UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LINA MARCELA DURÁN MIRANDA

Estudo da fermentabilidade do hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino

Lorena SP

2017

LINA MARCELA DURÁN MIRANDA

Estudo da fermentabilidade do hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de microbiologia aplicada.

Orientadora: Profª .Drª. Inês Conceição Roberto

Edição reimpressa e corrigida

Lorena

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DE ESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro”

Provérbios 3:13-14

Dedico esta dissertação ao meu Deus e a minha família, Arnaldo, Concepción, Leidy e Luis.

AGRADECIMENTOS

Principalmente eu quero agradecer a meu Deus, porque tudo que tenho e sou devo a Ele, sem sua ajuda não tinha sido possível chegar onde estou.

A minha mãe Concepción, por seu apoio e amor incondicional, a meu pai Arnaldo por suas palavras de ânimo e cuidado que me ajudaram em momentos difíceis, a minha irmã Leidy e meu irmão Luis por estar sempre aí para me escutar apesar da distância.

A professora Dra. Inês Conceição Roberto, pela paciência, dedicação ajuda e profissionalismo que teve para ensinar-me e guiar-me durante o trabalho, tudo que aprendi com ela neste tempo tem grande valor para mim.

Aos companheiros de laboratório Rafael Castro, Tulio Santos, Bruno Guedes, Isabela Ferreira, Daiana Torres, Alana Mesquita e Isabela Maciel pela sua amizade e ajuda durante todo este tempo.

A todos meus amigos e amigas em Brasil e Colômbia por ter torcido por mim e me apoiaram ou ajudaram no processo do trabalho, sua companhia foi fundamental para mitigar a saudades de casa, em especialmente aos colombianos em Lorena Annie, Diego e Andrés.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de biotecnologia Industrial, pela amabilidade e ajuda que me deram quando precisei, em especial ao funcionário José Moreira.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Miranda, L. M. D. **Estudo da fermentabilidade do hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino**. 2016. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, visando a produção de etanol por leveduras. Inicialmente, o bagaço de cana foi pré-tratado com sulfito alcalino para remover parcialmente a lignina e alterar a estrutura da celulose e hemicelulose. Os efeitos deste pré-tratamento foram avaliados em termos da composição química dos materiais obtidos: um material lavado (BPL) e outro não lavado (BPNL) após tratamento. A digestibilidade enzimática dos materiais obtidos foi testada empregando dois extratos enzimáticos comercias e 3 cargas de enzimas, de acordo com um planejamento experimental 2^2. A partir destes resultados foi selecionado o extrato Cellubrix suplementado com β-glicosidase na carga de 18 FPU/g de biomassa, e nesta condição os rendimentos de conversão de celulose e xilana foram cerca de 70% e 65%, respectivamente. Os hidrolisados enzimáticos do BPL e BPNL porém suplementados com nutrientes (2,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4, 0,3 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 5,0 g/L de extrato de levedura), e avaliados quanto a produção de etanol por *K. marxianus* Y-6860 a 40°C. Os resultados mostraram que a levedura produziu etanol apenas a partir de glicose, e os parâmetros fermentativos obtidos com o hidrolisado BPNL Q_P = 3,7 g/L.h e $Y_{P/S}$ = 0,40 g/g foram 20 e 5%, respectivamente superior ao BPL. O hidrolisado enzimático do BPNL foi então selecionado, para avaliar o efeito da suplementação nutricional nos parâmetros fermentativos da levedura *K. marxianus* Y-6860, em três temperaturas diferentes (30, 35 e 40°C) de acordo com um planejamento experimental 2^2. Para efeito de comparação, foi também avaliada a fermentabilidade do hidrolisado BPNL pelas leveduras *S. cerevisiae* PE-2 e *S. stipitis* Y-7124. Os resultados mostraram que para as três leveduras estudadas, os valores dos parâmetros fermentativos, foram favorecidos a 30 °C na presença nutrientes. Nesta condição, as leveduras apresentaram valores de $Y_{P/S}$ similares (~ 0,48 g/g), em quanto que o Q_P foi de 3,25; 2,17 e 0,95 g/L.h para *K. marxianus*, *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, respectivamente. Ressalta-se ainda que nesta condição, a *S. stipitis* Y-7124 foi a única levedura, capaz de consumir completamente ambos os açúcares (glicose + xilose) e produzir uma concentração de etanol 46% maior comparado as outras leveduras. Foi avaliado também a fermentabilidade das três leveduras no hidrolisado enzimático BPNL com alta concentração de glicose (100 g/L), nas condições anteriormente selecionadas. Os resultados mostraram que, as três leveduras apresentaram potencial para produção de etanol a partir da glicose, com uma eficiência de conversão de etanol superior a 70%, no entanto deveriam se implementar estratégias para estimular o consumo de xilose. Com os resultados do presente trabalho se pode concluir que o hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino suplementado com nutrientes, é um meio com grande potencial para a produção de etanol com características favoráveis para ser eficientemente fermentado por diferentes espécies de leveduras.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Pré-tratamento sulfito alcalino. Sacarificação. Fermentação. Etanol.

ABSTRACT

Miranda, L. M. D. **Fermentability study of the enzymatic hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pre-treated with alkali sulfite process**. 2016. 132 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

The present work had the objective to evaluate the fermentability of the enzymatic hydrolyzate of sugar cane bagasse pre-treated with alkali sulfite process, aiming the ethanol production by yeasts. Initially, sugarcane bagasse was pretreated with alkaline sulfite process to remove lignin partially. The effects of this pre-treatment, were evaluated in the chemical composition of the materials: one material washed after treatment (WB) and another unwashed material (UWB). The enzymatic digestibility of the obtained materials was tested using two commercial enzymatic extracts and three enzyme loads according to an experimental design 2^2. From these results, the Cellubrix extract supplemented with β-glucosidase, was selected in the load of 18 FPU/g of biomass, in this condition the cellulose and xylan conversion yields were about 70% and 65%, respectively. The enzymatic hydrolysates of WB and UWB supplemented with nutrients (2,0 g/L $(NH_4)_2 SO_4$, 1,0 g/L $KH_2 PO_4$, 0,3 g/L $MgSO_4 .7H_2O$, 5,0 g/L yeast extract), were evaluated for ethanol production by *K. marxianus* Y-6860 at 40°C. The results showed that the yeast produced ethanol only from glucose, and the fermentative parameters obtained with the UWB hydrolyzate Q_P= 3,7 g/L.h and $Y_{P/S}$= 0,40 g/g, were 20 and 5% respectively higher to WB. The UWB hydrolyzate, was selected to evaluate the effect of nutritional supplementation, in the fermentative parameters of *K. marxianus*, at three different temperatures (30, 35 and 40°C) according to an experimental design 2^2. For comparison, were also evaluated fermentability of *S. cerevisiae* PE-2 and *S. stipitis* Y-7124 in the hydrolyzate. In the three yeasts, the results showed that the values of the fermentative parameters, are favored when the hydrolyzate is supplemented with nutrients to 30°C. In this condition , yeasts showed similar $Y_{P/S}$ value (~0,48 g/g), whereas the Q_P was of 3,25; 2,17 and 0,95 g/L.h for *K. marxianus*, *S. cerevisiae* and *S. stipitis*, respectively. It is also worth noting that in this condition *S. stipitis* was the only yeast able to completely consume both sugars (glucose+xylose) and produce a concentration of ethanol of 46% higher than other yeasts. In the previously selected condition, the fermentability of the hydrolyzate with high glucose concentration (100 g/L) was also evaluated. The results showed that the three yeasts presented potential for the production of ethanol from glucose, with an ethanol efficiency of over 70%, however strategies should be implemented to stimulate the consumption of xylose. With the results of the present work it can be concluded that the enzymatic hydrolyzate of sugar cane bagasse pretreated with alkaline sulfite process supplemented with nutrients is a medium with great potential for the production of ethanol with characteristics favorable to be efficiently fermented by different species of yeasts.

Keywords: Sugar cane bagasse. Pre-treatment alkaline sulfite process. Saccarification. Fermentation. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Morfologia da planta da cana-de- açúcar 25

Figura 2.2 - Corte transversal do colmo da cana-de-açúcar 26

Figura 2.3 - Produção de cana-de-açúcar: safras 2010/11 a 2016/17 28

Figura 2.4 - Bagaço de cana-de-açúcar *in natura* 29

Figura 2.5 - Diagrama de um arranjo clássico moinho de três cilindros 30

Figura 2.6 - Tipos de embebição na extração do caldo dos colmos da cana 31

Figura 2.7 - Tipos de partícula do bagaço de cana: fibra e pô 32

Figura 2.8 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar 33

Figura 2.9 - Arranjo da fibrila, microfibrila e celulose da parede celular das plantas 34

Figura 2.10 - Representação esquemática de uma hemicelulose de gramínea 36

Figura 2.11 - Proporção dos carboidratos na hemicelulose do bagaço de cana 36

Figura 2.12 - Precursores da lignina 37

Figura 2.13 - Usos potenciais do bagaço de cana-de-açúcar 39

Figura 4.1- Curva padrão de glicose 65

Figura 4.2 - Curva que relaciona inverso da diluição de enzima e concentração de glicose produzida 66

Figura 4.3 - Curva padrão de 4-nitrofenol (p-NP) 67

Figura 4.4 - Curva que relaciona quantidade de p-NP por minuto 68

Figura 4.5 - Curva de pesso seco das leveduras *K. marxianus* (A), *S. cerevisiae* (B) e *S. stipitis* (C) 69

Figura 5.1 - Massa recuperada de cada um dos componentes do bagaço de cana pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL) com relação ao bagaço de cana *In natura* (g/100g) ... 75

Figura 5.2 - Produção de glicose (linha continua) e xilose (linha tracejada) durante a sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (A) e não lavado (B) empregando diferentes cargas do extrato Cellubrix suplementado com Novozyme 188 (CBX+188). 79

Figura 5.3 - Produção de glicose (linha continua) e xilose (linha tracejada) durante a sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (A) e não lavado (B) empregando diferentes cargas do extrato CelliCtec2 (Ctec2). 81

Figura 5.4 - Estimativa dos efeitos X_1 (Tipo de enzima) e X_2 (Carga de enzima) e da sua interação $X_1.X_2$ ao nível de 90% de confiança pelo gráfico de Pareto para o rendimento de conversão da celulose (RCC) (A e B) e rendimento de conversão da xilana (RCX) (C e D) para o bagaço pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL). 84

Figura 5.5 - Perfis de consumo de açúcares e formação de produtos (A) e subprodutos (B) pela levedura *K. marxianus* Y-6860 a partir do hidrolisado enzimático obtido a partir do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino lavado (linha continua) e não lavado (tracejada).....89

Figura 5.6 - Perfil fermentativo da levedura *K. marxianus* Y-6860 em três temperaturas diferentes com suplementação nutricional (símbolo cheio) e sem suplementação nutricional (símbolo vazio) 96

Figura 5.7- Perfil fermentativo da levedura *S. cerevisiae* PE-2 em três temperaturas diferentes com suplementação nutricional (símbolo cheio) e sem suplementação nutricional (símbolo vazio) 98

Figura 5.8 - Perfil fermentativo da levedura *S. stipitis* Y-7124 em três temperaturas diferentes com suplementação nutricional (símbolo cheio) e sem suplementação nutricional (símbolo vazio).....100

Figura 5.9 - Gráfico de Pareto (A e B) e perfil das superfícies de resposta (C e D) para a estimativa dos efeitos da temperatura (X_1); suplementação nutricional (X_2), interação ($X_1.X_2$) e C (curvatura) sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para a levedura *K. marxianus* Y-6860. Efeitos acima da linha de p=0,1 no gráfico de Pareto são significativos ao nível de 90% de confiança. 106

Figura 5.10 – Gráfico de Pareto (A e B) e perfil das superfícies de resposta (C e D) para a estimativa dos efeitos da temperatura (X_1); suplementação nutricional (X_2), interação ($X_1.X_2$) e C (curvatura) sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para a levedura *S. cerevisiae* PE-2. Efeitos acima da linha de p=0,1 no gráfico de Pareto são significativos ao nível de 90% de confiança. 108

Figura 5.11 - Gráfico de Pareto (A e B) e perfil das superfícies de resposta (C e D) para a estimativa dos efeitos da temperatura (X_1); suplementação nutricional (X_2), interação ($X_1.X_2$) e C (curvatura) sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para a levedura *S. stipitis* Y-7124. Efeitos acima da linha de p=0,1 no gráfico de Pareto são significativos ao nível de 90% de confiança. 110

Figura 5.12 - Perfil fermentativo *K. marxianus* Y-6860 (A); *S. cerevisiae* PE-2 (B) e *S. stipitis* Y-7124 (C) em hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (BPNL), a partir de 100 g/L de glicose e temperatura de 30°C. 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - As três principais matérias-primas cultivadas no território brasileiro 28

Tabela 2.2 - Composição química (% m/m Massa seca) do bagaço de cana reportados na literatura 34

Tabela 4.1 - Planejamento fatorial 2^2 para avaliação no efeito do tipo e carga enzimática na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. 53

Tabela 4.2 - Planejamento fatorial 2^2 para avaliação da adição de nutrientes e da temperatura na fermentabilidade das leveduras *K. marxianus*, *S. cerevisiae* e *S. stipitis* no hidrolizado enzimático 56

Tabela 5.1 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *In natura* e após pré-tratamento com sulfito alcalino 72

Tabela 5.2 - Composição química do licor negro após cozimento do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino com a etapa de lavagem (BPL) 76

Tabela 5.3 - Valores máximos dos rendimentos de conversão da celulose (RCC) e xilana (RCX) e das concentrações de glicose e xilose atingidas na sacarificação enzimática após 48 horas de reação com dois tipos de extratos enzimáticos e 3 cargas de enzima. 82

Tabela 5.4 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da celulose (RCC) no bagaço pré-tratado lavado (BPL). 85

Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da celulose (RCC) no bagaço pré-tratado não lavado (BPNL). 85

Tabela 5.6 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da xilana (RCX) no bagaço pré-tratado lavado (BPL). 86

Tabela 5.7 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da xilana (RCX) no bagaço pré-tratado não lavado (BPNL). 86

Tabela 5.8 - Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* Y-6860 em hidrolisado enzimático obtido do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL). 93

Tabela 5.9 - Parâmetros fermentativos das leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae* e *S. stipitis* em hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino com e sem adição de nutrientes em diferentes temperaturas. 103

Tabela 5.10 - Sumário dos melhores resultados de fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) pelas as leveduras *K. marxianus* Y-6860, *S. cerevisiae* PE-2 e *S. stipitis* Y-7124.....111

Tabela 5.11 - Parâmetros fermentativos das leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae* e *S. stipitis* em hidrolisado enzimático de bagaço de cana com 100 g/L de glicose a 30°C. 115

