a primeira camada da fibra teria um papel significativo na hidrólise, restringindo assim o processo de difusão da enzima através da estrutura do substrato (Carrillo *et al.*, 2005).

Diante desta hipótese, foram realizadas hidrólises em batelada alimentada para avaliar se a camada externa da enzima continuaria a hidrolisar as novas quantidades de bagaço adicionados. As hidrólises em batelada alimentada foram realizadas iniciando-se com 8 g de material D ou ND, adicionando-se 1 g de bagaço nos intervalos de 12, 24 ou 48 horas.

### **5.2.2 Hidrólises enzimáticas em batelada alimentada**

Os intervalos de tempo de alimentação foram definidos com base nos resultados obtidos na batelada simples. Com 12 horas, cerca de 20 e 25% de celulose foi hidrolisada, para ambos os materiais ND e D, respectivamente. A massa de bagaço que deveria ser adicionada, considerando estas conversões, seria 1,4 ou 1,9 g, de acordo com a massa já degradada pela ação das enzimas. Entretanto, foi adicionado 1 g de bagaço, nas hidrólises independente do material ser ou não deslignificado.

A adição de substrato aumentou a formação de glicose para ambos os materiais, D e ND (Figuras 5.3 A e 5.3 B), comparado com a hidrólise enzimática em batelada (Figura 5.2). Os resultados mais elevados foram obtidos quando o período de adição foi o de 12 horas, onde a concentração de glicose atingiu 49,24 g/L com 60 horas e 58,20 g/L com 108 horas, no experimento com o bagaço D (Figura 5.3 A). Na hidrólise do material ND, o tempo de adição de 12 horas influenciou positivamente a formação de glicose (Figura 5.3 B).

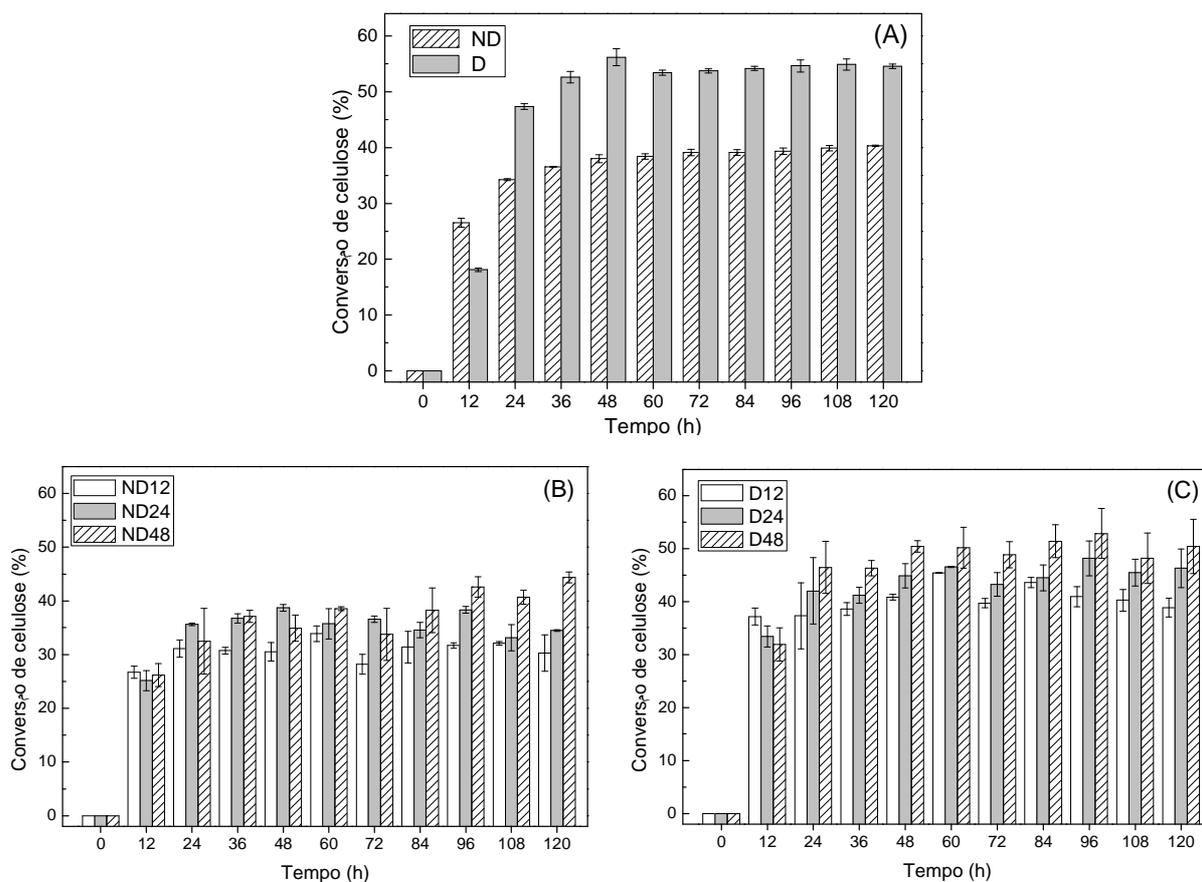


**Figura 5.3.** Concentrações de glicose durante as hidrólises enzimáticas em batelada alimentada do bagaço pré-tratado, mas não-deslignificado (A) e pré-tratado e deslignificado (B).

Com relação aos períodos mais longos, a partir de 84 horas, a concentração de glicose foi consideravelmente maior no experimento com 24 horas de intervalo de alimentação, do que aquele com intervalo de 48 horas. A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que houve diferença significativa quando comparados os intervalos de 24 e 48 horas para o bagaço deslignificado (F

= 36,35). Para o bagaço ND, a formação de glicose foi superior para o período de alimentação de 24 horas do que para 48 horas (Figura 5.3 B). Comparando-se os resultados com Santos *et al.* (2010) que utilizaram uma carga enzimática de 30 FPU/g de celulose gerando uma concentração de glicose em torno de 20 g/L para o bagaço ND e aproximadamente 50 g/L para o bagaço D. No presente trabalho foram obtidos valores de concentração de glicose próximos àqueles obtidos por *et al.* (2010), com a redução da carga enzimática em 1/3.

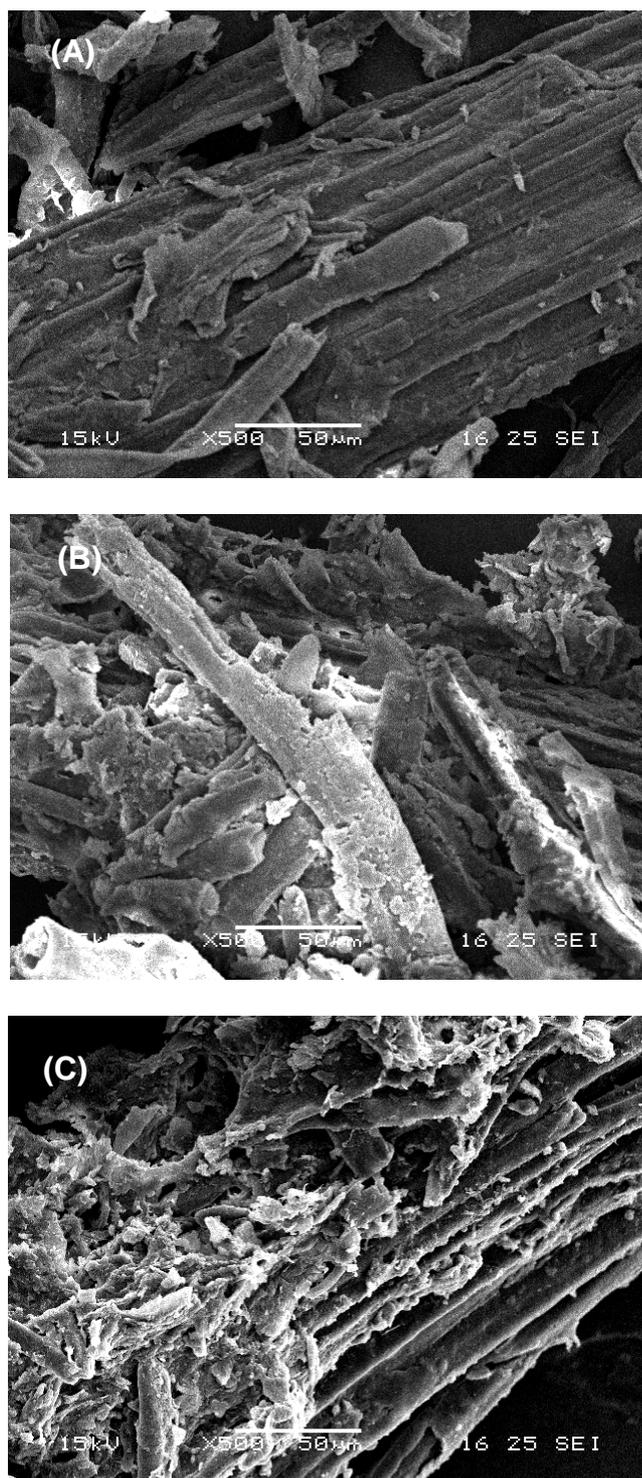
Apesar da concentração de glicose ter aumentado nas hidrólises em batelada alimentada (Figura 5.3), as conversões de celulose foram menores (25-40% ND e 30-50% D) (Figura 5.4 B), comparadas com as obtidas em batelada (40% ND e D 55%) (Figura 5.4 B e C). Tal fato ocorreu devido à alimentação com bagaço, onde a concentração de glicose deveria ter sido maior para que a conversão fosse superior na batelada alimentada.



**Figura 5.4.** Conversões de celulose nas hidrólises em batelada (A) e em batelada alimentada para o bagaço apenas pré-tratado a vapor (B) e pré-tratado e designificado (C).

Kuhad *et al.* (2010) realizaram experimentos em batelada simples e alimentada utilizando papel de jornal. Ao final de 96 horas, os autores conseguiram obter cerca de 38 g/L de glicose, iniciando com 2% (m/v) de substrato, alimentando na 20<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> hora, obtendo uma concentração final de substrato de 60 g/L.

De uma forma geral, o maior intervalo de tempo de alimentação (48 horas) favoreceu o processo de hidrólise enzimática, obtendo-se a maior conversão. A presença de fibras ainda intactas, após 120 horas de hidrólise em batelada alimentada com o intervalo de 12 horas (Figura 5.5), indica que este intervalo não foi suficiente. Com relação aos intervalos de 24 e de 48 horas, a degradação das fibras aumentou proporcionalmente ao aumento do intervalo de tempo de alimentação na batelada alimentada.