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25

2.1 Generalidades sobre a cana-de-açúcar 25

2.1.1 Morfologia da cana-de-açúcar 25

2.1.2 Produção de cana-de-açúcar no Brasil 27

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar 29

2.2.1 Morfologia das partículas de bagaço de cana 32

2.2.2 Caracterização química do bagaço de cana 33

2.2.3 Usos potencias do bagaço de cana-de-açúcar 38

2.3 Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica 41

3 OBJETIVOS 49

3.1 Objetivo geral 49

3.2 Objetivos específicos 49

4 MATERIAIS E MÉTODOS 50

4.1 Matéria-prima 50

4.2 Caracterização química do bagaço 50

4.3 Pré-tratamento com sulfito alcalino 51

4.4 Hidrólise enzimática 52

4.4.1 Avaliação do tipo e carga do extrato enzimático sobre o rendimento de conversão da celulose e xilana do bagaço de cana pré-tratado 52

4.5 Fermentação 54

4.5.1 Micro-organismo 54

4.5.2 Preparo do inóculo 54

4.5.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL) 55

4.5.4 Avaliação do efeito da adição de nutrientes e a temperatura na fermentabilidade de três leveduras no hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado não lavado 55

4.5.5 Avaliação do efeito da adição de glicose do hidrolisado enzimático na fermentabilidade das leveduras *K. marxianus, S.cerevisiae* e *S. stipitis* 57

4.6 Métodos analíticos 58

4.6.1 Cálculo dos principais componentes do bagaço de cana *In natura* e pré-tratado com sulfito alcalino 58

4.6.2 Cálculos do rendimento e remoção dos componentes no pré-tratamento 61

4.6.3 Cálculos de rendimento de conversão de açúcares 62

4.6.4 Determinação dos teores de açúcares, ácido acético e etanol 63

4.6.5 Determinação dos teores de furano e fenólicos 63

4.6.6 Determinação da atividade celulósica nos extratos enzimáticos 64

4.6.7 Determinação da atividade enzimática da β-glicosidade 66

4.6.8 Curva de pesso seco das leveduras e determinação da concentração celular 68

4.6.9 Determinação dos parâmetros fermentativos 70

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 71

5.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado físico-quimicamente com sulfito em meio alcalino 71

5.2 Avaliação do tipo e carga de enzima na sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino 77

5.3 Fermentação do hidrolisado enzimático obtido a partir do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino empregando a levedura *k. marxianus* Y-6860 89

5.4 Efeito da suplementação nutricional e da temperatura na fermentabilidade do hidrolisado enzimático (BPNL) 94

5.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana com alta concentração de glicose 112

6 CONCLUSÕES 118

REFERENCIAS 119

APÊNDICES 127

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores países produtores de etanol no mundo, sendo a cana-de-açúcar a principal matéria prima de produção. Neste processo, são gerados elevados volumes de subprodutos, sendo um deles o bagaço de cana-de-açúcar. A principal utilização do bagaço de cana é sua queima em caldeiras, para a geração de vapor e energia elétrica, que abastecem os processos da própria usina. Ainda assim, há um excedente de bagaço, o qual poderia ser utilizado também para a produção de etanol, devido a seu potencial energético, representado pela sua rica composição de polissacarídeos (celulose e hemicelulose), os quais podem ser transformados em açúcares monoméricos, permitindo assim um aumento da produção de etanol, sem que seja necessário o aumento das áreas de plantio de cana-de-açúcar.

Para o efetivo uso do bagaço de cana como matéria-prima para a produção de etanol, é necessário uma série de etapas incluindo: 1) pré-tratamento, 2) sacarificação (hidrólise enzimática 3) fermentação e 4) destilação. O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar é a etapa chave do processo, pois tem como objetivo diminuir a limitação a degradação da parede celular da biomassa, que facilita a etapa de sacarificação enzimática. Neste sentido, diferentes tratamentos tem sido estudados, e estes podem ser agrupados em 4 categorias: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

A escolha adequada do pré-tratamento da biomassa é de fundamental importância não somente para a obtenção de um material com características favoráveis a hidrólise enzimática, mas também será determinante para a viabilidade econômica e técnica do processo. Dentre os diferentes pré-tratamentos, o método químico-termomecânico com sulfito, tem sido apontado como um método eficiente para melhorar a digestibilidade enzimática de diversas biomassas lignocelulósicas, incluindo o bagaço de cana-de-açúcar. Neste processo, as reações podem ser conduzidas em meio ácido ou alcalino e são acompanhadas de um processo de refinamento da biomassa lignocelulósica. Quando são conduzidas em meio alcalino, há remoção parcial das hemicelulose e lignina, que também sofre um processo de modificação estrutural. Como resultado, há maior acessibilidade aos componentes de interesse (polissacarídeos), promovendo uma melhora na sacarificação enzimática.

Após a etapa de pré-tratamento, a biomassa é submetida a um processo de sacarificação enzimática, este processo é realizado empregando extratos enzimáticos comerciais os quais contém uma mistura de enzimas entre as que se encontram as celulases, xilanases e enzimas acessórias. Estes grupos de enzimas trabalham em conjunto com o alvo de transformar os polissacarídeos em suas respectivas unidades monoméricas.

Depois de obter os açúcares, se procede a seguinte etapa que é a fermentação de estes açúcares em etanol, para isto é necessário a intervenção de leveduras que tenham esta capacidade. O micro-organismos comumente empregado é a *Saccharomyces cerevisiae* a qual tem se destacado por fermentar os açúcares com alto desempenho e velocidades elevadas, sob condições de estresse. No em tanto, a limitante de esta levedura frente a hidrolisados hemicelulósicos que tenha uma mistura de hexoses e pentoses, é que não é capaz de fermentar xilose, ficando esta fração de açúcares de cinco carbonos sem uso imediato. Por outro lado, leveduras do gênero *Kluyveromyces*, especificamente espécies termotolerantes de *K. marxianus*, tem sido também avaliadas para produção de etanol. Estas leveduras possuem a capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares, tais como glicose, xilose, sacarose, rafinose, insulina e lactose e como consequência possuem grande diversidade metabólica gerando produtos com várias aplicações industriais incluindo a produção de etanol. Dentre as leveduras que também se encaixam para fermentar hidrolisados hemicelulósicos são as espécies *S. stipitis*, as quais tem demostrado a assimilação de glicose e xilose para a produção de etanol.

Neste contexto, e visando contribuir para as pesquisas na produção de etanol de segunda geração, através de escolha de pré-tratamentos eficientes, condições de sacarificação enzimática adequadas e micro-organismos com características desejáveis para a fermentação, o presente projeto, avaliou dois tipos de extratos enzimáticos em 3 cargas diferentes sobre o rendimento de conversão da celulose e xilana do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. A partir dos hidrolisados obtidos, foi avaliado o efeito da temperatura da suplementação nutricional sobre os parâmetros de fermentação das leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae* e *S. stipitis*.

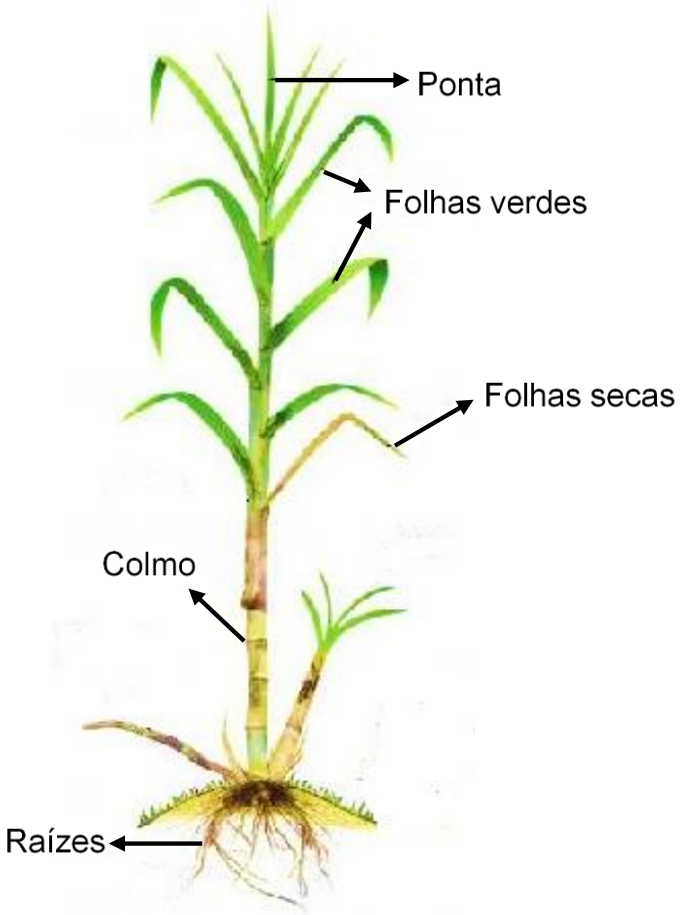
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades sobre a cana-de-açúcar

2.1.1 Morfologia da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma monocotiledônea perene do gênero *Saccharum*, pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*) (FERNANDES, 1984). A morfologia da planta esta composta principalmente por um sistema de raízes, colmo, folhas e ponta como se amostra na Figura 2.1.

Figura 2.1- Morfologia da planta da cana-de- açúcar

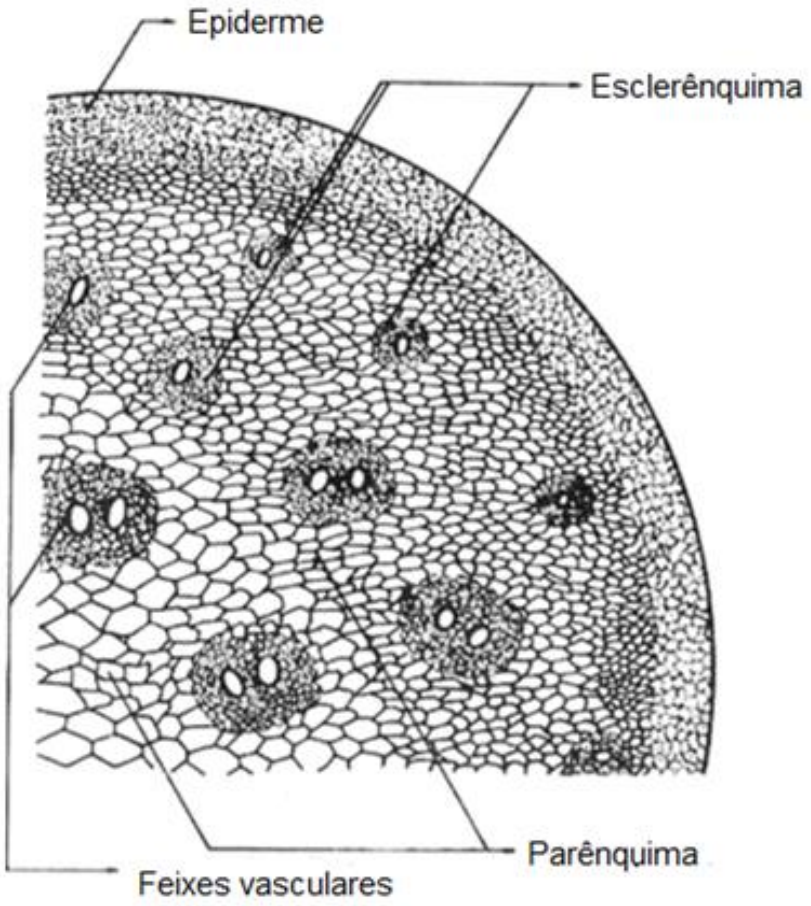


Fonte: Adaptado de Larrahondo, 2005.

O sistema radicular da cana-de-açúcar é desenvolvido após o plantio da semente da cana. As primeiras raízes que se formam são as chamadas “raízes próprias”, estas são finas e altamente ramificadas, as quais sustentam o crescimento da planta nas primeiras semanas após a germinação. As raízes do broto é o segundo tipo de raiz e crescem de 5 a 7 dias depois do plantio. Estas são mais grosas e carnudas comparadas com as “raízes próprias”, e se tornam o principal sistema radial da cana, devido a suas funções de dar suporte a planta, se responsabilizar pela absorção de água e nutrientes, além de procurar as reservas de agua nas profundidades do solo (DILLEWIJN, 1952 apud SMITH; INMAN-BAMBER; THORBURN, 2005).

A parte da planta que tem o maior valor industrial é o colmo da cana, o qual é cilíndrico, fibroso e apresenta uma composição rica em açúcares (principalmente sacarose). A Figura 2.2 mostra um corte transversal do colmo na região do entrenó.

Figura 2.2 - Corte transversal do colmo da cana-de-açúcar



Fonte: Fernandez, 1984.

A parte exterior do colmo é chamada de córtex e a região interna usualmente é chamada de medula. O córtex é composta por várias camadas de células de paredes grossas lignificadas, que dão resistência e proteção aos tecidos internos. Esta parte é predominada por feixes vasculares, os quais são formados por vasos, rodeados por um grande número de células chamadas esclerênquima. A cor do colmo é dada por pigmentos, os quais estão nas células mais externas da epiderme. A medula é composta principalmente pelas células do parênquima e um menor número de feixes vasculares. O parênquima é o tecido mais abundante do colmo e suas células tem como função principal estocar os açúcares (FERNANDES, 1984)

As folhas da cana de açúcar estão alternadas e ligadas ao colmo, formando duas fileiras em lados opostos. São de cor verde, característico da variedade, estado nutricional e fitossanitário (FERNANDES, 1984). Estas se dividem em duas partes: 1) Bainha é a parte da folha que cobre o colmo, e 2) lâmina que é a parte da folha que se estende para o exterior. A forma, tamanho e distribuição de estas partes, são características de importância taxonômica para a identificação da variedade (HEINZ, 1987) As folhas são as responsáveis pela interação entre a planta e a atmosfera, realizando assim os processos de transpiração e fotossínteses provendo-a de energia (FERNANDES, 1984)

2.1.2 Produção de cana-de-açúcar no Brasil

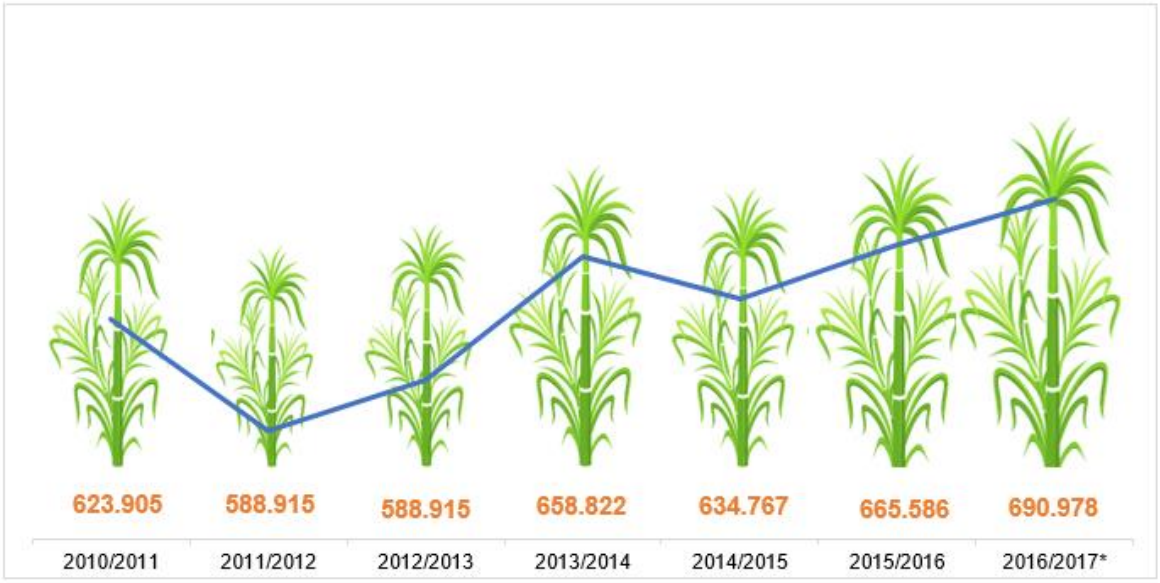
A cana-de açúcar é um planta características de regiões tropicais e subtropicais (DILLEWIJN, 1952 apud CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). No Brasil a plantação de cana-de-açúcar é uma das principais atividades agrícolas, junto com a soja e o milho. Como mostrado na Tabela 2.1, durante a safra 2015/16 estes três produtos ocuparam os primeiros lugares em área plantada. Dentre estas matérias-primas, o cultivo de cana-de-açúcar foi o que apresentou maior produtividade e volume de produção, atingindo 76.909 Ton./hectare e 665.586,2 milhões de toneladas, respectivamente. Para a safra 2016/17 é previsto um acréscimo de 3,8% na produção de cana, onde se espera alcançar um valor de 690.978 milhões de tonelada, o que corresponderia a maior produção dos últimos 6 anos (ver Figura 2.3) (CONAB, 2016).

Tabela 2.1 - As três principais matérias-primas cultivadas no território brasileiro

Matéria-prima	Área plantada (1000 hectares)	Produtividade (Ton./hectare)	Produção (1000 Ton.)
Cana-de-açúcar	8.654,2	76.909	665.586,2
Soja	33.082,30	2.929	96.905,1
Milho	15.655,10	5.107	79.955,2

Fonte: CONAB, 2016.

Figura 2.3 - Produção de cana-de-açúcar: safras 2010/11 a 2016/17



*Previsão em abril de 2016

Fonte: Adaptado de CONAB, 2016.

O cultivo de cana se concentra principalmente no estado de São Paulo, o qual é responsável por 55,2% da produção. Em seguida estão os estados de Goiás (10,7%), Minas Gerais (10,1%), Mato Grosso do Sul (7,0%), Paraná (6,7%), Alagoas (2,6%), Mato Grosso (2,1%) e Pernambuco (2,0%) (CONAB, 2016).

A colheita mecânica da cana é feita quando a planta atinge o ponto de maturação. Nesta etapa, as folhas junto com a ponta, são separados do colmo e deixados no campo, para a proteção do solo e inibir o crescimento de ervas daninhas, e outras espécies de plantas (DIAS et al., 2009). Este resíduo denominado de palha da cana, rende aproximadamente 140

kg massa seca (MS) por cada tonelada de cana. Os colmos são levados até a usina para o processo de transformação, onde se procura extrair o caldo da cana o qual contém os açúcares, que serão utilizados principalmente para a produção de açúcar e/ou etanol. Durante o processo de extração do caldo, simultaneamente é gerado um subproduto denominado bagaço de cana, o qual se estima uma produção de 125 kg (MS) por cada tonelada de colmo de cana processada. Baseado na estimativa de produção de cana na safra 2016/17 a produção de bagaço no Brasil seria em torno de 86.372.250 toneladas (MS) (BRAUNBECK; BAUEN; CORTEZ, 1999; RIPIOLI, 2000; CONAB, 2016).

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo fibroso ou colmo esmagado resultante da extração do caldo no processo de moenda (PANDEY et al., 2000) (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

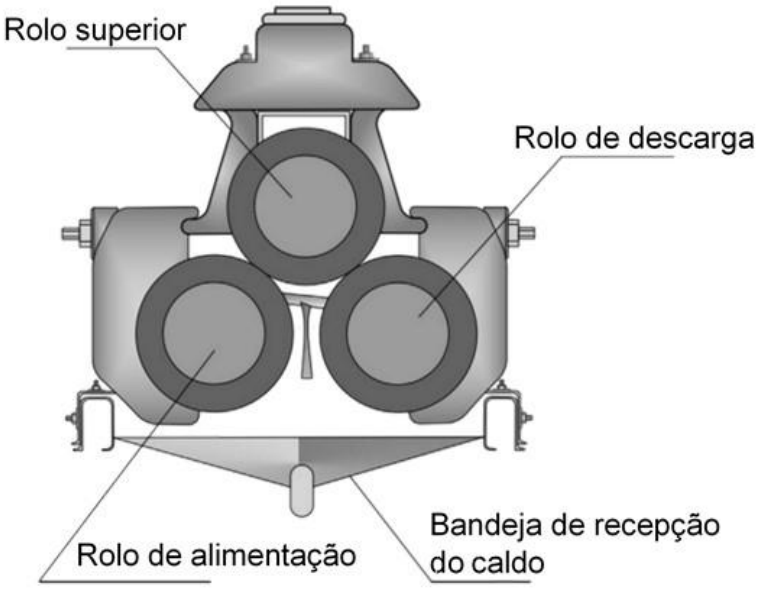
Fonte: Autor

Na usina a extração da caldo envolve dois processos básicos que são: (1) preparação da cana e (2) moagem. A etapa de preparação da cana consiste em cortar os colmos no tamanho apropriado, de modo que eles podam ser utilizados para alimentar o conjunto de equipamentos subsequentes encarregados do processo de extração do caldo. A eficiência do processo de extração é altamente dependente da forma em que a cana foi preparada, este

processo geralmente envolve a utilização de laminas rotativas e martelos perfuradores para cortar e retalhar os colmos. Os principais objetivos do processo de preparação estão reduzir o tamanho do colmo e causar a ruptura das células que contém os açúcares, permitindo assim produzir um material com características adequadas para a extração do caldo por moagem (REIN, 2007).

A finalidade da moagem é de extrair a sacarose da cana por compressão da parte fibrosa da planta (colmo) (REIN, 2007). Após a preparação dos colmos, estes passam através do equipamento de moagem ou "tandem de moagem", o qual é tipicamente composto por um conjunto de 4 a 7 moinhos de três cilindros (Figura 2.5). Este tipo de moinho é composto por um conjunto de três cilindros ou rolos, os quais estão posicionados no centro sob a forma de um triangulo isósceles.

Figura 2.5 - Diagrama de um arranjo clássico moinho de três cilindros



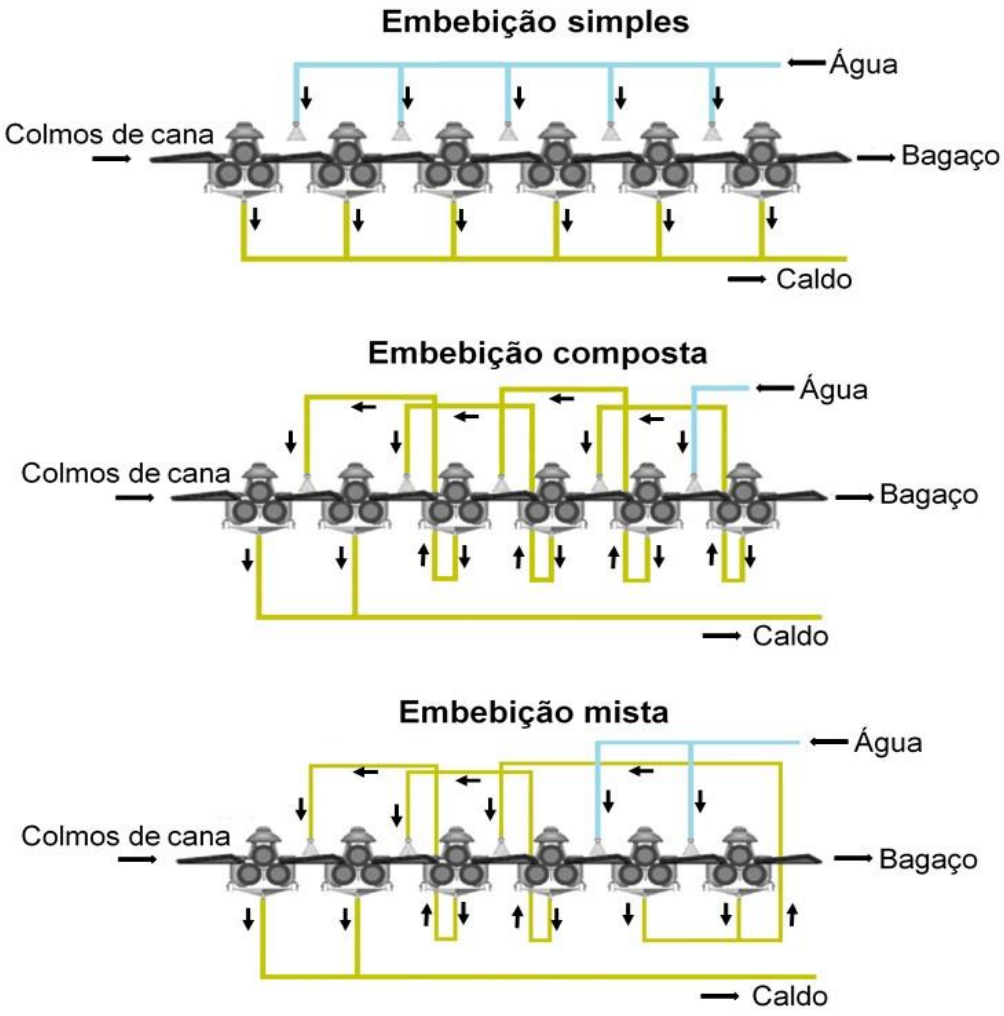
Fonte: Rein, 2007.

Os dois cilindros inferiores tem seus eixos fixos e giram no mesmo sentido, enquanto que o cilindro superior é móvel e gira no sentido oposto aos eixos inferiores. A posição do rolo superior é hidraulicamente controlada para manter a pressão do esmagamento. Após processamento dos colmos em cada um dos moinhos, se obtém duas correntes: uma liquida que é o caldo o qual é recolhido em uma bandeja de recepção disposta no moinho, e outra sólida que corresponde ao colmo esmagado melhor conhecido como bagaço. Para aumentar

a capacidade de alimentação dos colmos e drenagem do caldo, os cilindros dispõem de uma ranhuras em forma de “v” (REIN, 2007).

Devido, ao fato de que o bagaço que sai de cada moinho ainda contem parte do caldo, normalmente é adicionada água na moenda para aumentar a quantidade de extração da sacarose. Este processo se denomina embebição e na indústria existem três tipos: simples, composta e mista (Figura 2.6).

Figura 2.6 - Tipos de embebição na extração do caldo dos colmos da cana



Fonte: Adaptado de Rein, 2007.

A embebição simples envolve a injeção de água durante a moagem do bagaço, e o caldo resultante vai direto para o processo de fabricação. Na embebição composta a água é apenas aplicada no último moinho do “tandem”, e o caldo diluído é total ou parcialmente retornado para a frente do moinho anterior. Neste sistema, o caldo para processamento é extraído no primeiro e segundo moinho. E por último, a embebição mista, a qual combina a

embebição simples e composta, a água é aplicada em mais de um moinho, e o caldo de cada moinho intermediário é parcialmente retornado para o moinho anterior (ANTONIO et al., 2014). Neste processo de moenda o bagaço resultante contem aproximadamente 50% de umidade (RÍPOLI; MOLINA; RÍPOLI, 2000).

2.2.1 Morfologia das partículas de bagaço de cana

O bagaço de cana é constituído por partículas de diferentes tamanhos que variam desde poucos milímetros a alguns centímetros. De acordo com Arnao,(2007) o diâmetro médio da partícula pode variar entre 0.3 e 15,90 mm, porém não se pode generalizar, pois o tamanho do bagaço depende de vários fatores como o tipo de processo de extração do caldo, desenho do moinho, características de compressão e umidade das partículas (ANTONIO et al., 2014).As partículas de bagaço podem se classificar em dois grupos segundo a forma que se encontram: 1) as partículas tipo fibras 2) as tipo pó (Figura 2.7).

Figura 2.7 - Tipos de partícula do bagaço de cana: fibra e pô

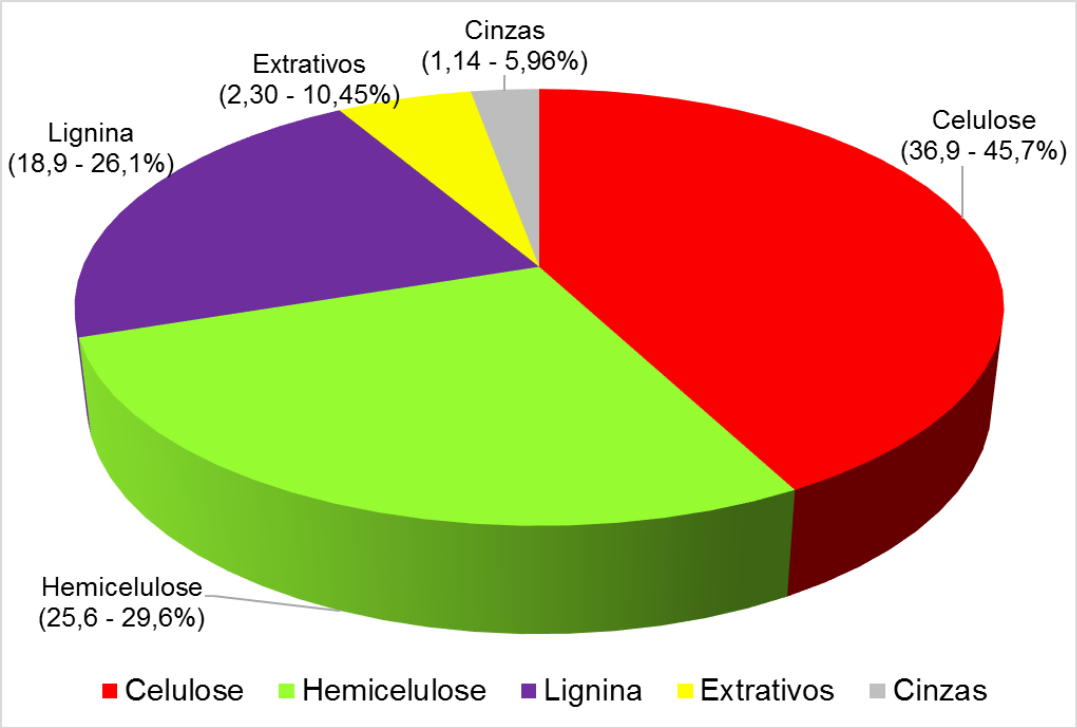
Fonte: Arnao (2007)

As fibras são as partículas maiores alongadas que tem forma de varetas, enquanto as do tipo pó, são partículas menores de forma ligeiramente arredondadas. Ambos tipos de partículas são de característica porosa, higroscópicas e variável em tamanho (NEBRA, 1985). Dentro do grupo de partículas de bagaço a distribuição de fibra e pô, é aproximadamente de 73% e 27% respetivamente (ARNAO, 2007)

2.2.2 Caracterização química do bagaço de cana

O bagaço de cana é um subproduto classificado como biomassa lignocelulósica, devido a sua composição estar baseada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, contendo em menor quantidade extrativos e cinzas, os quais completam a composição típica desta classe de biomassa (REIN,2007;ANTONIO et al., 2014). O intervalo das proporções de cada um destes componentes no bagaço de cana se apresenta na Figura 2.8.