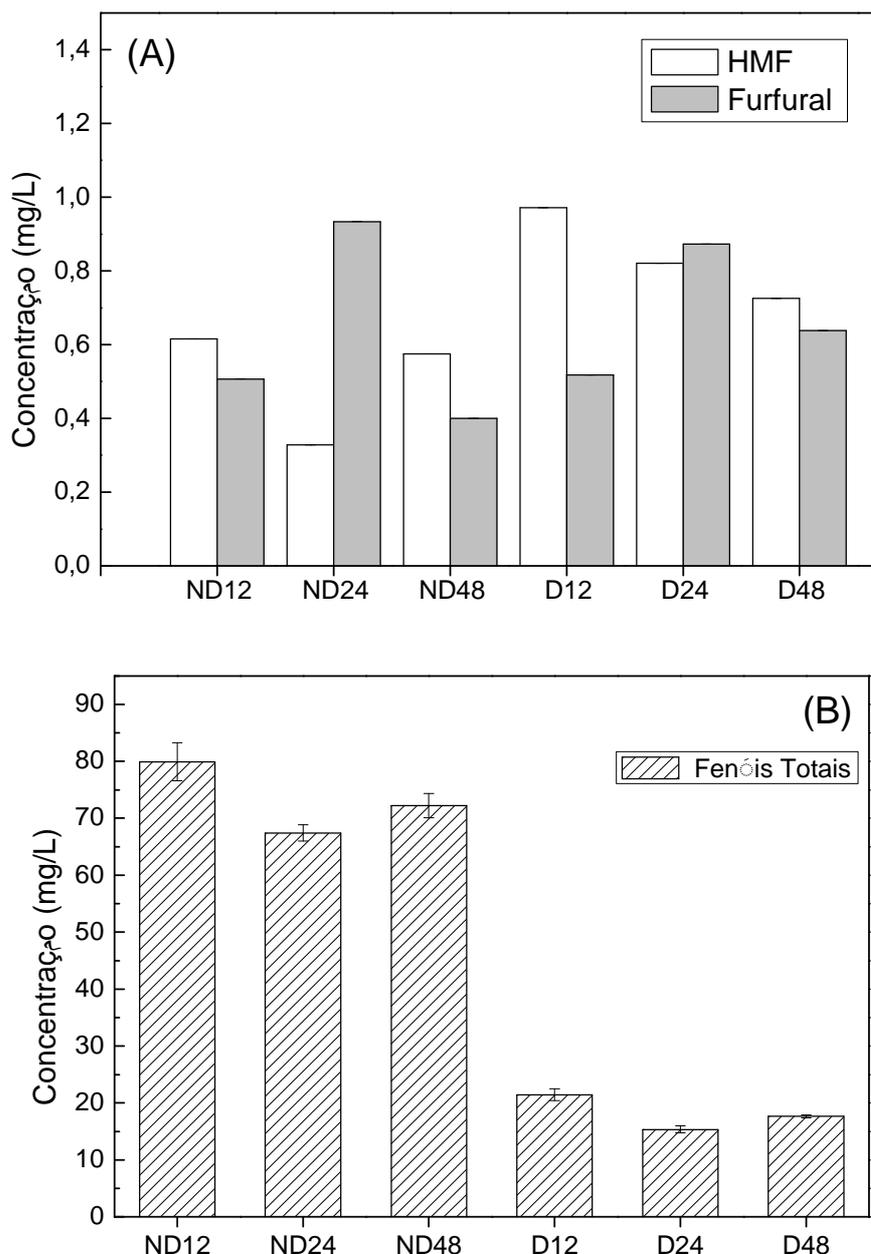
**Figura 5.5.** Fotomicrografia do material D após a hidrólise enzimática em batelada alimentada, com aumentos de 500 x. Intervalo de alimentação de 12 horas (A). Intervalo de alimentação de 24 horas (B). Intervalo de alimentação de 48 horas (C).

A Figura 5.5 A mostra a presença de fibras ainda intactas, unidas entre si. Com relação à Figura 5.5 B, observa-se uma desorganização do material lignocelulósico e as fibras mais desestruturadas. A Figura 5.5 C apresenta um desgaste visivelmente superior das fibras, indicando que houve maior disponibilidade do material ao ataque enzimático, o que favorece à batelada alimentada com maior intervalo de tempo (48 horas).

Os resultados da batelada alimentada mostraram que é possível hidrolisar uma maior quantidade de substrato, atingindo maiores concentrações de glicose sem aumentar a carga enzimática. Uma grande quantidade de substrato inicial pode causar problemas de mistura e transferência de calor devido às propriedades reológicas de uma suspensão muito densa e fibrosa (Rudolf *et al.*, 2005). No processo em batelada alimentada, esses problemas podem ser evitados, uma vez que o substrato adicionado é hidrolisado gradualmente e a viscosidade da mistura diminui (Chen *et al.*, 2007).

Houve um acúmulo um pouco maior de celobiose (3 g/L) na hidrólise em batelada alimentada com intervalo de 12 horas, para o bagaço deslignificado quando comparado com a hidrólise simples, provavelmente devido ao menor intervalo de tempo de alimentação. Com relação às outras condições de alimentação (24 ou 48 horas), apesar de estar aumentando a quantidade de bagaço, e, conseqüentemente de celulose, não houve maior acúmulo de celobiose do que na batelada simples, uma vez que o intervalo de tempo de alimentação foi maior, o que deve ter sido suficiente para a hidrólise.

Como deveria ser esperado nos experimentos de hidrólise enzimática, as concentrações de compostos inibitórios da fermentação foram baixos em todos os hidrolisados (Figura 5.6). No entanto, vale ressaltar que, enquanto os níveis de aldeídos furano (furfural e HMF) (Figura 5.6 A) foram comparáveis para todas as condições e a concentração de compostos fenólicos (Figura 5.6 B) foi cerca de quatro vezes maior no hidrolisado do bagaço ND. Isso ocorreu, provavelmente, devido a compostos fenólicos que permaneceram no material ND.



**Figura 5.6.** Concentrações de HMF, furfural (A) e compostos fenólicos (B) nos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise enzimática em batelada alimentada do bagaço deslignificado (D) e não-deslignificado (ND).

Os valores encontrados de HMF e furfural (Figura 5.6 A) foram muito pequenos, provavelmente, devido ao material lignocelulósico ter sido exaustivamente lavado após o tratamento por explosão a vapor e após a deslignificação. Santos e Gouveia (2009) não observaram concentrações detectáveis de HMF e de furfural quando fermentaram hidrolisados de bagaço de cana de açúcar pré-tratado por explosão a vapor.

Martín *et al.* (2002) realizaram experimentos utilizando como substrato o bagaço de cana de açúcar também pré-tratado por explosão a vapor e encontraram os compostos furânicos nas seguintes concentrações: furfural 1,1 g/L; HMF 0,2 g/L. Santos e Gouveia (2009) trabalharam com o mesmo material utilizado no presente trabalho, provavelmente, a lavagem exaustiva do bagaço contribuiu para reduzir a concentração destes inibidores, enquanto que no trabalho de Martín *et al.* (2002), isso não aconteceu.

De acordo com Taherzadeh (2000), os efeitos negativos produzidos pelo furfural e HMF sobre as leveduras de fermentação alcoólica são descritos como: diminuição da taxa específica de crescimento e da produtividade volumétrica ou específica em etanol e redução da síntese de biomassa. O efeito tóxico ocasionado pelos compostos furânicos parece estar associados ao fato de serem aldeídos, quimicamente reativos, podendo interagir com várias moléculas biológicas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, ou até mesmo ocasionar danos à membrana celular. Ademais, o furfural inibe enzimas glicolíticas e fermentativas (Taherzadeh, 2000);

Todos os hidrolisados enzimáticos apresentaram concentrações muito baixas de fenóis como apresentado na Figura 5.6 B. Santos e Gouveia (2009) reportaram concentrações um pouco maiores de fenóis totais após hidrólise enzimática em bagaços não-deslignificado (770 mg/L) e deslignificado (90 mg/L) e obtiveram redução de 88% de fenóis com a deslignificação com NaOH. Martín *et al.* (2002) encontraram um valor bem mais alto (4,1 g/L) quando utilizaram bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com explosão a vapor e realizaram tratamento de deslignificação com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e encontraram uma redução de 80% no teor de fenóis. Comparando-se os resultados entre os diferentes tipos de bagaço, observa-se que houve uma redução de 3 a 7 vezes na presença de compostos fenólicos quando o material foi deslignificado. A lavagem exaustiva do material após o pré-tratamento pode ter contribuído para a diminuição dos derivados fenólicos.

Dentre os inibidores da fermentação dos hidrolisados nos materiais lignocelulósicos, os compostos fenólicos gerados a partir da degradação da lignina são considerados os mais tóxicos (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000). Os compostos fenólicos podem impedir a bioconversão, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando suas propriedades como barreira seletiva (Heipieper *et al.*, 1994).

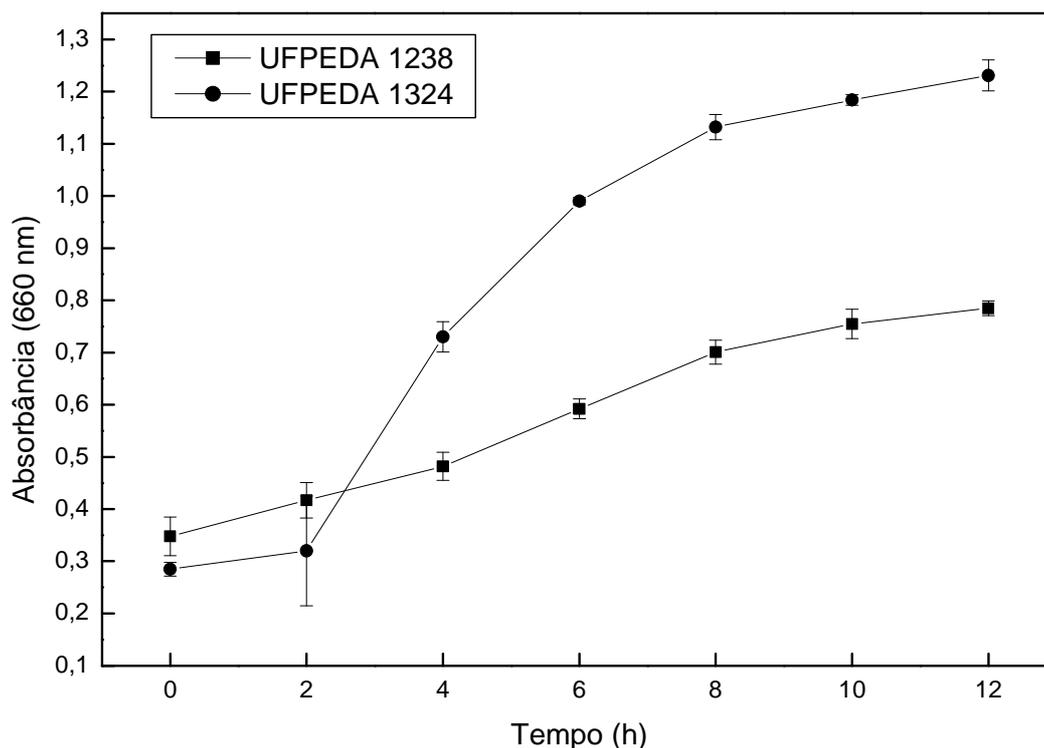
Comparando-se as hidrólises com material deslignificado ou não, em batelada simples, observamos uma redução de 85,8% de fenóis. Santos e Gouveia (2009) conseguiram uma redução de 88% de fenóis, enquanto que Martín *et al.* (2002), quando realizaram tratamento químico com  $\text{Ca(OH)}_2$ , encontraram redução de 80% dos fenóis. Analisando-se os hidrolisados dos dois materiais, verifica-se que houve uma redução em média de 75% dos fenóis totais no hidrolisado do material deslignificado em relação ao não deslignificado.

### **5.3 Seleção da Linhagem de *S. cerevisiae* e Padronização do Inóculo**

Baseado em experimentos prévios realizados no LPB, foram selecionadas duas linhagens industriais de *S. cerevisiae*, a UFPEDA 1238 e a UFPEDA 1324 (Pedra 2) a partir do melhor resultado de crescimento em meio de inóculo. Através do peso seco quantificado neste experimento, foi verificado que a biomassa inicial utilizada era de 0,4 g/L, o que serviu de referência para realizar os experimentos do presente trabalho aumentando 10 e 20 vezes esse valor (4,0 e 8,0 g/L, respectivamente).

Após a seleção das duas linhagens que seriam utilizadas e definição das três diferentes concentrações do inóculo (0,4; 4,0 e 8,0 g/L), foram realizadas fermentações em meio sintético com o objetivo de avaliar qual das linhagens apresentaria maior desempenho.

As curvas de crescimento das leveduras estão descritas na Figura 5.7.



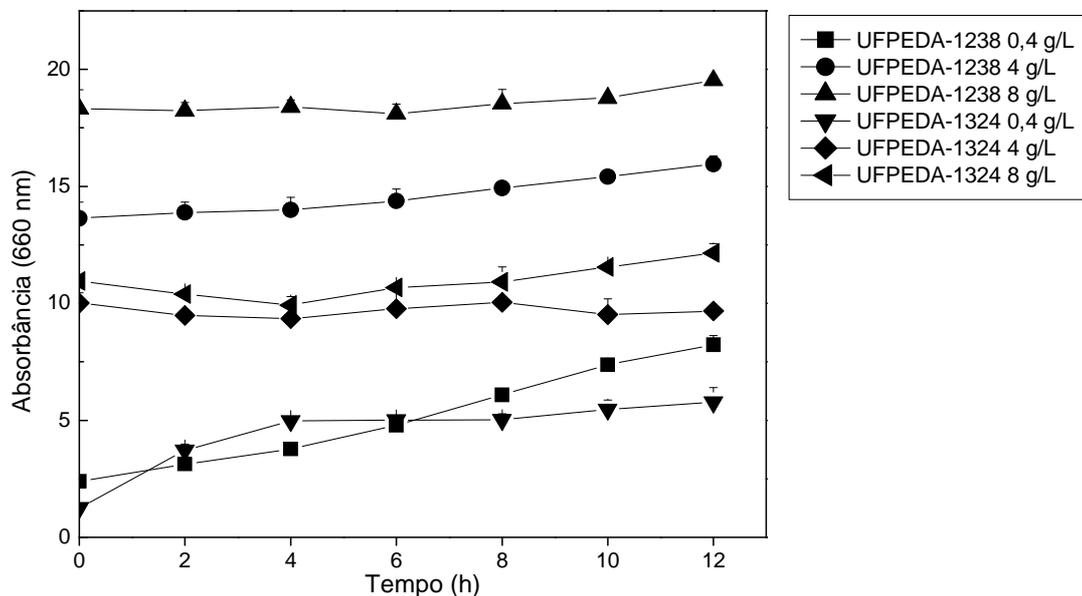
**Figura 5.7.** Crescimento das duas linhagens de *S. cerevisiae* no meio do inóculo.