Figura 2.8 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Adaptado de Rocha, 2014.

Na Tabela 2.2 se apresenta a caracterização química do bagaço reportado por diferentes autores. Pode se observar que existe variabilidade em cada um de estes componentes no bagaço. Isto se atribui a diferentes fatores como: variedade plantada, tempo de colheita, método de colheita empregado e processo de extração do caldo (ANTONIO et al., 2014).

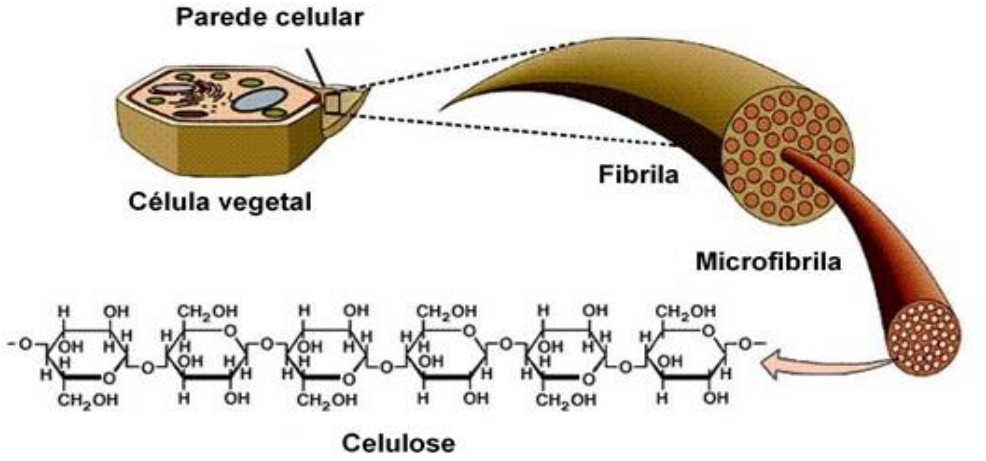
Tabela 2.2 - Composição química (% m/m Massa seca) do bagaço de cana reportados na literatura

Componente (%)	Referência				
	Rocha et al.,(2014)	Antônio et al.,(2014)	Mendes et al.,(2013)	Canilha et al.,(2011)	Carrasco et al.,(2010)
Celulose	42.2	35.31	43.7	45.0	43.4
Hemicelulose	27.6	24.01	27.4	25.8	26.3
Lignina	21.6	22.85	24.0	19.1	22.8
Extrativos	5.63	14.70	NR*	9.1	1.6
Cinzas	2.84	2.93	NR*	1.0	1.9

*NR= Não reportado

A celulose se define como um polímero linear formado por cadeias de resíduos de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β-1,4. Estas cadeias individuais estabelecem ligações de hidrogênio intermoleculares, onde a união de 36 de estas cadeias resulta na formação da microfibrilas (SOMERVILLE, 2006) (Figura 2.9)..

Figura 2.9 - Arranjo da fibrila, microfibrila e celulose da parede celular das plantas



Fonte: MHHE, 2015.

Estas microfibrilas apresentam regiões cristalinas nas quais as cadeias de glucana estão firmemente ligadas em paralelo, mas também tem regiões com menor grau de ordenação chamadas de regiões amorfas (FENGEL; WEGENER, 1983). As microfibrilas compreendem o principal componente da parede celular das plantas. As longas e inelásticas

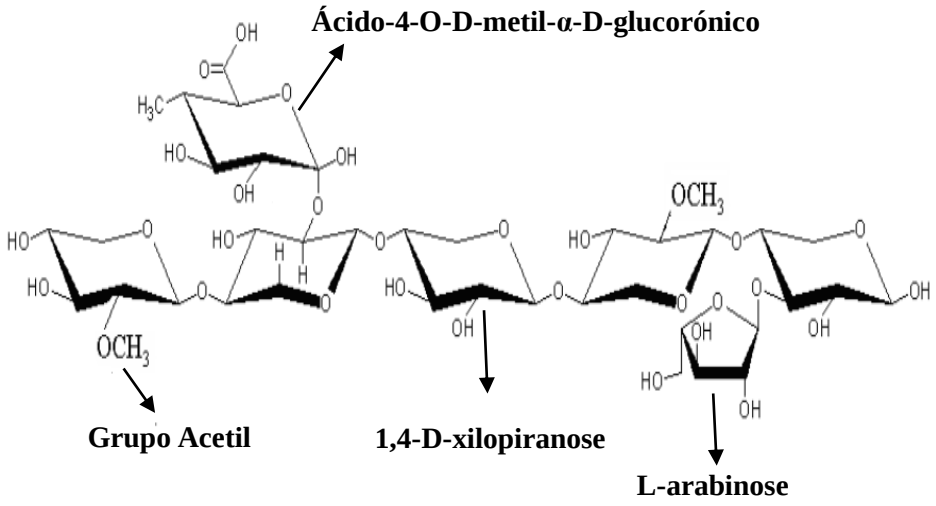
microfibrilas se envolvem em torno das células em camadas sobrepostas, orientadas espacialmente de tal forma que proporcionam resistência as pressões osmóticas (SOMERVILLE, 2006). As microfibrilas de celulose a sua vez estão envoltas em uma matriz de hemicelulose e lignina, as quais protegem o vegetal contra a degradação química e/ ou biológica (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997)

Sun et al., (2004) isolou e caracterizou a celulose do bagaço de cana-de-açúcar, e determinou a viscosidade intrínseca, que é uma característica das macromoléculas que está diretamente relacionada com a sua capacidade de perturbar o fluxo, e indiretamente ao seu tamanho e forma. Para o bagaço de cana o valor da viscosidade intrínseca das amostras de celulose foi entre 356,2 e 415,6 ml/g. Com base neste dado os autores calcularam o grau de polimerização das amostras, sendo encontrados valores de 1.185 a 1.396 o que indica o número de vezes que a molécula de glicose se repete na cadeia de celulose. Tendo o valor do grau de polimerização, foi possível calcular também a massa molar, o qual situou-se entre 192.000 e 227.850 g/mol. Além disso as amostras de bagaço demostraram uma estabilidade térmica proporcional ao seu grau de pureza. De acordo com os autores a celulose isolada com maior grau de pureza empezou a perder massa molar após 260°C, em quanto que amostra com menor grau de pureza a os 205°C.

A hemicelulose é um polímero heterogêneo ramificado de estrutura amorfa, constituído principalmente por pentoses (β-D-xilose, α-L-arabinose) hexoses (β-D-glicose, α-D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α-D-glucorônico, α-D-4-metilgalacturônico e α-D-galacturônico). Outros açucares como α-L-ramose e α-L-frutose também podem estar presentes em pequenas quantidades. Os grupos hidroxilas de estes açúcares podem estar parcialmente substituídos por grupos acetil (GÍRIO et al., 2010) (Figura 2.10).

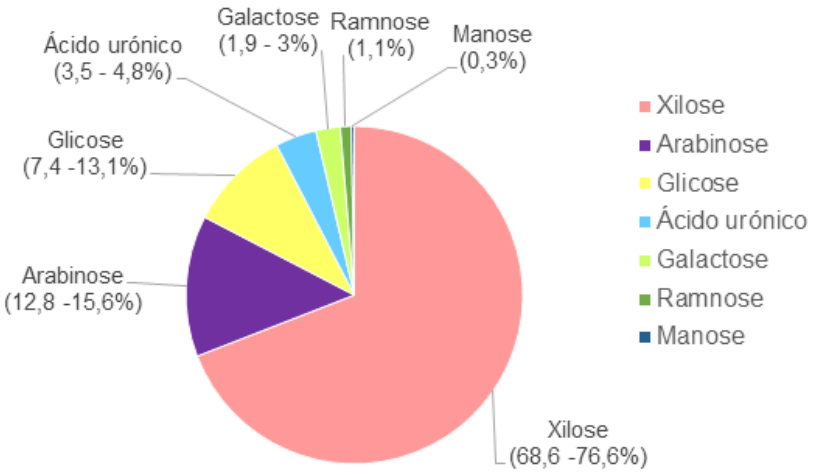
A fração hemicelulósica do bagaço de cana se define estruturalmente como uma L-arabino-(4-O-metil-D-glucorono)-D-xilana com pequenas quantidades de lignina associada aos ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico e *p*-cumárico) esterificados. (SUN et al., 2004b). A proporção da composição dos carboidratos se apresentam na Figura 2.11

Figura 2.10 - Representação esquemática de uma hemicelulose de gramínea



Fonte: Pitarelo, 2007.

Figura 2.11 - Proporção dos carboidratos na hemicelulose do bagaço de cana



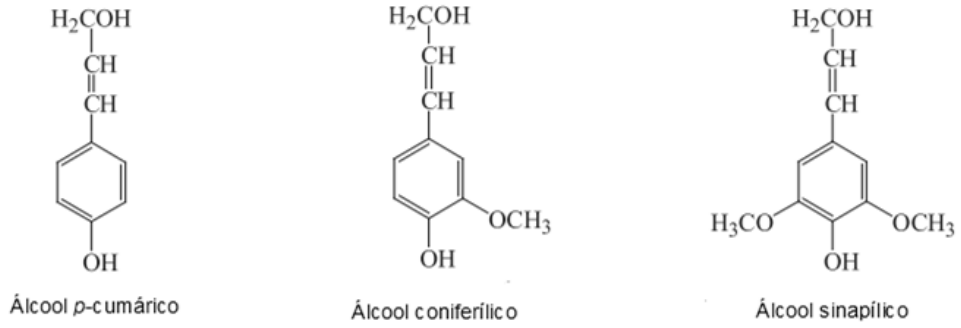
Fonte: Adaptado de Sun et al., 2004b.

A lignina é uma macromolécula fenólica amorfa, que desempenha funções importantes no vegetal, incluindo proteção contra micro-organismos e servindo de material ligante entre os componentes da parede celular (ROCHA et al., 2015). Na natureza a lignina é sintetizada por três precursores que são álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapilico (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). A proporção de estes varia entre os diversos grupos de plantas, e em plantas monocotiledôneas como no bagaço de cana a proporção de estes compostos pode variar entre 5 - 35% de álcool cumárico, 35 - 80% de

álcool coniferílico e de 20 - 55% de álcool sinapilico (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

A lignina se divide em 3 tipos: (1) “lignina *p*-hidroxifenila” (H), (2) “lignina Guaiacila” (G) e (3) lignina “Siringila” (S), a diferença de estes três tipos de lignina, está nos grupos substituintes do esqueleto dos fenilpropanoides. Na lignina tipo H não tem grupo metoxila, a lignina tipo G tem um grupo metoxila no carbono 3, em quanto a lignina tipo S tem um grupo metoxila no carbono 3 e no carbono 5 (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004) (Figura 2.12).

Figura 2.12 - Precursores da lignina



Fonte: Adaptado de Liu, (2012)

No caso do bagaço de cana predomina a lignina tipo G-H-S (Guaiacila-*p*-hidroxifenila-Siringila) nas proporções 18, 39 e 43% respetivamente (BARQUINERO et al., 1980 apud KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). Estas subunidades da lignina variam entre os diferentes tipos de células do bagaço (fibras, vasos e parênquima). A sínteses e depósito da lignina na parede celular ou lignificação ocorre nas etapas iniciais de maturação da célula. Nos feixes vasculares por exemplo se inicia primeiramente nos vasos, seguido por a lignificação das fibras (HE; TERASHIMA, 1990).

A região da medula composta em sua maioria por células do parênquima são menos lignificadas, em outras palavras contem menor teor de lignina, que a região do córtex composta por feixes vasculares, esta característica faz a região da medula menos resistente a desconstrução da parede celular. (SIQUEIRA et al., 2011). Junto com as etapas inicias da lignificação também são depositados os ácidos hidroxicinâmicos, os quais estão

esterificados com a hemicelulose. No bagaço estes predominam mais nas células do parênquima que em nos feixes vasculares (HE; TERASHIMA, 1990; SIQUEIRA et al., 2011).

Os extrativos são constituídos principalmente por sustâncias como ceras, compostos aromáticos de baixa massa molar e uma pequena quantidade de carboidratos, principalmente sacarose, que não foi totalmente extraída no processo de moenda durante o processo de extração do caldo (ANTONIO et al., 2014; MASARIN et al., 2011).

As cinzas são constituídas principalmente por compostos inorgânicos como sílica, potássio, cálcio, alumina, magnésio, fosforo e óxido de ferro. No entanto, o teor de cinzas depende em grande parte da variedade da planta, tipo de solo, método de fertilização, tipo de colheita (mecânica ou manual) e presença de materiais inorgânicos coletados juntos com os colmos da cana durante a colheita (ANTONIO et al., 2014)

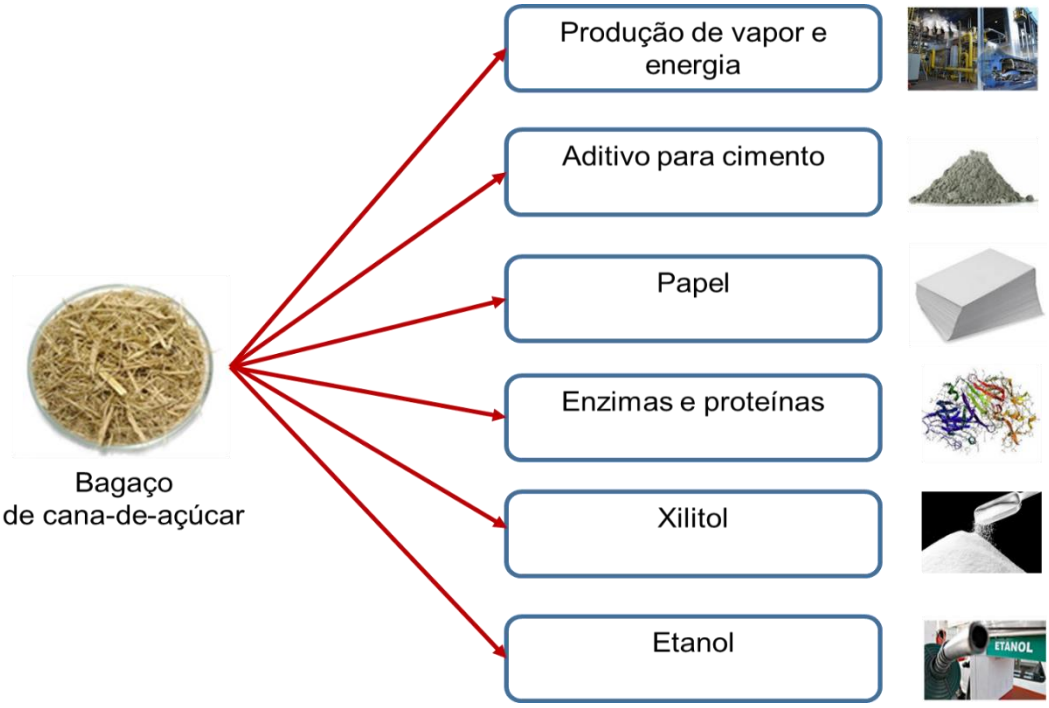
As características tanto físicas como químicas do bagaço influenciam diretamente em seus usos potenciais e é essencial para o desenvolvimento e desenho de processos e equipamentos (ANTONIO et al., 2014).