A partir das curvas de crescimento, foram calculadas as velocidades máximas específicas de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de ambas as linhagens de *S. cerevisiae*, e os valores encontrados para a UFPEDA 1238 e UFPEDA 1324 foram, respectivamente, 0,16 e 0,30  $\text{h}^{-1}$ . Embora a UFPEDA 1324 tenha apresentado um  $\mu_{\text{máx}}$  quase duas vezes maior que a UFPEDA 1238, foram avaliados os desempenhos fermentativos das duas diferentes linhagens. As leituras foram realizadas em absorbância, uma vez que é uma variável proporcional ao crescimento da biomassa.

A Figura 5.8 compara o crescimento durante as fermentações, onde foi observado que, nos experimentos com o menor valor de inóculo (0,4 g/L), houve um crescimento para ambas as linhagens. Já nas fermentações com os inóculos maiores (4,0 e 8,0 g/L), não foi observada a fase de crescimento, apenas a fase estacionária. Isso ocorreu porque os inóculos com essas fermentações têm altas concentrações de biomassa e os microrganismos não precisaram utilizar o substrato (glicose) para crescimento, apenas para produção de etanol, uma vez que os cultivos foram realizados com limitação de oxigênio (sem agitação).

A diferença observada entre os resultados quando utilizada a maior concentração de inóculo (8,0 g/L) provavelmente ocorreu devido à diferença na

morfologia das linhagens. Também pode ter ocorrido uma sedimentação das células durante a leitura da absorbância.



**Figura 5.8.** Efeito do tamanho do inóculo no crescimento durante a produção de etanol.

As linhagens utilizadas nos processos industriais usualmente têm osmotolerância limitada (Souza, 2009). O aumento induzido na osmolaridade externa pode levar à redução do crescimento e perda de viabilidade das células da levedura devido ao rompimento do gradiente osmótico. Tal fato pode ocasionar a perda de volume celular devido às diferenças de pressão osmótica entre os meios intra e extracelular (Mager e Varela, 1993). Para sobreviver e continuar a crescer, as células podem recuperar a turgescência e depois de uma fase de adaptação, o crescimento é recuperado (Blomberg, 2000).

Dessa forma, isso explica a fase de ajuste durante a fermentação utilizando inóculos com menor concentração de biomassa (0,4 g/L). Pacheco (2010) realizou fermentações de sacarose por *S. cerevisiae* variando as concentrações de inóculo e observou que os experimentos com menor concentração de biomassa tiveram uma fase de adaptação antes da produção de etanol.

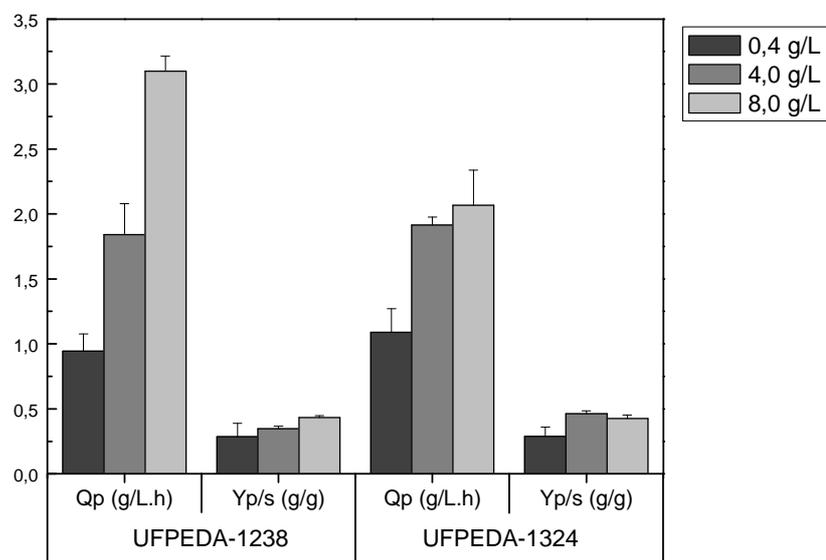
As concentrações de glicose e etanol foram quantificadas no tempo inicial e após 12 horas (Tabela 5.2).

**Tabela 5.2.** Concentrações de Glicose e Etanol durante as fermentações. I – inóculo de 0,4 g/L, II – inóculo de 4,0 g/L e III – inóculo de 8,0 g/L.

<i>Tempo (h)</i>	<i>UFPEDA-1324</i>						<i>UFPEDA-1238</i>					
	<i>Glicose (g/L)</i>			<i>Etanol (g/L)</i>			<i>Glicose (g/L)</i>			<i>Etanol (g/L)</i>		
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
<b>0</b>	107,6	113,6	118,0	0	0	0	114,7	106,0	92,2	0	0	0
<b>12</b>	64,5	60,8	57,1	14,6	23,5	27,1	66,4	46,1	17,0	10,2	19,9	36,2

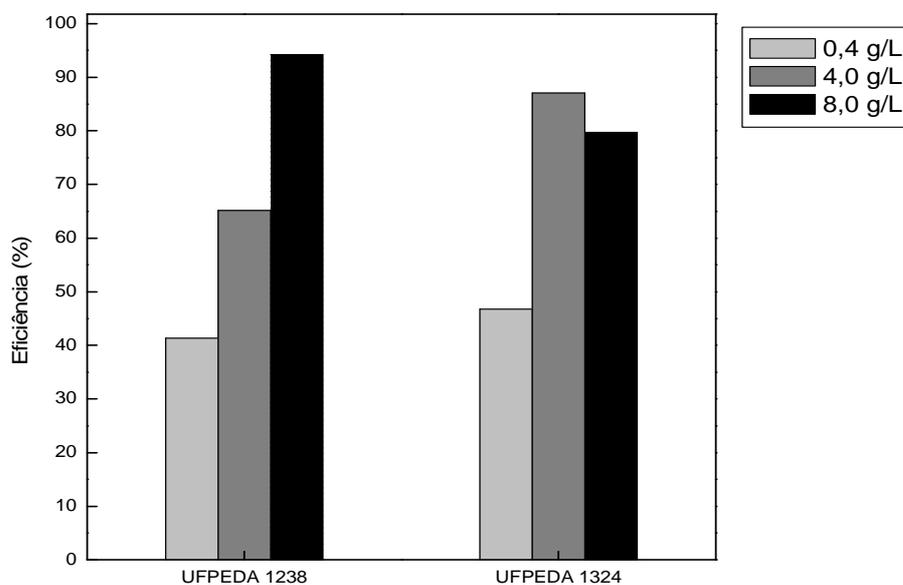
A fermentação com 0,4 g/L de biomassa foi a que apresentou o menor consumo de glicose para ambas as linhagens. Por outro lado, a fermentação com o inóculo maior (8,0 g/L) foi a que apresentou o maior consumo, devido à maior concentração de biomassa. Entretanto, a linhagem UFPEDA 1238 apresentou uma produção de etanol (36,2 g/L) aproximadamente 25% maior que a linhagem UFPEDA 1324 (27,1 g/L).

A partir dos dados da Tabela 5.2, foram calculadas as produtividades e os rendimentos em etanol (Figura 5.9) e as eficiências das fermentações (Figura 5.10).



**Figura 5.9.** Produtividades e rendimentos em etanol das linhagens UFPEDA 1238 e UFPEDA 1324 durante a padronização do inóculo.

A produtividade obtida na fermentação com a linhagem UFPEDA 1238 com o maior inóculo foi 50% maior (3,09 g/L.h) que a encontrada com a fermentação da UFPEDA 1324 (2,06 g/L.h) para o mesmo tamanho de inóculo (Figura 5.9). Ribeiro & Horii (1999) utilizaram três diferentes linhagens de *S. cerevisiae* e obtiveram produtividades iguais a 3,40; 2,72 e 2,88 g/L.h. Stroppa *et al.* (2003) explica que apesar de as linhagens possuírem o mesmo perfil cromossômico, podem apresentar diferentes perfis fermentativos.



**Figura 5.10.** Eficiências da fermentação etanólica das linhagens UFPEDA 1238 e UFPEDA 1324 durante a padronização do inóculo.

A eficiência da fermentação pela linhagem UFPEDA 1238 com o maior inóculo (8,0 g/L) foi de quase 95 % com apenas 12 horas (Figura 5.10). A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que não houve diferença significativa quando foram comparadas as eficiências da fermentação ( $F = 7,05$ ).

A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que não houve diferença significativa quando foram comparados os rendimentos em etanol ( $F = 6,99$ ). A produtividade obtida na fermentação com a linhagem UFPEDA 1238 com o maior inóculo foi 50% maior (3,09 g/L.h) que a encontrada com a fermentação da UFPEDA 1324 (2,06 g/L.h) para o mesmo tamanho de inóculo. A

análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que houve diferença significativa quando comparadas as produtividades ( $F = 14,93$ ).

Schmidell *et al.* (2001) refere-se ao inóculo da fermentação industrial como a quantidade de células suficientes para iniciar o ciclo celular fermentativo rápida e economicamente. Como a alta concentração do inóculo na fermentação promoveu altas produtividades em etanol e elevadas eficiências, a linhagem UFPEDA 1238 foi selecionada para as etapas posteriores do trabalho com a maior concentração de biomassa testada, 8,0 g/L.

#### 5.4 Fermentações dos Hidrolisados

A padronização do inóculo apresentou melhor resultado com maior concentração de biomassa (8 g/L) utilizando meio de cultura sintético composto por 100 g/L de glicose inicial. Uma vez que, os hidrolisados enzimáticos apresentaram uma concentração máxima de glicose inferior a 60 g/L. Para uniformizar a fermentação dos hidrolisados, todos os ensaios foram realizados utilizando uma concentração de biomassa inicial igual a 4 g/L. As concentrações de etanol, substrato e biomassa são apresentadas na Tabela 5.3.

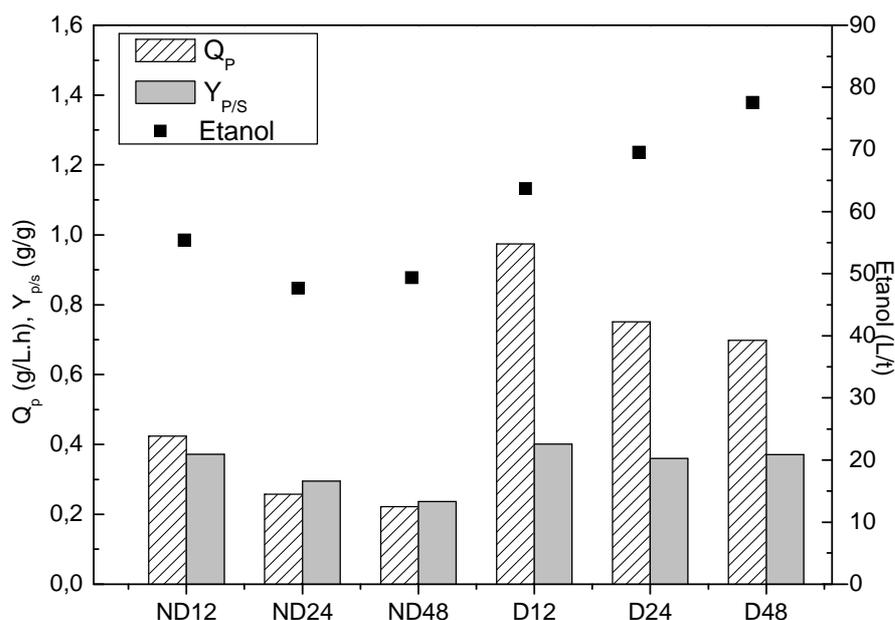
**Tabela 5.3.** Resultados das fermentações dos hidrolisados enzimáticos dos bagaços não-deslignificado (ND12 – 12 em 12 horas; ND24 – 24 em 24 horas; ND48 – 48 em 48 horas) e deslignificado (D12 – 12 em 12 horas; D24 – 24 em 24 horas; D48 – 48 em 48 horas).