2.2.3 Usos potencias do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana de açúcar é uma matéria-prima com diversas aplicações e se considera um substrato ideal em processos microbiológicos para a produção de produtos com valor agregado como se apresenta na Figura 2.13 (PANDEY et al., 2000).

O bagaço de cana tem valor calorifico em torno de 8000 kj/kg (BATRA; URBONAITE; SVENSSON, 2008) e é tradicionalmente nas usinas de açúcar e álcool usado como combustível das caldeiras que compõem o sistema de cogeração. O vapor produzido é utilizado para aquecimento e geração de energia elétrica, atendendo o suprimento energético da própria usina (AMAVEDA; LOZANO, 2003). Mesmo sendo amplamente usado para. geração de vapor, ainda há sobras de bagaço nas usinas, e estas tem optado por vender a energia excedente às concessionárias de energia elétrica (HOFSETZ; APARECIDA, 2012).

Figura 2.13 - Usos potenciais do bagaço de cana-de-açúcar



Fonte: Autor

Outro potencial uso do bagaço se refere as cinzas, as quais podem ser empregadas como aditivo mineral na produção de cimento, onde atuam como agente pozolânico. O cimento Portlant substituído com até um 20% com as cinzas do bagaço, presentou propriedades mecânicas similares ao cimento comercial. Este uso tem a vantagem de diminuir custos de produção, sem afetar a qualidade final do concreto (CHUSILP; JATURAPITAKKUL; KIATTIKOMOL, 2009).

O bagaço de cana pode ainda ser utilizado na produção de papel, pois é um material que contem em entorno de 70% de fibra a qual está composta por níveis aceitáveis de α-celulose uteis para a fabricação deste produto. O papel feito a partir de bagaço de cana apresenta um menor coeficiente de flexibilidade, maior índice de rasgo e baixo índice de torção. Estas características são adequadas para a fabricação de papel de impressão, papel absorvente, papel de saco de chá e papel de germinação de sementes (AGNIHOTRI; DUTT; TYAGI, 2010).

A traves de processos biotecnológicos e utilizando o bagaço de cana como matéria-prima, se podem obter diversos produtos de valor comercial como: Enzimas tais como celulases (endoglucanases, β-glicosidase) hemicelulases (xylanases) (CAMASSOLA; DILLON, 2009), proteínas com aminoácidos essências para alimentação animal (NIGAM,

2000), edulcorante para a indústria alimentaria (xilitol) (ROBERTO et al., 1991a) e etanol como biocombustível (ROBERTO et al., 1991b).

O etanol é um combustível limpo e renovável, considerado uma das alternativas para substituir o combustíveis fosseis (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). Embora o equivalente energético do etanol seja 68% menor do que a gasolina, a combustão do etanol contem oxigênio o que faz a emissão de substâncias tóxicas seja menor (KOZYUKOV; LAPIDUS, 2008). O uso de bioetanol como combustível de transporte também pode ajudar na redução do acúmulo de CO_2 em duas formas: 1) deslocando o uso de combustíveis fósseis e 2) reciclando o CO_2 que é liberado quando é queimado como combustível. Ao utilizar o bioetanol em vez de combustíveis fósseis, as emissões resultantes do uso de combustíveis fósseis são evitadas e o teor de CO_2 dos combustíveis fósseis permanece armazenado. Além a queima do etanol em vez da gasolina reduz as emissões de carbono em mais de 80%, ao mesmo tempo que elimina totalmente a liberação de dióxido de enxofre causador de chuva ácida (LASHINSKY; SCHWARTZ, 2006).

Os maiores produtores de etanol no mundo são os Estados Unidos e o Brasil, sendo estes dois países os responsáveis por 83% da produção mundial deste biocombustível (RFA, 2015). Em quanto que nos Estados Unidos empregam o milho como matéria-prima, a produção de etanol brasileira, está baseada em processos bem estabelecidos empregando a cana de açúcar como matéria-prima, ambos os processos empregam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente biológico de fermentação, o etanol produzido a partir dos açúcares provenientes de matérias-primas açucaradas ou amiláceas se denomina etanol de 1ª geração (JONKER et al., 2015).

Devido aos excedentes de bagaço nas usinas, esta biomassa tem sido apontada como matéria-prima em potencial para ser transformada em etanol configurando-se como um processo de 2ª geração, devido a que os açúcares fermentescíveis são de origem de biomassa lignocelulósica (PANDEY et al., 2000). De acordo com DIAS et al. (2012), a integração de tecnologias de primeira e segunda geração para a produção de etanol, poderia melhorar a sustentabilidade e a economia do processo, uma vez que a oferta deste combustível poderia ser aumentada sem exigir um aumento proporcional das áreas de plantio de cana, e com a vantagem de um aproveitamento integral desta biomassa.

Da mesma forma que os outros materiais lignocelulósicos, a tecnologia empregada para a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, consiste em várias etapas complexas que envolvem; 1) pré-tratamento da biomassa 2) sacarificação enzimática dos

polissacarídeos 3) fermentação dos açúcares e 4) destilação do etanol (CANILHA et al., 2012).

2.3 Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica

A produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas, requer que seus polissacarídeos (celulose e/ou xilana) sejam primeiramente convertidos nos respectivos açúcares monoméricos, os quais serão o substrato dos microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação (MART; KLINKE; BELINDA, 2007). A hidrólise ou sacarificação enzimática é uma forma promissora para a obtenção destes açúcares, e nesta etapa se empregam condições brandas de reação com pH na faixa de 4,8-5,0 e temperaturas entre 45-50 °C, o que evitaria problemas de corrosão nos equipamentos e além disso, há uma baixa ou nula formação de produtos tóxicos que possam inibir os microrganismos (CANILHA et al., 2012).

A hidrólise por meio da ação de enzimas, se vê bloqueada pela presença física da lignina, limitando a acessibilidade das enzimas ao substrato (MOONEY et al., 1998); além disso, podem produzir ligações improdutivas entre as enzimas e a lignina (absorções não especificas). Estes dois mecanismos tem demostrado ter um efeito negativo na sacarificação enzimática das biomassas lignocelulósicas (BERLIN et al., 2006; WANG; LAN; ZHU, 2013). Segundo Sun e Cheng, (2002), a cristalinidade própria da estrutura da celulose, representa um obstáculo extra no processo, por este motivo, para aumentar a eficiência durante o processo de sacarificação, é necessário de um pré-tratamento a biomassa lignocelulósica.

A etapa de pré-tratamento é o processo mediante o qual se procura principalmente remover lignina e/ou hemicelulose e alterar a estrutura da celulose fornecendo um material com caraterísticas favoráveis para a sacarificação enzimática. No entanto, para que um pré-tratamento seja efetivo deve-se ainda evitar a degradação ou a perda de carboidratos durante o processo, assim como a formação de subprodutos inibidores dos processos subsequentes de sacarificação e fermentação, por último ser econômico (KUMAR; WYMAN, 2009). Os diferentes métodos de pré-tratamentos aplicados na biomassa lignocelulósica podem-se agrupar em 4 categorias que são: biológicos, físicos, químicos ou físico-químicos (SUN; CHENG, 2002).

O pré-tratamento biológico é associado com a ação de fungos, principalmente de decomposição parda e branca que são capazes de produzir enzimas que degradam e modificam a composição química da biomassa. Geralmente, os fungos de composição parda degradam essencialmente a hemicelulose, enquanto que os fungos de composição branca degradam os componentes da lignina (SÁNCHEZ, 2009). O pré-tratamento físico, tais como a moagem, e a pirólise, são usados principalmente para aumentar a área superficial das fibras e diminuir tanto a cristalinidade quanto o grau de polimerização da celulose (SUN E CHENG 2002). Já o tratamento químico, incluindo os métodos que utilizam ácidos, álcalis, solventes orgânicos e líquidos iônicos, se caracterizam por melhorar a digestibilidade da celulose e também reduzir a cristalinidade e grau de polimerização da mesma, devido a remoção da lignina e/ou hemicelulose produzida pela reação com sustâncias químicas (AGBOR et al., 2011). Por último, o pré-tratamento físico-químico, que inclui os procedimentos que combinam os métodos físicos e químicos, tais como a explosão a vapor com ou sem adição de catalisadores (H_2SO_4, SO_2 ou CO_2); explosão com amônia líquida (AFEX); oxidação úmida, micro-ondas, ultra-som (ALVIRA et al., 2010) e químico-termomecânico com sulfito em meio alcalino ou ácido (MENDES et al., 2013; ZHU et al., 2009).

Dentre os pré-tratamentos mencionados na categoria dos físico-químicos destaca-se o tratamento com sulfito, o qual pode ser realizado em meio alcalino ou ácido (MENDES et al., 2011; Li et al., 2012). Este pré-tratamento é conhecido por sua eficácia na despolimerização de carboidratos e por sua excelência na deslignificação, ainda sub condições ácidas as quais além solubilizam hemicelulose (ZHU et al., 2015).

Zhu et al., (2009), baseados no processo de polpação com sulfito em madeira, empregado para a produção de polpa de celulose, estabeleceram um processo novo que denominaram SPORL, por suas siglas em inglês que significam “Sulfite Pré-treatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulosic” com o objetivo de desconstruir a parede celular de biomassas lignocelulósicas e posteriormente converter eficientemente os polissacarídeos em seus respectivos açúcares monoméricos através de sacarificação enzimática visando a produção de etanol.

No pré-tratamento com SPORL, a biomassa é impregnada com uma solução que pode ser composta por sulfito, bisulfito, dióxido de enxofre ou uma mistura de dois ou três destes reagentes. O dióxido de enxofre pode ser substituído também por um reagente ácido (ácido sulfúrico, ácido hidroclorídrico, ácido oxálico ou ácido acético), após cozimento a mistura (biomassa+ solução de impregnação) é filtrada e os sólidos retidos são refinados para a

redução de tamanho, logo a biomassa é lavada para seu posterior sacarificação enzimática, e os açúcares obtidos são utilizados no processo fermentação para a produção de etanol (ZHU et al., 2009). No estudo de Zhu e colaboradores (2009) empregando o pré-tratamento SPORL em cavacos de madeira de abeto, concluíram que sob condições de uma carga de bisulfito entre 8 e 10% m/m e uma carga de ácido sulfúrico entre 1,8 e 3,7% m/m a uma temperatura de 180°C por 30 minutos, se atingiu quase completa separação da hemicelulose e parcial remoção e sulfunação da lignina (20-30%).Segundo os autores o material apresentou características favoráveis para o processo de refino, como também para o processo da hidrólise da celulose, que atingiu cerca de 90% de conversão. Além da madeira, o pré-tratamento SPORL tem demostrado diminuir essa limitação a desconstrução da parede celular em diversas matérias primas lignocelulósicas, como cachos de fruto vazio de palma (CHENG et al., 2014) colmos de milho (LIU, 2011) e palha de arroz (YANG et al., 2013).

O pré-tratamento com sulfito alcalino, ao contrário do processo SPORL, não emprega ácidos como reagentes, e tem sido apontado como um método eficiente para melhorar a digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar (MENDES et al., 2013). No pré-tratamento com sulfito alcalino a biomassa também é impregnada primeiramente com uma solução de sulfito de sódio (Na_2SO_3 10% m/m) e hidróxido de sódio (NaOH 5% m/m) para cozimento em autoclave a 120 °C, 1 atm. por 120 min. Os sólidos posteriormente são lavados com agua até pH neutro e desfibrilados com um refinador de discos (MENDES et al., 2011). Em um estudo realizado por Mendes et al., (2011) utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino promovem a remoção parcial da hemicelulose (29%), bem como, a modificação e remoção parcial da lignina (50%), aumentou a capacidade de retenção de agua das fibras provocando seu inchamento e forneceu um material mais homogêneo e com maior área superficial para a hidrolises enzimática. Após 96 horas de sacarificação enzimática empregando o extrato enzimático de Celluclast (8,8 FPU/g de biomassa) suplementado com Novozyme 188 (13,3 UI/g de biomassa), os autores obtiveram uma conversão de celulose e hemicelulose de 85% e 70%, respectivamente, demostrando a efetividade do processo com respeito ao bagaço não tratado, no qual apresentou uma conversão de celulose de 15% e de hemicelulose 5%. Além disso, os autores observaram que há uma correlação entre eficiência na conversão da celulose e a remoção da lignina e hemicelulose, pelo que para ter incrementos significativos na eficiência de conversão de celulose, mínimo durante o pré-tratamento com sulfito alcalino se devem atingir uma remoção de lignina entre 40 e 50% e uma remoção de hemicelulose entre 18 e 25%.

Em outro estudo Mendes et al., (2013) avaliaram o efeito do tempo de cozimento (30 a 120 minutos) do pré-tratamento com sulfito alcalino no bagaço de cana-de-açúcar. Os autores observaram que nos primeiros 30 minutos já se atinge uma remoção de 53% de lignina e 30% de hemicelulose e menos de 14% de celulose. Os autores também avaliaram o rendimento de conversão da celulose de cada uma das amostras pré-tratadas nos diferentes tempos e observaram que após 96 horas de reação, a eficiência na conversão da celulose aumentou de 64% para 92%, conforme aumentava o tempo de cozimento de 30 para 120 minutos.

A segunda etapa para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é a sacarificação enzimática. Neste processo para hidrolisar a fração celulósica, requer três classes de enzimas celulolíticas (celulases): (1) endo-β-1,4-glucanases (EG, E.C. 3.2.1.4) que ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose, criando extremidades de cadeia livres; (2) celobio-hidrolases ou exoglucanase (CBH, E.C. 3.2.1.91) que degrada a molécula adicionalmente removendo unidades de celobiose das extremidades de cadeia livres; (3) β-glucosidases (E.C. 3.2.1.21) que hidrolisa celobiose para produzir glicose (SUN; CHENG, 2002). Para desagregar a hemicelulose, são necessárias várias enzimas, tais como xilanase, β-xilosidase, glucuronidase, acetilesterase, galactomannanase e glucomananase (DUFF, S. J;MURRAY, W. D,1996). As enzimas celulases quando atuam em conjunto com xilanases exibem um melhor rendimento de hidrólise devido à ação sinérgica de enzimas (GIESE, C, et al.,2011).