<b>Fermentações</b>	<b><math>S_i</math> (g/L)</b>	<b><math>S_f</math> (g/L)</b>	<b><math>X_f</math> (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>
ND12	27,67	0,34	4,88	10,17
ND24	21,40	0,43	6,24	6,18
ND48	22,94	0,47	6,05	5,34
D12	59,69	1,34	7,19	23,38
D24	50,40	0,38	7,13	18,02
D48	45,54	0,43	8,02	16,75

$X_f$  (concentração de biomassa com 24 horas);  $S_f$  (Concentração de glicose);  $S_i$  (concentração inicial de glicose)

A maior produção de etanol (23,38 g/L) foi obtida na fermentação do hidrolisado enzimático, do material designificado, proveniente da batelada alimentada, com adição de substrato a cada 12 horas. Isso ocorreu devido este hidrolisado conter a maior concentração de glicose (59,69 g/L). De uma forma geral, a análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que não houve diferença significativa quando comparadas as concentrações de etanol obtidas nas fermentações dos hidrolisados ND 24 e ND 48 ( $F = 6,26$ ), bem como nas fermentações dos hidrolisados D 24 e D 48 ( $F = 1,23$ ).

Os resultados das produtividades volumétricas em etanol ( $Q_p$ ), rendimento de etanol por grama de glicose ( $Y_{P/S}$ ) e por tonelada de bagaço na fermentação dos hidrolisados enzimáticos estão descritos na Figura 5.11.



**Figura 5.11.** Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ ), rendimento de etanol por grama de glicose ( $Y_{P/S}$ ) e por tonelada de bagaço na fermentação dos hidrolisados enzimáticos.

As produtividades volumétricas em etanol ( $Q_p$ ) nas fermentações dos hidrolisados (Figura 5.11) dos materiais ND e D, foram: 0,42 g/L.h (intervalo de adição de 12 horas), 0,26 g/L.h (intervalo de adição de 24 horas), 0,22 g/L.h (intervalo de adição de 48 horas) e 0,97 g/L.h (intervalo de adição de 12 horas), 0,75 g/L.h (intervalo de adição de 24 horas), 0,70 g/L.h (intervalo de adição de 48 horas),

respectivamente. Isso pode ser atribuído ao efeito inibitório dos compostos fenólicos (Figura 5.6 B) e à alta concentração de glicose no hidrolisado do material D. No entanto, o efeito inibitório não foi tão forte, pelo fato de que os rendimentos em etanol no final da fermentação foram comparáveis para todos os hidrolisados.

A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que houve diferença significativa quando foram comparadas as produtividades em etanol ( $F = 183,28$ ) entre todos os hidrolisados, entre os hidrolisados dos bagaços deslignificados ( $F = 25,97$ ) e entre os hidrolisados dos bagaços não-deslignificados ( $F = 73,81$ ).

As eficiências das fermentações dos hidrolisados foram de 76,89%, 70,82% e 66,35% para as bateladas alimentadas conduzidas com o bagaço deslignificado com alimentações de 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Para o bagaço não-deslignificado, as eficiências foram menores, sendo de 67,39% para alimentação a cada 12 horas, 57,98% para 24 horas e 50,16% para 48 horas. Comparando-se com a fermentação durante a padronização de inóculo utilizando meio sintético, observamos uma diminuição da eficiência gerada, provavelmente, pela presença de inibidores fermentativos.

O rendimento em etanol ( $Y_{P/S}$ ) dos meios à base do hidrolisado do bagaço ND em batelada alimentada foram 0,37 g/g no intervalo de 12 horas de alimentação, 0,29 g/g para 24 horas e de 0,28 g/g para 48 horas. Quando o bagaço D foi utilizado, os valores de  $Y_{P/S}$  foram 0,40 g/g com 12 horas, 0,36 g/g com 24 horas e 0,37 g/g com 48 horas. Tais resultados apontam um aumento de 8,11%, 24,14% e 32,14% em relação aos obtidos com os hidrolisados do bagaço ND, devido provavelmente à maior concentração de fenóis totais neste último material.

A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que houve diferença significativa quando foram comparados os rendimentos em etanol ( $F = 9,23$ ) entre todos os hidrolisados, não houve diferença significativa quando comparados os hidrolisados dos bagaços deslignificados ( $F = 1,00$ ) e houve diferença significativa quando comparados os hidrolisados dos bagaços não-deslignificados ( $F = 11,78$ ).

Santos *et al.* (2010) obtiveram valores em torno de 0,30  $g_{\text{etanol}}/g_{\text{glicose}}$  durante a fermentação dos hidrolisados de dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar: com e sem deslignificação. Tal fato foi devido à concentração máxima de etanol e a concentração inicial de glicose obtida no presente trabalho terem sido maiores que

as encontradas por Santos *et al.* (2010), devido aos experimentos terem sido conduzidos em batelada alimentada, aumentando a concentração de substrato.

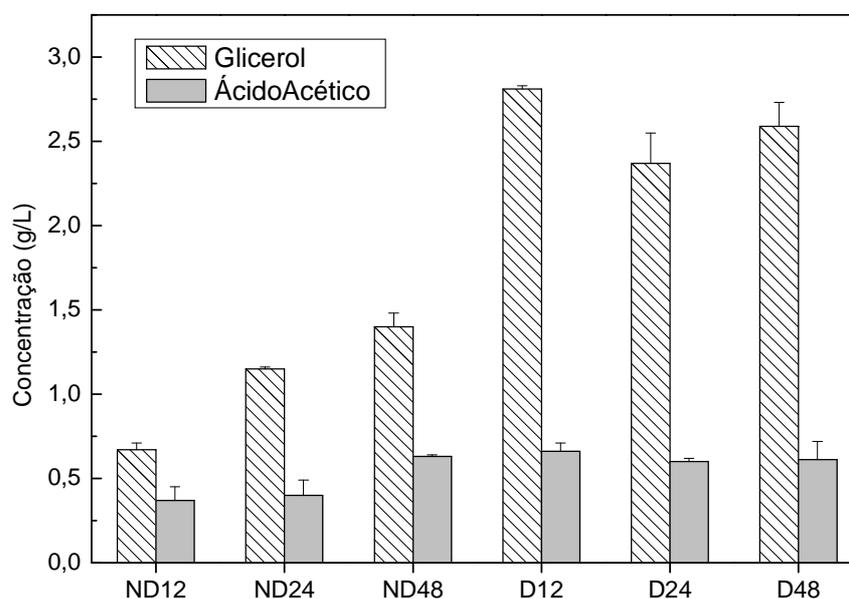
Nas hidrólises enzimática em batelada alimentada realizadas por Kuhad *et al.* (2010) utilizando papel de jornal, o rendimento foi de 0,39 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> e a produtividade de 0,74 g/L.h. Chen *et al.* (2007) realizaram batelada alimentada durante hidrólise enzimática do amido de milho e obtiveram rendimento de 0,48 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub> e produtividade igual a 0,76 g/L.h. Os resultados do presente trabalho apresentaram rendimentos bastante próximos aos resultados de Chen *et al.* (2007) e Kuhad *et al.* (2010) quando utilizado o bagaço D, em qualquer intervalo de tempo de alimentação (0,40 g/g com 12 h, 0,36 g/g com 24 h e 0,37 g/g com 48 h). Comparando-se as produtividades, os experimentos conduzidos em batelada alimentada com o bagaço D também tiveram resultados semelhantes para os intervalos de 24 (0,75 g/L.h) e 48 h (0,70 g/L.h) e superior para o intervalo de 12 h, obtendo uma produtividade igual a 0,97 g/L.h.

De acordo com Andreoli (2008), uma tonelada de cana produz, em média, 84 litros de etanol e 250 kg de bagaço com 50% de umidade, o que equivale a 125 kg de matéria seca. A produção de etanol a partir do bagaço ND em batelada alimentada foi de 55,37 L/t (12h), 47,65 L/t (24h) e 49,35 L/t (48h). Para o bagaço D, a produção foi de 63,68 L/t (12h), 69,54 L/t (24h) e 77,54 L/t (48h) (Figura 5.12). Houve um aumento de 15% (12h), 45,94% (24h) e 57,12% (48h), quando foi fermentado o hidrolisado do material deslignificado. Esses valores foram corrigidos de acordo com o rendimento em massa obtido após as etapas de pré-tratamento (66%) e deslignificação (50%) conforme a equação 4.18 (item 4.8). Apesar da perda em massa após os tratamentos anteriores à hidrólise, o teor de celulose no material D ainda proporciona maior concentração de glicose e, conseqüentemente maior produção de etanol.

A análise de variância mostrou ao nível de 95% de probabilidade ( $p > 0,05$ ) que houve diferença significativa quando foram comparados os valores de produção de etanol por tonelada de bagaço entre todos os ensaios realizados ( $F = 37,92$ ), também houve diferença significativa quando comparados os resultados dos bagaços não-deslignificados ( $F = 16,68$ ). Também foi verificado que não houve diferença significativa quando comparados os resultados entre os bagaços deslignificados ( $F = 3,41$ ).

Os resultados indicam que a utilização do bagaço deslignificado no processo de batelada alimentada com menor intervalo de tempo de alimentação (12 horas) favorece ao aumento da concentração de glicose, o que contribui com a produção de etanol.

Os resultados das produções dos subprodutos da fermentação, glicerol e ácido acético, podem ser visualizados na Figura 5.12. Os hidrolisados a partir do bagaço deslignificado apresentaram maior quantidade de glicerol.



**Figura 5.12.** Concentrações de glicerol e ácido acético após 24 horas de fermentação dos hidrolisados enzimáticos.

Dentre os compostos tóxicos, o ácido acético formado da degradação da hemicelulose tem sido descrito como um dos principais inibidores do metabolismo microbiano. O efeito inibidor desse ácido está diretamente relacionado com a acidez do meio e, principalmente, à sua concentração no meio de fermentação (Ferrari *et al.*, 1992).

Santos e Gouveia (2009) quantificaram estes inibidores nos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e observaram ausência de derivados furânicos e quantidades muito pequenas de compostos fenólicos e de ácido acético já que o hidrolisado foi obtido a partir de bagaço deslignificado e este material após

a deslignificação foi lavado exaustivamente o que favoreceu a remoção de parte destes compostos.

De acordo com Palmqvist e Hahn-hägerdal (2000), os ácidos orgânicos fracos diminuem a produção de biomassa e de etanol apenas a partir de concentrações maiores que 6 g/L. Dessa forma, a concentração de ácido acético presente nos hidrolisados enzimáticos não é considerada um fator limitante para a fermentação.

A formação de glicerol na fermentação alcoólica está acoplada ao crescimento, à formação de ácidos e situações de estresse para a levedura, tais como estresse osmótico causado por elevadas concentrações de açúcares ou sais, contaminação bacteriana e temperatura elevada (Basso, 2006).

A produção desses subprodutos implica diretamente na redução da produção de etanol, mas alguns deles são fundamentais para preservar a atividade microbiana. O glicerol, por exemplo, é importante para a manutenção do crescimento da levedura.

## 6 CONCLUSÕES

- As análises de MEV e a caracterização química evidenciaram uma grande solubilização dos componentes, tornando a celulose mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa.
- Com a redução de mais de 1/3 da carga enzimática inicial foi gerada quase a mesma concentração de glicose, o que representa um avanço na economia de enzimas.
- O intervalo de tempo de alimentação menor favoreceu ao aumento na concentração de glicose tanto para o bagaço ND quanto D.
- A concentração de biomassa de 8 g/L no inóculo foi suficiente para o consumo de praticamente toda glicose no meio de fermentação em apenas 12 horas.
- Mesmo com as perdas após a deslignificação, para todos os intervalos de tempo de alimentação, o bagaço D, com intervalo de alimentação de 12 horas, apresentou resultados mais elevados de produção de etanol por tonelada de bagaço, comparados ao bagaço ND.

## 7 REFERÊNCIAS

ADSUL, M.G.; GHULEB, J.E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 62:6-10, 2005.

ALBERS, A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, 48:34-37, 2002.

ANDREOLI, C. Convergência de Agricultura e Energia: I. Produção de Biomassa Celulósica para Biocombustíveis e Eletricidade. **Economia e Energia**, XI, n. 66, 2008.

AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. São Paulo. Fermentec, 448 p., 2005.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficiente hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, 4:3, 2011.

AQUINO, R. C. M. P.; D´ALMEIDA, J. R. M.; MONTEIRO, S. N. Nova utilização para sub-produtos da cana através do desenvolvimento de compósitos de matriz polimérica e celulignina, poderá substituir produtos de madeira. **Vértices**. 1:37-42, 1999.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, 26:89-105, 2008.

BASSO, L. C. Fisiologia e Ecologia Microbiana. In: **Workshop – Produção de Etanol**, Lorena, 2006.

BLOMBERG, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **FEMS Microbiology Letters**. 182:1-8, 2000.

BANERJEE, R.; PANDEY, A. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: a technological perspective. **Internacional Sugar Journal**. 104:1238, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Companhia Nacional de Abastecimento (Conab)**. Cana-de-açúcar: safra 2010/2011. Brasília. (Segundo Levantamento), 2010.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**. Capítulo 17. Editora Artmed, 153-157, 2003.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, 337:1291-1296, 2002.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. 33:181-188, 2010.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. **Química Verde no Brasil: 2010 – 2030**. Brasília – DF, 2010.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration e Biodegradation**, 59:85-89, 2007.

CHEUNG, S. W., ANDERSON, B. C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. **Bioresource Technology**, 59:81-96, 1997.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, 2, 2 : 111-146, 1992.

DRIEMEIER, C.; CALLIGARIS, G. A. Theoretical and experimental developments for accurate determination of crystallinity of cellulose I materials. **Applied Crystallography**, 44:184-192, 2011.

DRIEMEIER, C.; PIMENTA, M. T. B.; ROCHA, G. J. M.; OLIVEIRA, M. M.; MELLO, D. B.; MAZIERO, P.; GONÇALVES, A. R. Evolution of cellulose crystals during prehydrolysis and soda delignification of sugarcane lignocellulose. **Cellulose**, 18:1509-1519, 2011.

DRISSEN, R. E. T.; MAAS, R. H. W.; TRAMPER, J.; BEEFLINK, H. H. Modelling ethanol production from cellulose: separate hydrolysis and fermentation versus simultaneous saccharification and fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, 27:27-35, 2009.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, 55:1-33, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

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

FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. **Waste Biomass Valor**, 1:65-76, 2010a.

FERREIRA-LEITÃO, V.; PERRONE, C. C.; RODRIGUES, J. FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S. ZACCHI, G. Aneapproach to the utilisation of CO<sub>2</sub> as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production, **Biotechnology for Biofuels**, 3:7, 2010b.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology Biotechnology**, 59:618-628, 2002.

GALEMBECK, F.; BARBOSA, C. A. S.; SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. **Química nova**, 32:571-581, 2009.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. New Delhi: Indian Institute of Technology, 1987.

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-de-açúcar. **Química Nova**. 32:1500-1503, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, 24, 2006.

HALLSWORTH, J.E. Ethanol-induced water stress in Yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 85:125-137, 1998.

HEIPIEPER H.J., DE BONT J.A.M. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. **Applied Environmental Microbiology**, 60:4440–4444, 1994.

HONG, S.Y.; LEE, J.S.; CHO, K.M. et al. A novel bifunctional cellulase-xylanase from *Thermotoga maritima* by end-to-end fusion. **Biotechnology Letters**, 28:1857-1862, 2006.

HOWELL, J. A.; STUCK, J. D. Kinetics of Solka Floc cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. **Biotechnology Bioengineering**, 17:873-893, 1975.

HSU, T. A., LADISCH, M. R., TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, 10:315–319, 1980.

HSU, T. A. Pretreatment of biomass. In Handbook on **Bioethanol: Production and Utilization**. Edited by: Wyman CE. Washington, DC, USA: Taylor e Francis: 179-212, 1996.

HUANG, X. L., PENNER, M. H. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 39:2096-2100, 1991.

KUHAD, R. C.; MEHTA, G.; GUPTA, R.; SHARMA, K. K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, 34:1189-1196, 2010.

KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial e. Engineering Chemistry Research**, 48:3713-3729, 2009.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy use in cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, 4:27, 2011.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.) **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, p.1-43, 2001.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, 248p, 2002.

LIMA, A. L. G.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Cellulase activity produced by *Streptomyces drozdowiczii* using low cost agro-industrial by-products and tests for biotechnological application. **Enzyme and Microbial Technology**, 37:272, 2005.

MAGER, W. H.; VARELA, J. C. S. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. **Molecular Microbiology**, 10:253-258, 1993.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, 31:274-282, 2002.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, 40:426-432, 2007.

MARTÍN, C.; THOMSEN, M. H.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; BELINDATHOMSEN, A. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. **Bioresource Technology**, 2008.

MARTINI, S.; RICCI, M.; BONECHI, C.; TRABALZINI, L.; SANTUCCI, A. E; ROSSI, C. In vivo C-CMR and modeling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Microbiology Letters**, 564: 63-68, 2004.

MARTINS, C. A. P. Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2009.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141-178, 1980.

MOLONEY, A. P.; McCRAE, S. I.; WOOD, T. M.; COUGLAN, M. P. Isolation and characterization of 1,4- $\beta$ -d-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. **Biochemistry Journal**, 225, 365, 1985.

MUNENE, C. N., KAMPEN, W. H., NJAPAU, H. Effects of altering fermentation parameters on glycerol and bioethanol production from cane molasses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82: 309-314, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger** – Princípios de Bioquímica. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

OHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G.; Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, 98:2503-2510, 2007.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology Biofuels**, 2008.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, 18: 312, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74:17-24, 2000.

PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**, 62:447-454, 1999.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology** – Part A Enzyme Eng. Biotechnol, 124:1069-1079, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. **Journal Scientific Industrial Research**, 59:12-22, 2000.

PENNER, M.H.; LIAW, E.-T. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma cellulase*. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. **American Chemical Society**, Washington, DC, pp. 363–371, 1994.

PRUDENTE, D. S.; MASUNAGA, E.; MORAES, P. H. G.; OLIVEIRA, R. A utilização do bagaço de cana-de-açúcar na composição da dieta no confinamento bovino. **Cognitio**, 1:1, 2010.

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. 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**, 25: 2600-2607, 2011.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola**, 56:255-263, 1999.

RIVERA, E. C.; RABELO, S. C.; GARCIA, D. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, 85:983-992, 2010.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARAÚJO, G. T. A fast and Accurate Method for Determination of Cellulose and Polyoses by HPLC. In: Resumos do **Fifth Brazilian Symposium on Chemistry of Lignins and Other Wood Components**, Curitiba - PR, Brasil, 1997.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. S. Estudo comparativo de polpas celulósicas obtidas a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por solução ácida e explosão a vapor. **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2006.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline

delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, 2011.

RUDOLF, A., ALKASRAWI, M., ZACCHI, G., LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, 37:195-204, 2005.

SANTOS, E. Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais. **Dissertação de mestrado**, Universidade Estadual Paulista — Júlio de Mesquita Filho, 2008.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 11:27, 2009.

SANTOS, J. R. A., SOUTO-MAIOR, A. M., MARTIN, C., GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química nova**, 33:4, 2010.

SANTOS, J. R. A.; LUCENA, M. GUSMÃO, N.; GOUVEIA, E. R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, 36:584-588, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blüncher, 425-440, v. 2, 2001.

SHULER, M. K; KARGI, G. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Prentice Hall PTR. 2ª. Ed, 2002.

SILVA, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. **Dissertação de Mestrado**. Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, 2009.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTO´S, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299:152-178, 1999.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STROPPIA, C. T.; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S. Caracterização das leveduras floculantes selecionadas em reator do tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica. In: **Sinaferm**, 2003, Florianópolis. XIV SINAFERM, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83:1-11, 2002.

TAHERZADEH M.J., KARIMI K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, 9:1621-1651, 2008.

THYGESEN, A.; ODDERSHEDE, J.; LILHOLT, H.; THOMSEN, A. B.; STAHL, K. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. **Cellulose**, 12:563-576, 2005.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.; RODRIGUEZ, R.J.; E PARKS, L.W. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* from ethanol-induced growth inhibition. **Applied and Environmental Microbiology**, 50:685-689, 1985.

WINGREN, A., GALBE, M., ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottleneck. **Biotechnology Progress**, 19:1109-1117, 2003.

WOLF, L. D. Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

YALÇIN, S. K., ÖZBAS, Z. Y. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. **Process Biochemistry**, 39, 2004.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in Hydrolysis of biomass in hot-compressed water and it comparisons with other hydrolysis methods. **Energy e Fuels**. 22:40-60, 2008.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 35:367-375, 2008.

**APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS**

**Fed-batch enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in SHF process**

Maria Carolina de Albuquerque Wanderley<sup>1</sup>, Carlos Martín<sup>2,3</sup>, George Jackson de Moraes Rocha<sup>4</sup>, Ester Ribeiro Gouveia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Antibiotics – Federal University of Pernambuco. Cidade Universitária – CEP: 50670-901 – Recife – PE – Brazil.

<sup>2</sup> Department of Chemistry and Chemical Engineering, University of Matanzas, Matanzas 44740, Cuba.

<sup>3</sup> vTI-Institute for Wood Technology and Wood Biology, Hamburg 21031, Germany.

<sup>4</sup> Bioethanol Science and Technology National Laboratory (CTBE), P.O. Box 6170, 13083-970 Campinas, SP, Brazil.

\* [estergouveia@gmail.com](mailto:estergouveia@gmail.com)

## **Fed-batch enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in SHF process**

### **Abstract**

Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse, either alkali-delignified or non delignified, using cellulases 10 FPU/g cellulose and  $\beta$ -glucosidase, was performed. In fed-batch enzymatic hydrolysis, 1 g of material was added periodically after 12, 24 or 48 h. The delignification led to a 75 % increase of cellulose content in the solid fraction and to an 83 % decrease of lignin content. The batch hydrolysis resulted in releasing 16.8 and 40.6 g/L of sugars for non-delignified and delignified bagasse, respectively. Glucose concentration was higher when the addition period was 12 h (59.69 g/L in the experiment with the delignified bagasse), although the conversion has been lower. Fermentations of hydrolysates of fed-batch hydrolysis were performed using *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238. Maximum ethanol volumetric productivities in the fermentations of the hydrolysates of the non-delignified and the delignified material (12-h addition period) were, respectively, 0.42 and 0.97 g/L.h. Higher concentration of glucose was generated in the fed-batch mode using the same enzyme load of batch hydrolysis, due the outer layer of enzyme to continue hydrolyzing the newly added substrate.

Keywords: sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, ethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, fed-batch.

## 1. Introduction

Lignocellulosic biomass, such as agro-industrial residues provide low cost feedstock for the production of fuels and chemicals. Sugarcane bagasse, the major by-product of the sugarcane industry, is an economically viable and very promising raw material for bioethanol production in the large-scale process perspective (Rabelo *et al.*, 2011).

In order to obtain fermentable sugars from bagasse, cellulose has to be hydrolysed either with acids or with enzymes. Enzymatic hydrolysis has several advantages compared to acid hydrolysis because it is performed under milder conditions of temperature, pressure and chemical aggression, thus leading to a decreased formation of by-products (Rivera *et al.*, 2010). Furthermore, due to the enzyme specificity, the degradation of sugars furan aldehydes is avoided (Galbe and Zacchi, 2002; Sun and Cheng, 2002).

However, due to the recalcitrant structure of lignocellulosic materials, native cellulose is low reactive towards enzymes. Therefore, a pretreatment, such as steam explosion among other methods, is required prior to enzymatic hydrolysis to make the cellulose more accessible to attack by enzymes (Galbe and Zacchi, 2002). In order to avoid the interference of lignin on enzymatic hydrolysis, the pretreated material can be delignified, for instance with sodium hydroxide, leaving a solid enriched in cellulose (Fengel and Wegener, 1984). As result of these treatments, swelling in the lignocellulosic material occurs, leading to increase of internal surface area, decrease of the degree of polymerization and crystallinity, separation of structural linkages between lignin and carbohydrates and disruption of the lignin structure (Fan *et al.*, 1982).