Para a sacarificação a partir de materiais celulósicos, a remoção da lignina melhora significativamente a digestibilidade do substrato. Além disso, devido ao menor teor de lignina, as cargas enzimáticas podem ser consideravelmente reduzidas. No entanto, as extensas remoções de lignina no pré-tratamentos aumentam o custo dos processos (CANILHA et al., 2012). Embora o preço da enzima tenha diminuído devido as intensivas pesquisas para melhorar sua produção, a carga de enzimas durante a hidrólise da celulose deve ser minimizada, uma vez também aumenta os custos de produção de etanol celulósico. Assim, encontrar caminhos para reduzir as cargas de celulase seria particularmente eficaz na diminuição dos custos do processo. A fonte de enzima tem também um efeito importante na eficiência da hidrólise. Portanto, a compreensão da interação entre as celulases e a biomassa pré-tratada é de vital importância para desenvolver, de forma efetiva, um pré-tratamento de baixo custo, que podem levar a uma produção competitiva do etanol (CANILHA et al., 2012).

A fermentação é um processo biológico onde os açúcares são convertidos em etanol e dióxido de carbono (CO2) pela ação de microrganismos. Neste processo são comumente empregadas as leveduras, dentre as quais se destaca a espécie *Saccharomyces cerevisiae* pela sua elevada eficiência fermentativa, altas velocidades e tolerância as condições de estresse impostas pelo próprio processo (BASSO et al., 2008). Uma vez que os hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de biomassas lignocelulósicas dependendo do pré-tratamento empregado, pode conter hexoses além de outros açúcares fermentescíveis especialmente pentoses, oriundos da hemicelulose. Existe uma limitação na utilização da *S. cerevisiae* para fermentar pentoses devido à ausência de genes requeridos para assimilar estas moléculas (HECTOR et al., 2011).

Segundo Kim et al., (2013) a viabilidade econômica do processo de produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos requer a eficiente e rápida conversão de todos seus açúcares. Uma vez que a fermentação da xilose poderia decrescer o custo de produção em um 25% (HINMAN et al., 1989). Neste contexto, um esforço substancial de engenharia metabólica tem sido dirigido para o desenvolvimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de fermentar tanto as hexoses (principalmente D-glicose) como as pentoses (principalmente D-xilose e L-arabinose) presentes em hidrolisados a partir de biomassas lignocelulósicas (CHU; LEE, 2007).

Silva et al., (2010), comparou a produção de etanol de dois cepas *S. cerevisiae*, uma natural (IR-2) e outra geneticamente modificada para assimilar xilose (MA-R4) a uma temperatura de 30°C empregando como meio de fermentação hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratada fisicamente com moinhos de bolas contendo uma mistura de glicose (28,9 g/L) e xilose (16,9 g/L). Nestas condições os autores observaram que a levedura IR-2 não consumiu a xilose e esgotou a glicose do meio nas primeiras 4 horas de cultivo, produzindo uma concentração de etanol de 13,7g/L com uma eficiência de 89,8 e 56,5% considerando só glicose e a totalidade dos açúcares, respectivamente após 24 horas de cultivo. No entanto a cepa MA-R4 além de glicose também consumiu a xilose do meio após 48 horas de cultivo, atingindo uma maior concentração (17,8 g/L) e um rendimento na produção etanol de 82%, a qual foi 45% comparada com a IR-2 considerando a totalidade dos açúcares no meio.

Embora leveduras naturais da espécie *S. cerevisiae* não assimile xilose, as cepas comercias são culturas de baixo custo e grande disponibilidade (BASSO et al.,2008). Porém

são uma boa alternativa para a fermentação das hexoses dos hidrolisados a partir de biomassa (BASSO). Em um estudo realizado por Mesquita; et al., (2016) avaliou a fermentabilidade da levedura *S. cerevisiae* comercial no hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino em diferentes cargas de sulfito de sódio (4 a 8% m/m) e hidróxido de sódio (2 a 4% m/m), em um processo de pré-sacarificação e fermentação simultânea. Os autores observaram que com o incremento da carga, a liberação de açúcares foi beneficiada e consequentemente os valores de eficiência de etanol variaram de 25 a 56%, obtendo-se o melhores valor de eficiência (56%), na condição de pré-tratamento, de 8% m/m de sulfito de sódio e 4% m/m de hidróxido de sódio.

Além de *S. cerevisiae* existem outras espécies de levedura como *Kluyveromyces marxianus*, a qual é conhecida por sua capacidade de assimilar uma mistura de açúcares (Wilkins et al., 2008, Zhang et al., 2010), incluindo xilose (BANAT et al., 1998, WILKINS et al., 2008). Segundo a literatura, esta levedura apresenta elevado potencial em produzir etanol a partir de glicose (CASTRO; ROBERTO, 2014), e xilitol a partir de xilose (SANTOS, 2015). Além, de apresentar a maior velocidade específica de crescimento entre os eucariontes (GROENEVELD et al. 2009).

A levedura *K. marxianus* é uma espécie mesófila, que apresenta em geral uma temperatura ótima de crescimento entre 25 e 37 °C. No entanto, é capaz de crescer em altas temperaturas, sendo considerada termotolerante, como um crescimento considerável na faixa de temperatura entre 25 a 52°C (FONSECA et al., 2008; DUNLAP et al. 2010).O interesse na utilização de K. marxianus tem sido impulsionado por suas aplicações biotecnológicas, principalmente devido às características de termotolerância e taxa de crescimento elevada (STEENSMA et al. 1988; BELLAVER et al., 2004).Novas pesquisas para garantir a utilização desta levedura em processos industriais é necessária, para uma compreensão mais ampla da fermentação em hidrolisados derivados de biomassas vegetais.

A linhagem termotolerante de *K. marxianus* (NRRL Y-6860) selecionada no Laboratório de Fermentação I da Escola de Engenharia de Lorena, é capaz de fermentar glicose a etanol em processo de SSF com produtividades comparáveis à *S. cerevisiae* a 30°C. No entanto, apenas a *K. marxianus* se mostrou eficiente na faixa de temperatura ótima para atuação das enzimas celulolíticas (CASTRO; ROBERTO, 2014). Esta linhagem foi então apontada como promissora para a aplicação a partir da biomassa lignocelulósica empregando a estratégia sacarificação e fermentação simultânea devido aos elevados valores de produtividade

volumétrica total em etanol (Q_P = 2,69 g/L.h) obtidos a partir da celulignina de palha de arroz.

A levedura *S. stipitis* também produz etanol a partir de glicose e outra variedade de açúcares como galactose, manose, xilose e celobiose com altos rendimentos de etanol e baixas quantidades de xilitol (DU PREEZ et al., 1986). No entanto estudos tem demonstrado que em meios de fermentação contendo uma mistura de glicose e xilose, e a concentração de glicose no meio estiver acima de 20 g/L, ocorre a repressão metabólica da xilose, visto que este açúcar participa do sistema de transporte de baixa afinidade desta levedura. Segundo Agbogbo et al., (2006) em meios contendo baixas concentrações de glicose, a xilose pode ser fermentada pela *S. stipits*, sendo assim a glicose o açúcar preferencial na produção de etanol por esta levedura.

Além do tipo de açúcar, os nutrientes presentes no meio de fermentação também possuem papel importante na produção de etanol por *S. stipitis*. Estudos com *S. stipitis* NRRL Y-7124, utilizando meio enriquecido com nitrogênio, vitamina, aminoácidos, purinas e pirimidinas, mostraram que estes componentes podem aumentar a produção de etanol (Slininger et al., 2006). Segundo Guebel et al., (1992) a adição de aminoácidos e nitrogênio, possibilita o aumento da produção de etanol não associado ao crescimento em leveduras da espécie *S. stipitis*, Enquanto que a adição de sais de amônio, aumenta a produtividade em etanol e o rendimento em biomassa de (AGBOGBO e WENGER 2006). Quanto a adição de magnésio, baixos níveis desse metal, possibilita a acumulação de xilitol (MAHLER e NUDEL 2000).

Outro fator que influencia a fermentação de açúcares por *S. stipitis* é a condição de aeração, segundo Du-Preez, (1994), este é um dos fatores ambiental mais importante na fermentação de xilose por leveduras, uma vez que determina a partição do substrato de fluxo de carbono entre o crescimento e a formação do produto. Um estudo realizado por Silva; Mussatto e Roberto, (2010) avaliou o efeito da agitação (100,150 e 200 rpm) e aeração (ração volume de frasco erlemneyer/volume do meio na faixa de 2,5 a 5) na produção de etanol pela levedura *S. stipitis* Y-7124 em hidrolisado de palha de arroz pré-tratada em condições ácidas. Os autores observaram que a areação/agitação afeitaram significativamente o fator de conversão de substrato em etanol, e determinaram que as melhores condições para *S. stipitis* Y-7124 atingir os valores mais altos de $Y_{P/S}$ de 0,37 g/g é na condição de ração volume de frasco /volume de meio de 2,5 e agitação de 200 rpm.

Estudos tem demonstrado o potencial da levedura *S. stipitis* para a produção de etanol em hidrolisados a partir de biomassa lignocelulósica, como no bagaço de açúcar. Um estudo realizado por Cortez, et al.2014, avaliou a fermentabilidade do hidrolisado celulósico a partir de híbridos de bagaço de cana-de-açúcar com baixo teor de lignina, empregando a levedura *S. stipitis*Y-7124 a uma temperatura de 30°C. Os autores observaram que em todos os ensaios, a levedura apresentou um consumo de glicose similar, notando uma fase lag nas primeiras 4 horas de cultivo seguido de uma fase decaimento até 12 horas. A produção de etanol entre as amostras variou de uma concentração de 0,6 a 10 g/L, e se atingiram valores de fator de conversão de substrato em etanol entre 0,29 e 0,34 g/g. Os autores também notaram que nos híbridos de cana de açúcar (87 e 140) os quais tinham apresentado maior teor de lignina e hemicelulose, mostraram os menor valores de produtividade volumétrica em etanol entre as amostras (<0,6g/L.h), segundo os autores estes baixos valores poderiam estar relacionado com a presença de substancias aromáticas, principalmente compostos fenólicos provenientes da lignina residual durante a hidrólises enzimática.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral, avaliar a fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino por leveduras visando a produção de etanol. Para atingir o objetivo do projeto, as seguintes etapas foram cumpridas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o bagaço de cana de açúcar, pré-tratado com sulfito alcalino.
- Avaliar o efeito do tipo e carga de enzima sobre a eficiência da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (material lavado e não lavado).
- Avaliar a fermentabilidade dos hidrolisado enzimáticos obtidos (lavado e não lavado), empregando como modelo fermentativo a levedura *Kluyveromyces marxianus.*
- Avaliar o efeito da adição de nutrientes e da temperatura sobre a fermentabilidade do hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado (não lavado), com as leveduras *K. marxianus. S. cerevisiae e S. stipitis*
- Avaliar o efeito da adição de glicose no hidrolisado enzimático obtido sobre o perfil fermentativo das leveduras *K. marxianus, S.cerevisiae e S. stipitis*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação I e no Laboratório de Ciências da Madeira do Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).

4.1 Matéria-prima

Foi utilizado como matéria-prima o bagaço de cana-de-açúcar fornecido pela usina Vale Filial Onda Verde /SP. Após recebimento, o material foi secado naturalmente ao ar até chegar a um teor de umidade de aproximadamente 12%. Após pesagem, o bagaço foi estocado em sacos plásticos e armazenados em um local seco e fresco à temperatura ambiente até realização dos experimentos.

4.2 Caracterização química do bagaço

A caracterização química do bagaço "*in natura*", e pré-tratado com sulfito alcalino tanto lavado como não lavado foram feitas de acordo a metodologia descrita no protocolo padrão do *National Renewable Energy Laboratory* (SLUITER et al., 2004). Cerca de um grama (1 g massa seca) do bagaço moído (25 mesh) foram primeiramente submetidos a um processo de extração com agua por um período de 12 horas aproximadamente e depois com etanol a 95% por um período de 6 h, em um aparelho Soxhlet. Após a realização do procedimento de extração, o material foi seco em temperatura ambiente. Em seguida, 300 mg da amostra foram colocados em tubos de ensaio e hidrolisados com 3 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 (72% p/p) a 30 °C por 1 h. O material pré-hidrolisado foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 84 ml de água destilada, para posterior autoclavagem à 121º C, 1 atm, por 1 h. Após resfriamento a mistura foi filtrada em filtro de vidro poroso n°3, e o sólido retido foi seco em estufa a 105°C até massa constante para determinação da lignina insolúvel por gravimetria. O líquido filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e completado com agua destilada até atingir seu volume. O conteúdo do balão foi utilizado para determinação da lignina solúvel por espectrofotometria

a 205 nm com espectrofotômetro UV visível (Hitachi 1800), e a concentração em g/L dos açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ítem 4.6.4.

Para determinar o teor de cinzas presentes no bagaço de cana, aproximadamente 1 g de amostra foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado e mantidos em mufla por 3 horas a temperatura de 575°C. O processo de calcinação consistiu em aquecer a amostra a 105°C por 12 minutos, depois a uma temperatura de 250°C por 30 minutos, e por último a uma temperatura de 575°C por 180 minutos. Após resfriamento em dessecador por 30 minutos, o material calcinado foi quantificado quanto teor de cinzas por gravimetria, a partir da diferença entre a massa inicial da amostra e a massa final de amostra calcinada (SLUITER et al., 2008).

Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados experimentais foram apresentados como a média dos valores obtidos. Também foram calculados os desvios padrão para medir o grau de dispersão dos dados em relação ao valor da média.

4.3 Pré-tratamento com sulfito alcalino

O pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar foi realizado segundo a metodologia descrita por Mendes et al., (2013) da seguinte maneira: cerca de 600 g de bagaço (massa seca) foram colocados em um reator de aço inox de 16 L, e com auxílio de uma bomba de vácuo acionada por 30 minutos foi retirado o ar, para uma melhor impregnação da solução no bagaço, e porem obter melhor uniformidade na deslignificação. Paralelamente, foram preparados 6 L de uma solução de sulfito alcalino contendo 0,5% m/v de NaOH e 1% m/v de Na_2SO_3. Sem desligar a bomba de vácuo, e com ajuda de uma mangueira situada na tampa, a solução sulfito alcalino foi transferida para o reator que continha os 600 g de bagaço. A bomba de vácuo foi deixada acionada por mais 15 minutos, e com ajuda de um bastão o bagaço foi homogeneizado para melhor impregnação da solução sulfito alcalino. Em seguida, o reator foi fechado e transferido para dentro de uma autoclave para realização da etapa de cozimento a 121°C, por 120 minutos. Após esta etapa, o reator foi resfriado com água gelada, e a biomassa foi retirada para filtração a vácuo através de uma tela de nylon colocada em um funil de Büchner. O licor resultante foi coletado em uma garrafa plástica e

armazenado a uma temperatura de 4°C, e o sólido retido foi lavado a vácuo com agua (aproximadamente 20 L que foram descartados) até o filtrado atingir pH 7. O sólido lavado foi transferido para uma sacola de lona e centrifugado a 2800 rpm, por 30 minutos em uma centrífuga de roupas (Consul).