The enzymatic hydrolysis of cellulose involves three different kinds of synergistically-acting enzymes, namely endoglucanases, exoglucanases and  $\beta$ -glucosidases (Moloney *et al.*,

1985; Olsson and Hahn-Hägerdal, 1996; Chen *et al.*, 2007). The enzymatic hydrolysis of cellulose is affected by the reaction conditions, the product inhibition, and substrate-related factors (Balat, 2011).

Even if the efficiency of the enzymatic hydrolysis is high, the low substrate consistency in the reaction mixture leads to low sugar concentration in the hydrolysates (Kuhad *et al.*, 2010). Raising the substrate concentration in batch hydrolysis helps to increase sugar concentration, but it also changes the rheological properties of the fibrous suspensions, which difficults mixing and heat transfer (Rudolf *et al.*, 2005). These problems can be avoided if the hydrolysis is carried out in fed-batch mode, *i.e.*, by adding the substrate gradually to maintain the viscosity at low level (Chen *et al.*, 2007).

In enzymatic hydrolysis experiments with newspaper Kuhad *et al.* (2010) observed that in fed-batch mode the production of sugars, and, consequently, the ethanol yield were improved compared to batch experiments (Kuhad *et al.*, 2010). Decreased reaction time is required in fed-batch hydrolysis for achieving equivalent substrate degradation and increased productivity of ethanol as compared to simple batch mode (Chen *et al.*, 2007).

In the current work, the fed-batch enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sugarcane bagasse, either delignified or non delignified, was investigated. Different intervals of substrate adding were evaluated in order to determine the effects of the experimental conditions on the yield of the enzymatic hydrolysis. Thereafter, the enzymatic hydrolysates were fermented to ethanol using *Saccharomyces cerevisiae*.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Raw material, pretreatment and delignification**

Sugarcane bagasse, pretreated by steam explosion at 200°C for 7 min at pilot scale, was kindly provided by Department of Biotechnology of Lorena School of Engineering (University of São Paulo). A portion of the pretreated bagasse was delignified with 1% (w/v) NaOH at a 1:10 (w/v) solid-to-liquid ratio at 100°C for 1 h in a 20-L rotary reactor (AUE/20, Regmed Indústria Técnica Ltda.), fitted with mixing and heating systems.

The content of polysaccharides and lignin in the raw bagasse was determined by two-step analytical acid hydrolysis, according to the analytical procedure recommended by Rocha *et al.* (1997) and validated for sugarcane bagasse by Gouveia *et al.* (2009). Polysaccharide content was calculated after the chromatographic quantification of sugars in the hydrolysates, and lignin was determined as the hydrolysis residue.

## 2.2. Enzymes and activities

A commercial preparation of *Trichoderma reesei* cellulases (Celluclast 1.5L: 69.50 FPU/mL and 13.7 CBU/mL) and a  $\beta$ -glycosidase preparation (Novozym 188: 1340 CBU/mL), both from Novozymes A/S (Bagsværd, Denmark), were added. Enzyme activities expressed were determined according to the method described by Ghose (1987).

## 2.3. Enzymatic hydrolysis of cellulosic

Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8) and 8 g of steam-exploded bagasse either delignified (D) or non delignified (ND) (Section 2.1). The cellulase load was 10 FPU/g cellulose in all the experiments, whereas the  $\beta$ -glucosidase load was 5% (v/v) of the added cellulose amount for the non-delignified bagasse and 10% for the delignified sample.

The Erlenmeyer flasks were incubated in a rotary shaker at 50°C and 150 rpm. In fed-batch enzymatic hydrolysis, the experiments were started with 8 g bagasse, and 1 g of material was added periodically after 12 (ND12 and D12), 24 (ND24 and D24) or 48 h (ND48 and D48) h. All experiments were performed in duplicate.

#### 2.4. Microorganism

An industrial strain (UFPEDA 1238) of *Saccharomyces cerevisiae*, kindly provided by the Culture Collection of Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Brazil, was used. The strain was maintained in a solid medium containing (in g/L): glucose (20), yeast extract (4), peptone (3) and agar (15), at pH 7.0.

#### 2.5. Inoculum preparation and Fermentation

Pure yeast culture from the medium described in Section 2.4 was added to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of the following components: glucose (20 g/L), yeast extract (4 g/L) and peptone (3 g/L) at pH 7.0. The Erlenmeyer flask was incubated in a rotary shaker at 30°C and 250 rpm. After 12 h, the cell suspension was filtered through a 0.45 µm filter. The filtrate was discarded and the cells were re-suspended in 10 mL sterile water and transferred to a 250 mL Erlenmeyer flask, containing 90 mL of enzymatic hydrolyzate.

The fermentation medium based on enzymatic hydrolyzate was supplemented with yeast extract: 4 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2 g/L and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.75 g/L. The pH was adjusted to 5.5. All fermentations were carried out to 34° C, without agitation and in duplicate.

## 2.6. Analysis

Sugars, ethanol and furan aldehydes were quantified by HPLC (Agilent HP 1100, Germany). All samples were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter. Cellobiose, glucose and ethanol were separated on an Aminex HPX-87H<sup>+</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) column at 50°C, using 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 mL/min as mobile phase, and detected with an RI-detector. Furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) were separated on a C-18 column (Beckman) at 25°C, using 11.2/88.8 acetonitrile/1% (v/v)-acetic acid mixture at a flow rate of 0.8 mL/min as mobile phase, and detected by their UV absorbance at 274 nm. The total content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu method with gallic acid as calibration standard, using a HP 8453 spectrophotometer (Agilent, Germany).

The crystallinity index (CI) was measured by X-ray diffraction (XRD), performed on a vertical goniometer (XRD – 6000, Shimadzu) using Cu X-ray radiation generated at 1.2 kW and graphite monochromator in the angular range from 5 to 80 degrees (Bragg angle), step angle of 0.05° and counting time of 1 s. The CI was calculated from the height ratio between the intensity of the crystalline peak ( $I_{002}$ ) with subtraction of amorphous peak ( $I_{\text{am}}$ ) and crystalline peak ( $I_{002}$ ) multiplied by 100.

Scanning electron microscopy (SEM) images were acquired with a JEOL JSM-5900LV instrument operated with 15 kV accelerating voltage, 16 cm working distance and detection of secondary electrons. Sample preparation was done by particulate sticking on the sample holder followed by sputtering of a conductive gold layer.

## 3. Results and discussion

After the delignification, the cellulosic pulp contained 87.29% cellulose, 6.88% hemicelluloses and 5.68% lignin. As result of the delignification, the content of lignin in the pulp was approximately 83% lower than in the steam-exploded bagasse prior to delignification (Table 1). On the other hand, due to lignin solubilization, cellulose content increased in approximately 75%. The removal of lignin was higher than that mentioned (24-55%) by Kumar *et al.* (2009) for alkaline delignification of sugarcane bagasse.

### **Table 1**

The removal of lignin by the alkaline delignification led to fibers unpacked and an open structure, more accessible to the action of enzymes. The surface area and porosity analysis, revealed a higher area ( $1.34 \pm 0.02 \text{ m}^2/\text{g}$ ) for the delignified material than for the non-delignified one ( $1.24 \pm 0.03 \text{ m}^2/\text{g}$ ), which is in good agreement with the SEM observations (Figures 1A and 1B). This is in accordance with previous information on the action of alkali on lignocellulosic materials. It is well known that sodium hydroxide causes swelling, increasing the internal surface of cellulose and decreasing the degree of polymerization and cristallinity, which provokes lignin structure disruption (Taherzadeh and Karimi, 2008).

### **Figures 1A and 1B**

From the results of the X-ray diffraction analysis of steam-exploded and delignified sugarcane bagasse, the crystallinity index values for each material was obtained. The crystallinity index ( $I_c$ ) decreased from 72.1% in the bagasse that was only steam-pretreated to 48.4% in the pretreated and delignified material. These results are consistent with the

goal of the pretreatment and delignification to reduce the crystallinity of cellulose in order to improve its enzymatic conversion (Hägerdal-Hahn *et al.*, 2006).

In a first batch hydrolysis experiment, the  $\beta$ -glucosidase load was the same (5% (v/v)) for both non-delignified and delignified material. In the hydrolysates of the non-delignified material, cellobiose concentration was lower than 1 g/L after 24 hours (Figure 2), indicating that the  $\beta$ -glucosidase load was enough to hydrolyse cellobiose in glucose. On the other hand, this load was not enough in the hydrolysis of the delignified material, since cellobiose concentration in the hydrolysate was around 5 g/L. Based on these results, in further hydrolysis experiments with delignified bagasse the  $\beta$ -glucosidase load was increased to 10% (v/v), which led cellobiose concentrations below 2 g/L after 60 hours. All the results shown in the rest of this work were obtained using  $\beta$ -glucosidase loads of 5 and 10% (v/v) for the non-delignified and delignified material, respectively.

### Figure 2

A clear effect of delignification on the enzymatic hydrolysis was observed. The concentration of glucose was 40.6 g/L after 48 h of batch hydrolysis in the hydrolysates of the delignified material, whereas for the non-delignified material the maximal concentration of glucose was only 16.5 g/L after 72 h (Figure 3). It is also noteworthy the high reaction rate observed in the hydrolysis of the delignified sample, where glucose concentration after 24 h reached 34 g/L, which is equivalent to 81% of the maximal achieved concentration.

### Figure 3

In an experiment using 37 FPU/g cellulose, Santos *et al.* (2010) found 50 g/L glucose, after 48 hours of batch enzymatic hydrolysis of steam-pretreated and alkali-delignified bagasse. In the current work, the achieved glucose concentration was only 18% lower despite the fact that the enzyme load used (10 FPU/g cellulose) was around 73% lower. This result indicates that the enzyme load used in this study was rather enough. It appears, that the enzyme load used in Santos *et al.* (2010) work was excessive, and a part of the enzyme remained inactive. According to Lee and Fan (1982), the enzymes initially adsorb on the fiber surface and form a single layer, while the remainder of enzyme forms additional layers. The superficially adsorbed first layer of enzyme on the fiber would play a significant role on the hydrolysis, but it restricts the diffusion process of the other enzyme layers through the structure of the substrate (Carrillo *et al.*, 2005).

Taking into account that hypothesis, in this work the hydrolysis was performed in fed-batch mode in order to evaluate whether the outer layer of enzyme would continue to hydrolysis the newly added substrate. Fed-batch enzymatic hydrolysis was performed starting with 8 g of biomass, and 1-g portions were added at intervals of 12, 24 or 48 hours.

The fed-back addition of substrate improved the glucose formation pattern for both delignified and non-delignified material (Figures 4A and 4B) compared to the enzymatic hydrolysis carried out in batch mode of operation (Figure 3). The highest results were achieved when the addition period was 12 h, where glucose concentration reached 58.2 g/L after 108 h in the experiment with the delignified bagasse (Figure 4A). In the hydrolysis of the non-delignified bagasse (ND), although glucose formation was lower than that achieved for the delignified (D) material, it is evident that it was also positively influenced by the 12-h addition period (Figure 4B).

**Figures 4A and 4B**

Regarding longer addition periods, no clear differences between the effect of 24-h and 48-h periods were observed up to 72 h for the delignified material (Figure 4A). However, starting from 84 h glucose concentration was considerably higher in the experiment with 24-h addition period than in the one with 48-h period. On the other hand, for the non-delignified bagasse, glucose formation was generally higher for the 24-period than for the 48-h one (Figure 4B).

It should be noted that despite the higher glucose concentrations achieved in the fed-batch hydrolyses, the hydrolytic conversions of cellulose were lower, 25 – 40% with the non-delignified bagasse (Figure 5A) and 30 – 50% with the delignified material (Figure 5B), than those achieved in batch (40% with ND and 55% with D) (Figure 5C). In general, long feeding periods favored the enzymatic hydrolysis process, and the highest conversion (50%) was achieved with the longest period (48 h).

## **Figure 5**

The presence of fibers still intact after 120 h of hydrolysis in fed-batch with 12-h addition period (Figure 6A) indicates that this interval was not enough. With respect to ranges of 24 (Figure 6B) and 48 hours (Figure 6C), the degradation of the fibers increased with increasing the hydrolysis time. The Figure 6C shows that has a remarkably superior wear of fibers, indicating that there was a greater availability of material to enzymatic attack, wich favors the fed-batch with a longer interval of feeding time (48 hours).

## **Figure 6**

The results showed that although lower conversions are achieved in fed-batch hydrolysis, higher amounts of substrate are hydrolysed and higher concentrations of glucose are obtained than when operating at batch mode using the same enzyme load. That is due to the low consistency of fibrous suspensions with relatively low initial substrate concentrations, which avoids the mixing and heat transfer problems typical for the viscous suspensions used in the batch operation mode (Rudolf *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007).

As it should be expected from enzymatic hydrolysis, the concentrations of fermentation-inhibitory compounds were low in all the hydrolysates (Figure 7). However, it is noteworthy that while the levels of the furan aldehydes (furfural and HMF) were comparable for all the conditions, the concentration of phenolics was around four times higher in the hydrolysates of non-delignified bagasse than in those obtained from the delignified material. That can be linked with the hydrolysis of the hemicellulosic fraction due to the hemicellulolytic activity of the used enzyme preparation. As result of that hydrolysis, some phenolic compounds that had remained attached to hemicelluloses could have been released. That did not occur with the delignified bagasse, since most of the hemicelluloses that remained unhydrolysed after pretreatment were solubilised during the delignification, and the xylan entering the enzymatic hydrolysis step corresponded to the difficult-to-hydrolyse hemicellulosic fraction.

### **Figure 7**

The results of fermentations of hydrolysates of the fed-batch hydrolysis are shown in the Table 2. The volumetric productivity of ethanol during fermentation was 0.70-0.97 g/L.h for the hydrolysates of delignified bagasse (D-hydrolysates), and 0.22-0.42 g/L.h for those of the non-delignified material (ND-hydrolysates) (Figure 8). The values achieved in the

fermentations of the hydrolysates of non-delignified bagasse was 31-43% lower. This can be attributed to the inhibiting effect of the phenolic compounds, which are more abundant in the hydrolysates of the non-delignified bagasse (Figure 7). Phenolic compounds can also be the cause of the lower biomass yield achieved in the fermentation of non-delignified material (Table 2). Another possible reason of the better fermentability of the D-hydrolysates is their high substrate availability since they have glucose concentrations considerably higher than those of the hydrolysates of the non-delignified material.

### **Figure 8**

### **Table 2**

The ethanol yield ( $Y_{P/S}$ ) in the fermentation was better for the hydrolysates of the delignified bagasse (0.36-0.40 g/g) than for those of the non-delignified material (0.28-0.37 g/g) (Fig. 6). In the D-hydrolysates, the ethanol yield was comparable independently of the addition period used in the fed-back hydrolysis, whereas in the ND-hydrolysates, it was considerably better (0.37 g/g) for the 12-h addition period than for the 24-h and 48-h addition periods (0.29 and 0.28 g/g, respectively). The lower yields in the hydrolysates of the non-delignified bagasse are a result of the inhibiting effect of the phenolic compounds, whose concentration in that material was higher. It should be noted, however, that the ethanol yield was less inhibited than the volumetric productivity of ethanol. The ethanol yields in the fermentation of the ND-hydrolysates were approximately 8-32% lower than those achieved for the D-hydrolysates, whereas that difference was considerably higher (31-43%) for the volumetric productivity.

#### **4. Conclusions**

Using SEM analysis, crystallinity index determination and chemical characterization it was shown that alkaline delignification led to a significant solubilization of bagasse components, making fibers more exposed to the cellulolytic enzymes. The fed-back addition of both delignified and non-delignified bagasse within 12-h periods led to higher glucose concentrations than within 24-h and 48-h periods. Higher concentration of glucose was generated in the fed-batch mode using the same enzyme load of batch hydrolysis. The enzyme load was 73 % reduced when comparing with previous work, due the outer layer of enzyme to continue hydrolyzing the newly added substrate.

#### **5. Acknowledgments**

The authors acknowledge the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasilia DF, Brazil and from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). The Department of Biotechnology of Lorena School of Engineering (University of São Paulo) is thanked for donating the enzyme preparations and sugarcane bagasse. The microscopic analysis performed by the Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE) is also appreciated. CM gratefully acknowledges the financial support given by the Alexander von Humboldt Foundation.

### List of Figures

**Figure 1.** Photomicrographs of non-delignified (A) and delignified material (B). Magnification 1 000X.

**Figure 2.** Cellobiose concentration during fed-batch enzymatic hydrolysis of delignified (D) and non-delignified (ND) steam-exploded sugarcane bagasse with 10 FPU/g cellulose and 5% (v/v) of  $\beta$ -glucosidase.

**Figure 3.** Glucose concentration during batch enzymatic hydrolysis of delignified (D) and non-delignified (ND) steam-exploded sugarcane bagasse.

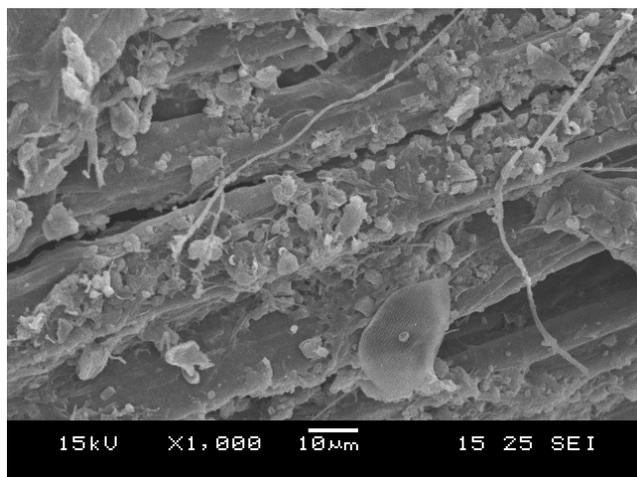
**Figure 4.** Glucose concentration during fed-batch enzymatic hydrolysis of delignified (D) and non-delignified (ND) steam-exploded sugarcane bagasse.

**Figure 5.** Conversion of cellulose during: fed-batch enzymatic hydrolysis of non-delignified (A) and delignified (B) steam-exploded sugarcane bagasse; batch enzymatic hydrolysis of non-delignified and delignified steam-exploded sugarcane bagasse (C).

**Figure 6.** Photomicrographs of the delignified material after fed-batch enzymatic hydrolysis with: 12 hours of feeding interval (A), 24 hours of feeding interval (B) and 48 hours of feeding interval (C).

**Figure 7.** Concentrations of HMF, furfural and phenolic compounds in the hydrolysates obtained by fed-batch enzymatic hydrolysis of delignified (D) and non-delignified bagasse (D).

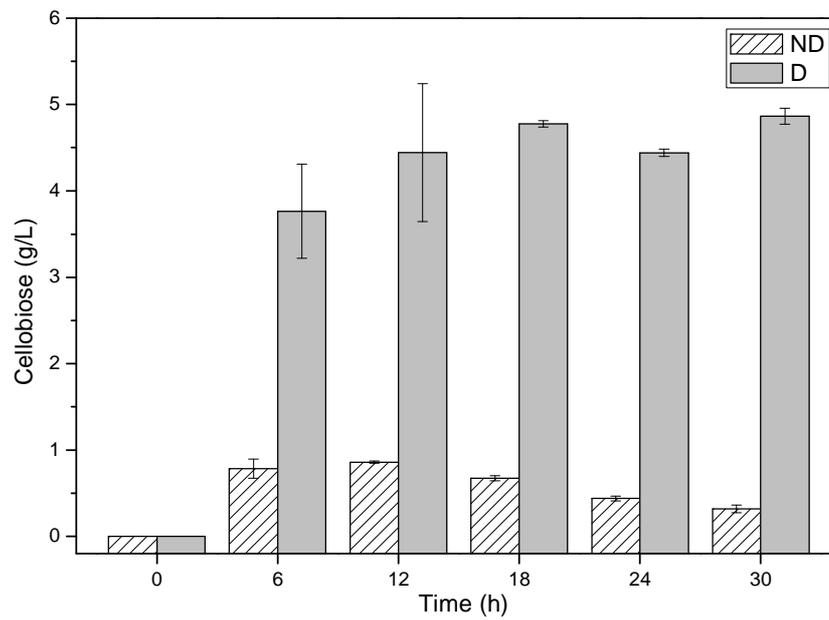
**Figure 8.** Ethanol volumetric productivity ( $Q_P$ ), and ethanol yield per gram of glucose ( $Y_{P/S}$ ).



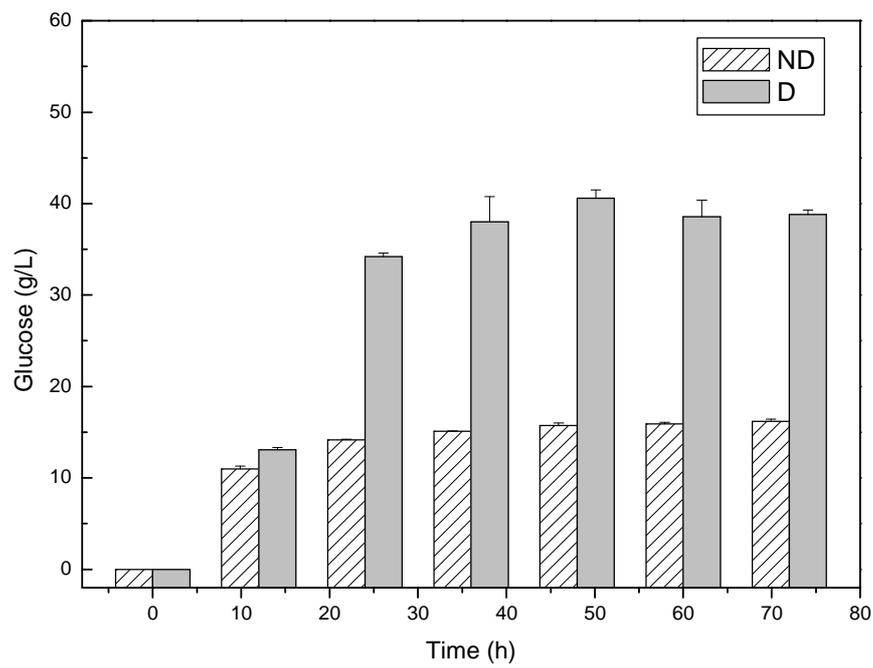
**Figure 1A**



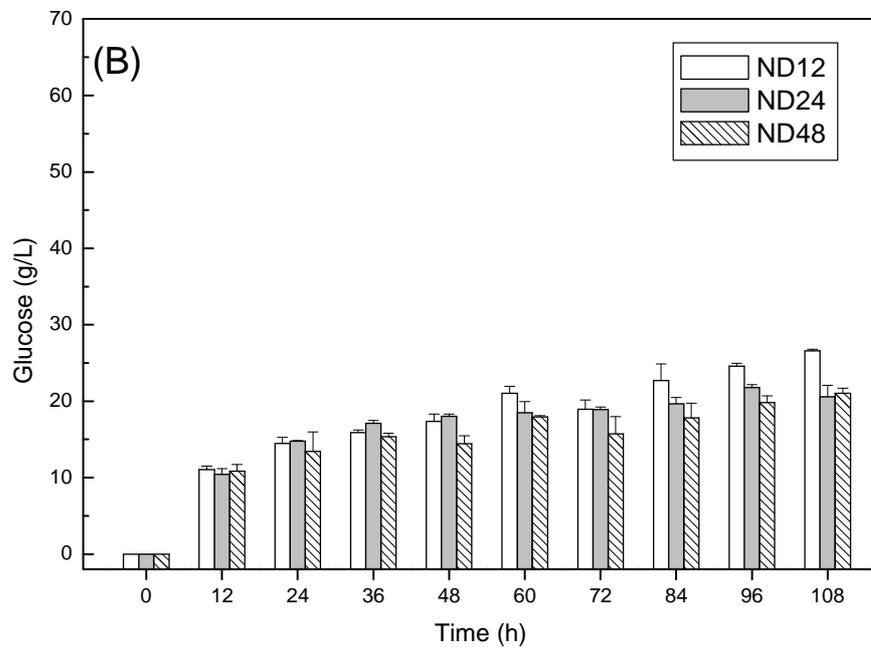
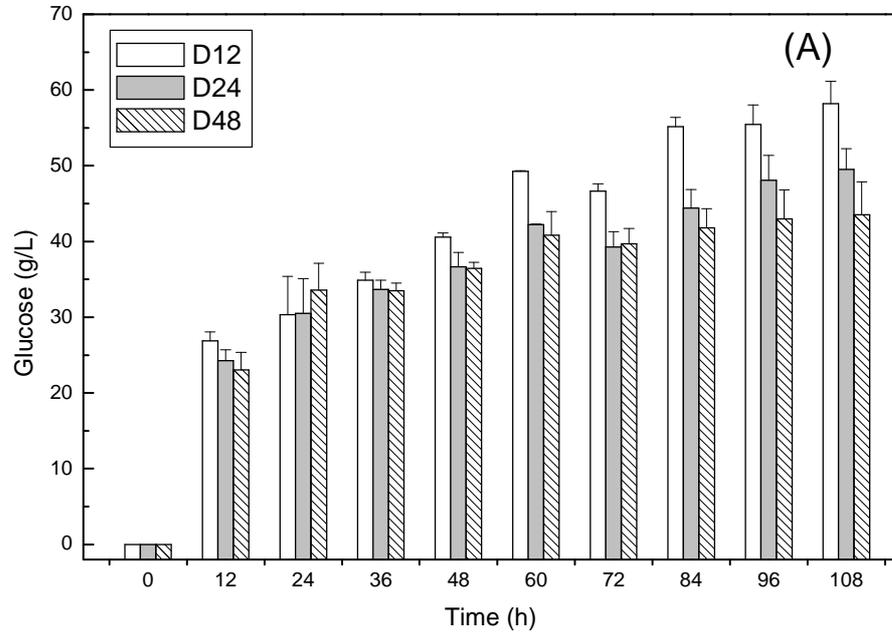
**Figure 1B**