O líquido resultante da centrífuga foi quantificado e completado com agua até obter 10 L, e adicionados ao bagaço. Esta suspensão, foi transferida imediatamente para o refinador, onde foram adicionados mais 15 L de água para um volume total de 25 L, e assim obter uma consistência de 2,4% (m/v) (condição adequada de operação do refinador). A mistura foi refinada no aparelho Regmed MD-300 com um espaço de disco de 0,1 mm e um consumo de energia de 250 W. O material desfibrado obtido foi filtrado a vácuo através de uma tela de naylon colocada no funil Büchner, o líquido resultante foi recirculado três vezes para reter os finos. A torta resultante foi fragmentada e espalhada em bandejas, para secagem natural ao ar (não solar) até chegar a um teor de umidade de aproximadamente 10%. O material foi então, pesado e estocado em recipientes de plástico à temperatura ambiente até seu uso nos experimentos subsequentes.

Para avaliar a influência da lavagem do material nas etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação, o pré-tratamento foi repetido omitindo a etapa de lavagem. Para isso, após o cozimento em autoclave, o bagaço junto com o licor sulfito alcalino (6 L) foi completado com 4 L de água, e a mistura foi transferida para o refinador onde foram adicionados mais 15 L de água para atingir um volume total de 25 L e assim ter 2,4% de consistência (m/v) que é a condição adequada de operação no refinador. O refino e as etapas subsequentes foram feitas da mesma forma descrita anteriormente para o material lavado. Assim foram obtidos dois tipos de materiais, um bagaço de cana pré-tratado lavado (BPL) e outro não lavado (BPNL).

4.4 Hidrólise enzimática

4.4.1 Avaliação do tipo e carga do extrato enzimático sobre o rendimento de conversão da celulose e xilana do bagaço de cana pré-tratado

Para determinar as melhores condições de conversão enzimática dos componentes (glucana e xilana) presentes no bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, foram

avaliados dois tipos de extratos enzimáticos: 1) Cellubrix® suplementado com β-glicosidase (Novozyme 188) e 2) Cellic®Ctec2, ambos da empresa Novozymes (Dinamarca). As cargas avaliadas para o extrato de Cellubrix® foram 5,10 e 15 FPU/g de biomassa suplementada com 10, 20 e 30 UI de β-glicosidase/g de biomassa respectivamente. Esta mistura de enzimas correspondeu a 9, 18 e 27 FPU/g de biomassa. Para o extrato de CellicCtec2 foi avaliado as cargas de 5, 10 e 15 FPU/g de biomassa. Os ensaios empregando ambos os extratos foram realizados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Planejamento fatorial 2^2 para avaliação no efeito do tipo e carga enzimática na hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado.

Ensaios	Variável codificada		Variável real	
	Tipo de extrato enzimático	Carga enzimática (FPU/g de biomassa)	Tipo de extrato enzimático	Carga enzimática (FPU/g de biomassa)
1	-1	-1	A	5
2	1	-0,6	B	9
3	-1	-0,1	A	15
4	1	1	B	27
5	0	-0,54	A	10
6	0	0,18	B	18
7	0	-0,54	A	10
8	0	0,18	B	18

A= CellicCtec2; B= Cellubrix + 188

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 25 mL de volume final, com 8% (m/v) de bagaço pré-tratado suspendido em tampão citrato de sódio 50 mM para um pH de 4,8. As reações foram conduzidas em um banho termostatizado (Thermo scientific MaxQ™ 7000) a 45°C, sob agitação rotatória de 100 rpm. Nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas, foram retiradas amostras de 1 mL de cada frasco, as quais foram colocados em tubos Falcon de 15 ml. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram fervidas por 5 minutos, para desnaturar as enzimas e paralisar a reação.

Após centrifugação da mistura, a 3800 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de glicose e xilose por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento Agilent Tecnologies 1260 infinity (item 4.6.4). Os

hidrolisados enzimáticos resultantes foram transferidos para tubos Falcon de 50 mL e congelados até a realização dos experimentos posteriores. Os experimentos foram feitos em triplicata e apresentados como a média dos valores obtidos. Também foram calculados os desvios padrão para medir o grau de dispersão dos dados com relação ao valor da média.

4.5 Fermentação

4.5.1 Micro-organismo

Foram utilizados como micro-organismos fermentativos, a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 obtidas da Coleção de Culturas ARS, do *United States Department of Agriculture* (USDA),Peoria, Illinois, EUA. Foi também utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, cedida gentilmente pela Professora Sandra Regina Ceccato-Antonini da UFSCAR Araraquara. As culturas de leveduras foram mantidas em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinados e conservada a 4 °C.

4.5.2 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados por meio da transferência de uma alçada das células, recém repicadas, para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de um meio semi definido contendo: 30,0 g/L de glicose, e uma solução de nutrientes composta por 2,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4, 0,3 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 5,0 g/L de extrato de levedura (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009). Os nutrientes foram preparados em uma solução concentrada 25 vezes, que foi esterilizada a 121 °C por 20 minutos. Após inoculação dos meios, os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30 °C, com agitação de 150 rpm por 16 horas. Após este tempo as suspenções celulares foram homogeneizados para leitura de DO. Para isto, cerca de 1ml de amostra foi diluida 50 vezes e o valor da absorbância foi utilizado na curva de peso seco (item 4.6.8) a qual relaciona DO (nm) e concentração de células (mg/mL). A partir dos dados foi calculado o volume de

suspenção necessário para inocular o meio a afim de se obter uma concentração inicial de células de 1g/L. O volume de suspenção das células foram então centrifugadas a 3400 rpm por 20 minutos e os pellets foram resuspensas no próprio hidrolisado enzimático a ser fermentado.

4.5.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL)

Nesta etapa foram utilizados os hidrolisados enzimáticos obtidos após 48 horas a partir da Cellubrix + Novozyme 188 na carga de 18 FPU/g de biomassa conforme descrito no item 4.4.1. Para os ensaios fermentativos, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 48 mL do hidrolisado enzimático (não autoclavado), suplementados com 2 mL da solução de nutrientes empregados durante a preparação do inoculo (item 4.5.2.). Após inoculação com 1 g/L da levedura *K. marxianus*, os frascos foram incubados em uma incubadora shaker (Nova instrumens modelo NI 1712) a 150 rpm, à temperatura de 40 °C por um período de 10 horas. Nos tempos 0; 1,5; 3; 6 e 10 horas foram retiradas amostras de 1 mL de cada frasco, as quais foram colocadas em tubos Falcon de 15 mL e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos em centrífuga centribio modelo 80-2B. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de celobiose, glicose xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento Agilent Tecnologies 1260 infinity (item 4.6.4). Os experimentos foram feitos em duplicata e apresentados como a média dos valores obtidos. Também foram calculados os desvios padrão para medir o grau de dispersão dos dados com relação ao valor da média.

4.5.4 Avaliação do efeito da adição de nutrientes e a temperatura na fermentabilidade de três leveduras no hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado não lavado

O efeito da adição de nutrientes ao hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado não lavado sobre o perfil fermentativo das leveduras *K. marxianus*, *S.cerevisiae e S. stipitis*

foi avaliado em três temperaturas diferentes (30, 35 e 40°C) de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Planejamento fatorial 2^2 para avaliação da adição de nutrientes e da temperatura na fermentabilidade das leveduras *K. marxianus*, *S. cerevisiae* e *S. stipitis* no hidrolizado enzimático

Levedura	Blocos	Variável codificada		Variável real	
		Temperatura °C	Solução de nutrientes	Temperatura °C	Solução de nutriente
K. marxianus	1	-1	-1	30	Não
	1	+1	-1	40	Não
	1	-1	+1	30	Sim
	1	+1	+1	40	Sim
	1	0	0	35	Sim*
	1	0	0	35	Sim*
S. cerevisiae	2	-1	-1	30	Não
	2	+1	-1	40	Não
	2	-1	+1	30	Sim
	2	+1	+1	40	Sim
	2	0	0	35	Sim*
	2	0	0	35	Sim*
S. stipitis	3	-1	-1	30	Não
	3	+1	-1	40	Não
	3	-1	+1	30	Sim
	3	+1	+1	40	Sim
	3	0	0	35	Sim*
	3	0	0	35	Sim*

* Suplementado com a metade da concentração dos nutrientes (2,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4, 0,3 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 5,0 g/L de extrato de levedura)

Para estes ensaios, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 48 mL do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado não lavado, suplementados com 2 mL da solução de nutrientes preparada segundo o item 4.5.2. Para os ensaios sem adição de nutrientes, o hidrolisado foi completado com 2 mL de água destilada esterilizada. Os frascos foram inoculados com 1 g/L da levedura *K. marxianus*, *S.cerevisiae* ou *S. stipitis* e incubados em incubadora shaker (Nova instrumens modelo NI 1712) com agitação de 150 rpm, nas temperaturas de 30, 35 ou 40 °C por um período de 20 horas. Nos tempos 0, 2, 4, 6 18 e 20 horas foram retiradas amostras de 1 mL dos frascos, as quais foram colocadas em tubos Falcom de 15 mL e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos em centrífuga centribio modelo 80-2B. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de celobiose, glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (item 4.6.4)

4.5.5 Avaliação do efeito da adição de glicose do hidrolisado enzimático na fermentabilidade das leveduras *K. marxianus, S.cerevisiae* e *S. stipitis*

Após selecionar a melhor condição de temperatura e nutrientes para cada levedura (item 4.5.4), foi avaliado o efeito da adição de glicose no hidrolisado enzimático não lavado sobre o perfil fermentativo das leveduras estudadas. Para isso, foram pesadas 25 g de D-glicose anidra em pesa filtro e após secagem em estufa a 60°C por 24 horas, o material foi resfriado em dessecador por 30 minutos. Para iniciar o processo de fermentação foram adicionados no hidrolisado enzimático cerca de 3.7g de glicose previamente seca e 2 mL da solução de nutrientes conforme selecionado no planejamento do item 4.5.4. Os frascos foram então inoculados com 1 g/L de células (*K. marxianus, S.cerevisiae* ou *S. stipitis)* e incubadas a 30°C em incubadora shaker (Nova instrumens modelo NI 1712) com agitação de 150 rpm, por um tempo de 20 horas para as leveduras *K. marxianus e S.cerevisiae* e 60 horas *para S. stipitis.* Amostras de 1 mL foram retiradas durante a fermentação e transferidas a tubos Falcom de 15 mL. Na fermentação com *K. marxianus e S.cerevisiae* as amostras foram retiradas nos tempos 0,5,12,16 e 20 horas e na fermentação com *S. stipitis* nos tempos 0,12,21,48 e 70 horas. Após centrifugação das amostras a 2000 rpm por 15 minutos em centrífuga centribio modelo 80-2B, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de celobiose, glicose xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (item 4.6.4).

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Cálculo dos principais componentes do bagaço de cana *In natura* e pré-tratado com sulfito alcalino

Determinação da porcentagem de extrativos

Para o cálculo da porcentagem dos extrativos presentes no bagaço de cana foi utilizada a Equação 1.

$$\% E = \frac{(M_i - M_F)}{M_i} \times 100 \qquad (1)$$

Onde:

E = Porcentagem de extrativos presente no bagaço de cana (%)

M_i = massa seca inicial de bagaço (g)

M_F = massa seca final de bagaço (g)

Determinação da porcentagem de lignina insolúvel:

A porcentagem de lignina insolúvel presente no bagaço de cana foi determinada pela relação entre massa do resíduo sólido insolúvel em ácido e a massa seca de bagaço inicial, conforme apresentado pela Equação 2.

$$\% LI = \left(\frac{M_{SI}}{M_i} \times 100\right) \times f_E \quad (2)$$

Onde:

LI = porcentagem de lignina insolúvel no bagaço de cana (%)

M_{SI} = massa seca do resíduo sólido de lignina insolúvel em ácido (g)

M_i = massa seca inicial de bagaço (g)

f_E = fator de correção dos extrativos 0,94 para o bagaço de cana *"In natura"* e o pré-tratado não lavado (BPNL); 0,96 para pré-tratado lavado (BPL).

Determinação da concentração de lignina solúvel:

Para o cálculo da concentração de lignina solúvel presente no bagaço de cana foi utilizada a Equação 3.

$$\%\ LS = \left(\frac{A_{250} \times d\ \times V_f}{\varepsilon\ \times\ M_i\ \times C_o} \times 100\right) \times f_E \quad (3)$$

Onde:

LS = porcentagem de lignina solúvel no bagaço de cana (%)

A_{250} = absorbância da amostra a 205 nm

d = fator de diluição da amostra

V_f = volume da amostra filtrada e avolumada em balão volumétrico (L)

ε = absortividade da lignina a 205 nm (105 L/g.cm)

M_i = massa seca inicial de bagaço (g);

C_o = caminho óptico da cubeta (1cm)

f_E = fator de correção dos extrativos 0,94 para o bagaço de cana *"In natura"* e o BPNL; 0,96 para o BPL

Determinação do teor de glucana

Para o cálculo do teor de glucana presentes no bagaço de cana foi utilizada a equação 4.

$$\%\ G = \left(\frac{C_g \times V_f \times f_c}{M_i} \times 100\right) \times f_E \quad (4)$$

Onde:

G = porcentagem de glucana presente no bagaço (%)

C_g = concentração de glicose no filtrado (g/L)

V_f = volume da amostra filtrada e avolumada em balão volumétrico (L)

f_c = fator de conversão de glicose em glucana 0,9

M_i =massa seca inicial de bagaço (g)

f_E = fator de correção dos extrativos 0,94 para o bagaço de cana *"In natura"* e o BPNL; 0,96 para o BPL

Determinação do teor de xilana

Para o cálculo do teor de xilana presente no bagaço de cana foi utilizada a equação 5.

$$\% X = \left(\frac{C_x \times V_f \times F_c}{M_i} \times 100\right) \times f_E \quad (5)$$

Onde:

X = porcentagem de xilana presente no bagaço de cana (%)

C_x= concentração de xilose no filtrado (g/L)

V_f = volume da amostra filtrada e avolumada em balão volumétrico (L)

F_c = fator de conversão de xilose em xilana 0,88

M_i= massa seca inicial de bagaço (g).

f_E = fator de correção dos extrativos 0,94 para o bagaço de cana *"In natura"* e o BPNL; 0,96 para o BPL.