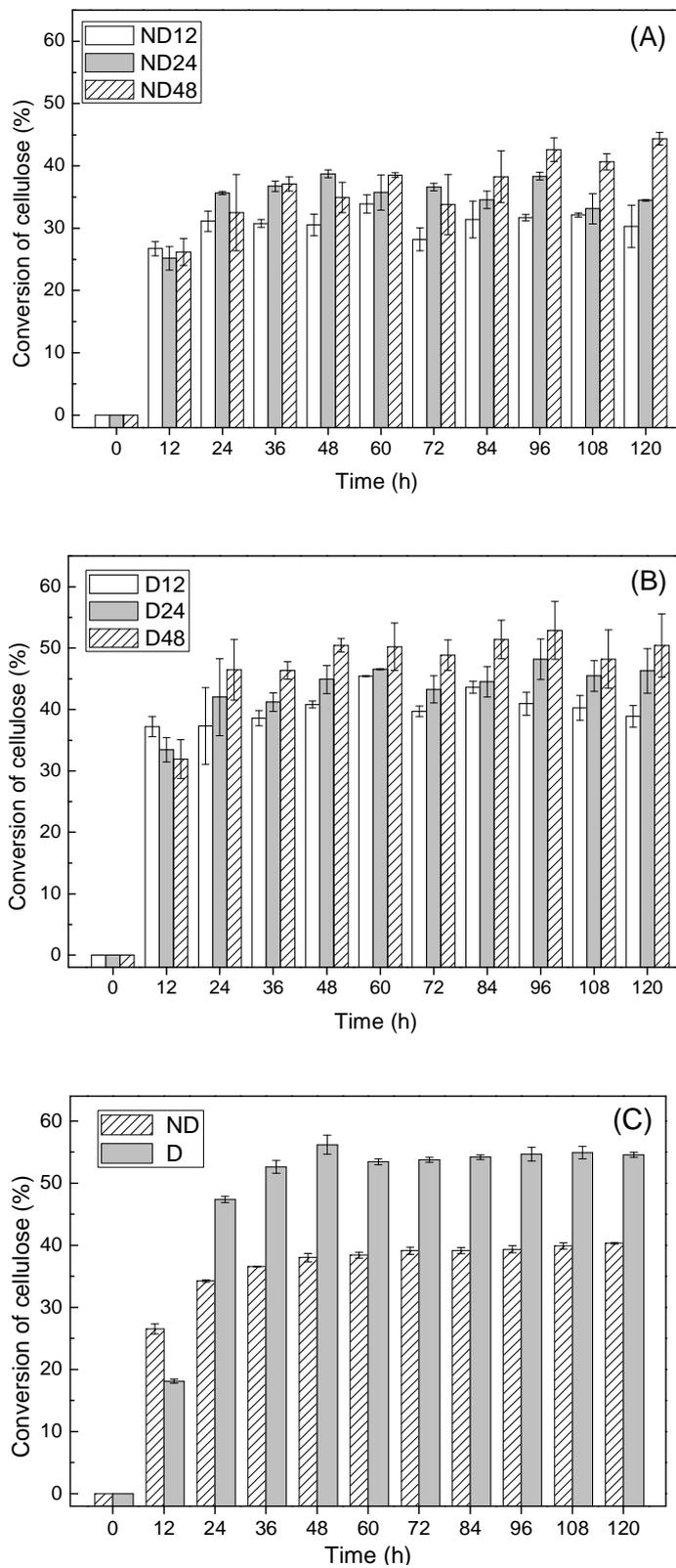


**Figure 2**



**Figure 3**

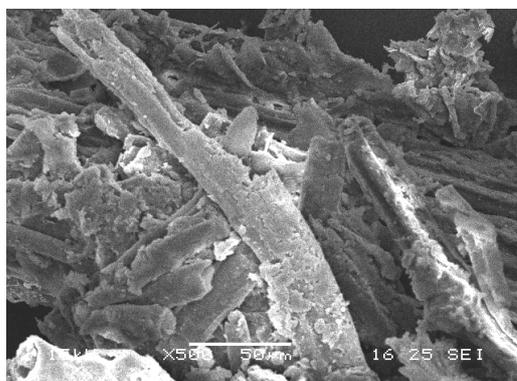
**Figure 4**

**Figure 5**

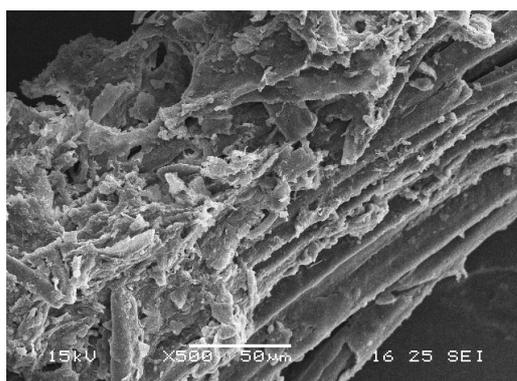
(A)

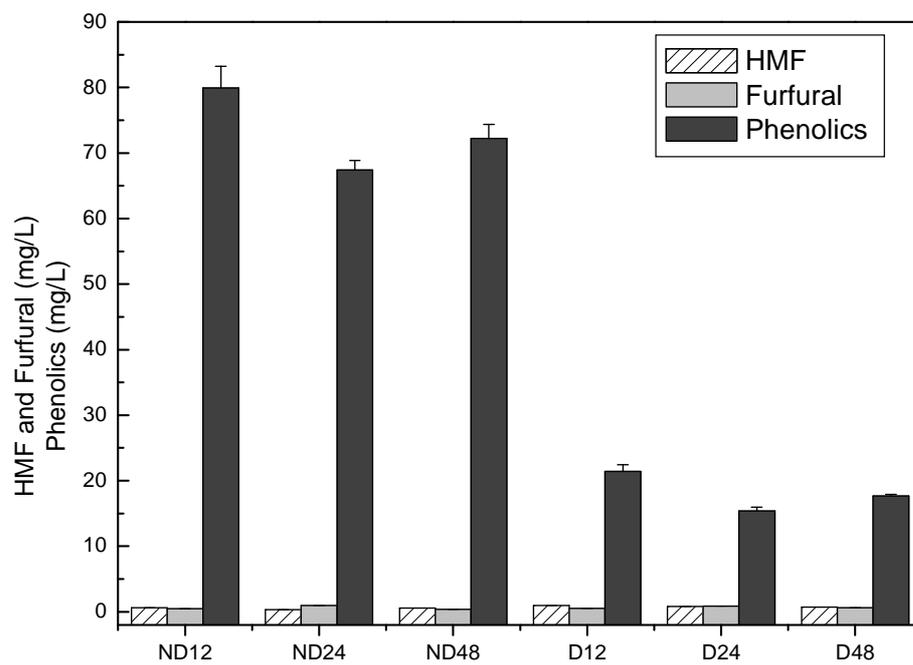


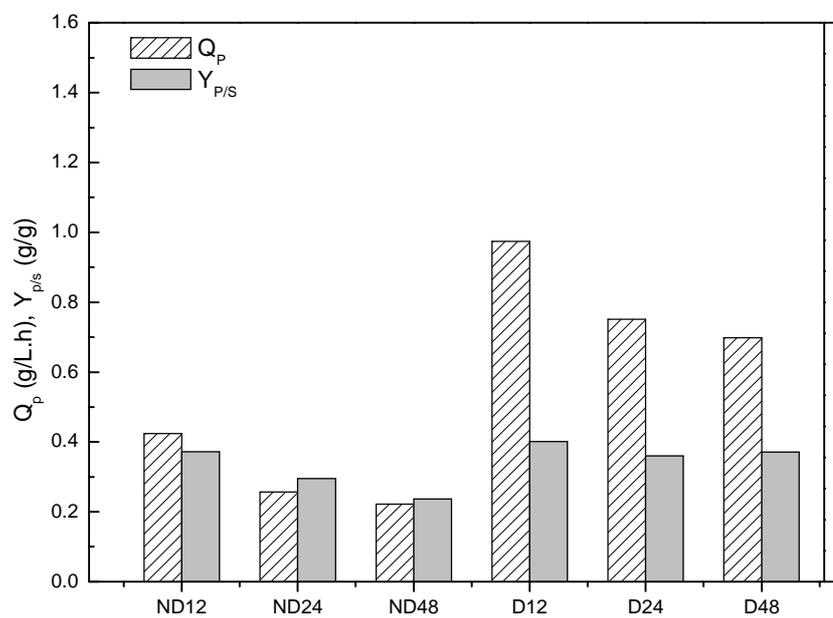
(B)



(C)

**Figure 6**

**Fig****ure 7**



**Figure 8**

Table 1. Composition of steam-exploded sugarcane bagasse delignified (D) and non-delignified (ND).

<i>Bagasse</i>	<i>Cellulose (%)</i>	<i>Hemicellulose (%)</i>	<i>Lignin (%)</i>
ND	49.66 ± 1.22	7.94 ± 0.57	34.59 ± 1.24
D	87.29 ± 2.22	6.88 ± 0.69	5.68 ± 0.13

Table 2. Results of fermentations of enzymatic hydrolyzates of delignified (D) and non-delignified (ND) and delignified steam-exploded sugarcane bagasse.

<i>Fermentations</i>	<i>S<sub>i</sub> (g/L)</i>	<i>S<sub>f</sub>(g/L)</i>	<i>X<sub>f</sub>(g/L)</i>	<i>Ethanol (g/L)</i>
ND12	27.67	0.34	4.88	10.17
ND24	21.40	0.43	6.24	6.18
ND48	22.94	0.47	6.05	5.34
D12	59.69	1.34	7.19	23.38
D24	50.40	0.38	7.13	18.02
D48	45.54	0.43	8.02	16.75

X<sub>i</sub> (4.0 g/L); S<sub>f</sub> (Final glucose concentration – 24 hours); S<sub>i</sub> (Initial glucose concentration)

## APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NA REVISTA INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS

The screenshot displays the Elsevier Editorial System (EES) interface for the journal *Industrial Crops and Products*. The page is titled "Submissions Being Processed for Author Ester Gouveia, PhD" and shows a list of submissions. The submission details are as follows:

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		Fed-batch enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for ethanol production by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UPPEDA 1238 in SHF process	Apr 12, 2012	Apr 12, 2012	Submitted to Journal

The page also includes navigation links such as "home", "main menu", "submit paper", "guide for authors", "register", "change details", and "log out". The user is identified as "Username: EGouveia-887" with the role of "Author". The version of the EES is noted as "EES 2011.1.3".