Determinação do teor de arabinose

Para o cálculo do teor de xilana presente no bagaço de cana foi utilizada a equação 6.

$$\% A = \left(\frac{C_A \times V_f \times F_c}{M_i} \times 100\right) \times f_E \quad (6)$$

Onde:

A = porcentagem de arabinosil presente no bagaço de cana (%)

C_A= concentração de arabinose no filtrado (g/L)

V_f = volume da amostra filtrada e avolumada em balão volumétrico (L)

F_c = fator de conversão de arabinose em arabinosil 0,88

M_i= massa seca inicial de bagaço (g).

f_E = fator de correção dos extrativos 0,94 para o bagaço de cana *"In natura"* e o BPNL; 0,96 para o BPL

Determinação do teor dos grupos acetil

Para o cálculo do teor de grupos acetil presentes no bagaço de cana foi utilizada a Equação 7.

$$\%\ G_a = \left(\frac{C_{Ga} \times V_f \times F_c}{M_i} \times 100\right) \times f_E \qquad (7)$$

Onde:

G_a= porcentagem de grupos acetil presentes no bagaço de cana (%)

C_{Ga} = concentração de ácido acético no filtrado (g/L)

V_f = volume da amostra filtrada e avolumada em balão volumétrico (L);

F_c= fator de conversão de ácido acético em acetato 0,72

M_i= massa seca inicial de bagaço (g).

f_E = fator de correção dos extrativos 0,94 para o bagaço de cana *"In natura"* e o BPNL; 0,96 para o BPL

Determinação do teor de cinzas

Para o cálculo do teor de cinzas presentes no bagaço de cana foi utilizada a Equação 8.

$$\%\ C_z = \frac{M_{cz}}{M_i} \times 100 \qquad (8)$$

Onde:

C_z = porcentagem de cinzas presentes no bagaço de cana (%)

M_{cz} = Massa de cinzas final (g)

M_i = massa seca inicial de bagaço (g)

4.6.2 Cálculos do rendimento e remoção dos componentes no pré-tratamento

O rendimento do pré-tratamento (RPT) será calculado com base na massa seca do bagaço-de-cana de açúcar de acordo com a Equação 9.

$$\%RPT = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \qquad (9)$$

Onde:

RPT = Rendimento do pré-tratamento (%)

M_f = Massa seca final do bagaço pré-tratado (g)

M_i = Massa seca inicial de bagaço "*In natura*" (g)

A remoção dos componentes (RC) glucana, hemicelulose e lignina foi determinada de acordo com a Equação 10.

$$\%RC = 100 - \left(\frac{T_p \times RPT}{T_n} \times 100\right) \qquad (10)$$

Onde:

RC = remoção dos componentes (%)

T_p = teor do componente no bagaço pré-tratado (%)

RPT = rendimento do pré-tratamento (%)

T_n = teor do componente do bagaço in natura (%)

4.6.3 Cálculos de rendimento de conversão de açúcares

A partir da concentração de glicose e xilose obtida, foi calculado o rendimento de conversão da celulose (RCC) e o rendimento de conversão da xilana (RCX), os resultados foram expressos em porcentagem do rendimento máximo teórico de acordo com a Equação 11 e a Equação 12. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

$$RCC\ (\%) = \frac{\left[\left(C_g \times V_R\right) \times f_c\right]}{m_{cel}} \times 100 \qquad (11)$$

Onde:

RCC = Rendimento de conversão de celulose (%)

C_g = Concentração de glicose na amostra (g/L)

V_R = Volume da reação (L)

f_c= Fator de correção de glicose em celulose 0,9

m_{cel} = Massa inicial de celulose na amostra (g)

$$RCX(\%) = \frac{[(C_x \times V_R) \times f_c]}{m_x} \times 100 \qquad (12)$$

Onde:

RCX = Rendimento de conversão da xilana (%)

C_x = Concentração de xilose na amostra (g/L)

V_R = Volume da reação (L)

f_c = Fator de correção da xilose 0,88

m_x =Massa de xilana inicial na amostra (g)

4.6.4 Determinação dos teores de açúcares, ácido acético e etanol

As concentrações de D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity ou WATERS com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45°C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo do eluente 0,6 ml/min; volume de amostra de 20 µl. Para as análises, as amostras foram primeiramente diluídas com o eluente e armazenadas por 30 minutos em geladeira a 4°C, logo centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos, filtradas em Sep-Pack C_{18} e por último filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE).

4.6.5 Determinação dos teores de furano e fenólicos

As concentrações de furanos (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido furóico) e fenólicos de baixa massa molar (ácidos gálico, vanílico, p-cumárico, siríngico e ferúlico; vanilico, vanilina e pirocatecol) foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity utilizando um detector UV (a 276 nm) e coluna Waters Spherisorb C18 (5 µm ODS2 4,6 x 100 mm) sob as seguintes

condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 μL e detector UV a 276 nm. As amostras as quais deben ter um pH menor a 8 (pH máximo que soporta a coluna), foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 μm (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações destes compostos serão calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.6.6 Determinação da atividade celulósica nos extratos enzimáticos

A atividade de celulases totais foi determinada de acordo com o ensaio de papel de filtro padronizado pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável ("NREL")(ADNEY; BAKER, 1996). Primeiramente foi construída uma curva padrão relacionando massa de glicose com absorbância a 540 nm (Figura 4.1). O método consistiu em preparar uma solução mãe de 10 mg/mL a qual foi diluída até obter concentrações de 1.0 a 3,35 mg de glicose/0,5 mL. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL da solução de glicose (segundo respetiva concentração) e 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Os tubos foram colocados em um banho termostatizado a 45°C e após 1 h de reação foram adicionados 3 mL do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS). Os tubos foram aquecidos por 5 minutos a 100°C e após este tempo foram esfriados em um banho de gelo para paralisar a reação com DNS. Em seguida foram adicionados em cada tubo 20 ml de agua destilada, e a mistura foi agitada em um vortex. A curva padrão de glicose foi obtida a partir das leitura das absorvâncias de cada amostra em espectofotômetro (Hitachi 1800) a um comprimento de onda de 540 nm.

Após obtenção da curva padrão de glicose, foi construída uma curva relacionando a massa de glicose (mg) com o inverso das diluições de enzima em escala logarítmica (Figura 4.2). Para isso, em um tubo de ensaio foi colocado 0,05g de papel Whatman N°1, 1 mL de tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8 e 0,5 ml do extrato enzimático diluído de 100x a 500x. As condições de reação foram as mesmas para a curva padrão de glicose. A partir do valor da absorvância obtida a 540 nm, foi calculada a quantidade de glicose liberada na reação usando a curva padrão de glicose. Foram tomados os dois pontos de dados próximos de 2 mg de glicose/0,5mL (superior e inferior), entre as quais foi traçada uma linha, para obter o

inverso da diluição da enzima que libera exatamente 2 mg de glicose equivalentes. Para calcular a atividade de enzima em FPU/ml foi utilizada a equação 13.

$$A_e = \frac{f_c}{D_e} \qquad (13)$$

Onde:

A_e= Atividade enzimática em unidades de papel de filtro (FPU/ml)

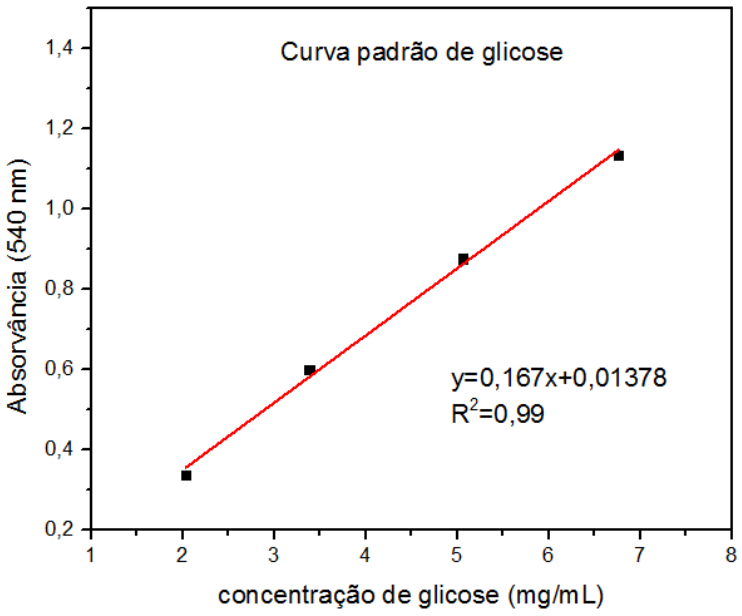
f_c= fator de conversão de 2 mg de glucose equivalentes 0,37

D_e= Inverso da diluição de enzima que libera 2 mg de glicose equivalentes em 0,5 mL

O numerador (0,37) na equação é derivada a partir do fator de conversão do 2,0 mg de glicose-equivalentes gerados no ensaio para mmoles de glicose (2,0 ÷ 0,18016), a partir do volume da enzima a ser testado que é usado no ensaio (0,5 mL), e a partir do tempo de incubação (60 minutos) necessário para a geração dos equivalentes redutores como se apresenta a continuação.

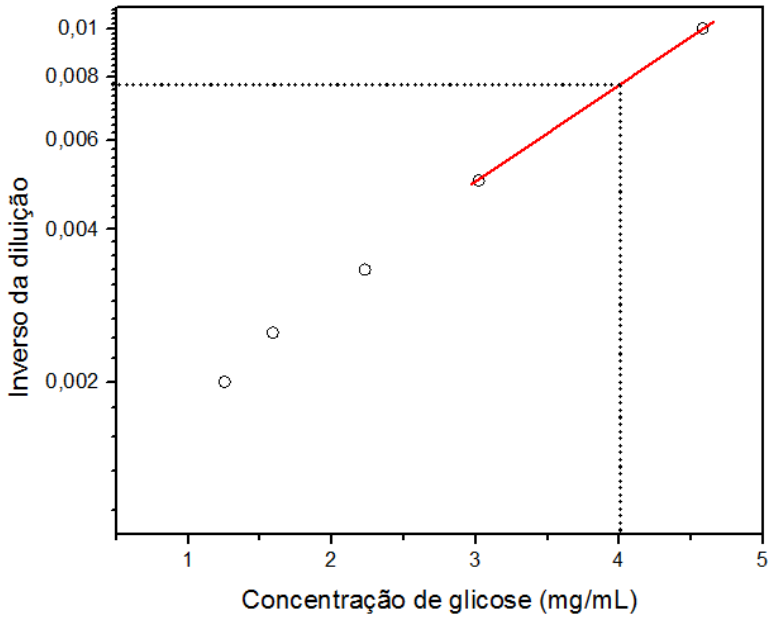
$$\frac{2.0\ mg\ de\ glicose \div 0{,}18016\ mg\ de \frac{glicose}{\mu mol}}{0{,}5\ mL\ da\ \text{diluição}\ \ de\ enzima\ \times 60\ minutos} = {}^{0{,}37\mu mol}/_{min.mL}$$

Figura 4.1- Curva padrão de glicose



Fonte: Autor

Figura 4.2 - Curva que relaciona inverso da diluição de enzima e concentração de glicose produzida



Fonte: Autor

4.6.7 Determinação da atividade enzimática da β-glicosidade

A atividade de β-glicosidase foi determinada segundo Wood e Bhat (1988**).** Primeiramente, foi realizada uma curva padrão com 4-nitrofenol (p-NP), utilizando uma solução na concentração de 2µmol/ml. A partir desta solução foram feitas várias diluições para obter concentrações variando de 0,025 até 0,175 µmol/ml em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Colocados em um tubo de ensaio 0,8 ml das diluições de p-NP (um tubo por cada diluição), 0,2 ml de solução tampão citrato de sódio e por último 2 ml de solução de bicarbonato de sódio a uma concentração de 10% (m/v). Após homogeneizar a mistura, foi feita a leitura em espectrofotômetro (Hitachi 1800) a 410 nm. Com estes dados foi feito uma curva relacionando concentração de p-Np (µmol/ml) com absorbância a 410 nm (Figura 4.3).

Em seguida, foi preparada uma solução de p-nitrofenil-β-glucopiranosídeo (p-NPG) a uma concentração de 0,1% (m/v) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8. Uma alíquota de 0,8 mL desta solução foi colocada em um tubo de ensaio o qual foi incubado em um banho termostatizado a uma temperatura de 50°C. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL do extrato enzimático diluído 10.000x, e após o tempo de 10, 20 e 30 minutos, a reação foi paralisada com 2 mL de bicarbonato de sódio 10% (m/v). A leitura das absorbâncias das

amostras foram realizadas a 410 nm em espectofotômetro (Hitachi 1800). Com estes dados foi calculada a quantidade de p-Np formado em cada um dos tempos de reação empregando a curva padrão de p-NP. Depois, foi construída outra curva relacionando tempo (min) com p-Np formado (µmol/mL) (Figura 4.4.). A atividade enzimática em UI/mL corresponde a formação de 1 µmol de p-NP por minuto, e foi utilizada a Equação 14.

$$A_\beta = \alpha \times d_e \times d_R \qquad (14)$$

Onde:

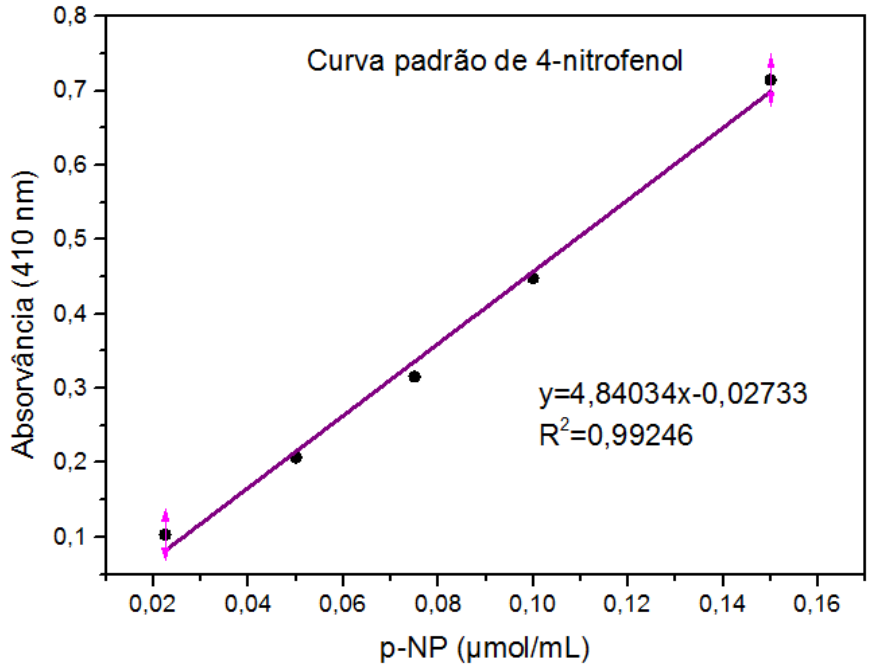
A_β = Atividade enzimática da β-glicosidase em UI/mL

α = Valor da inclinação da reta que correlaciona p-Np formado com tempo

d_e = Diluição da enzima

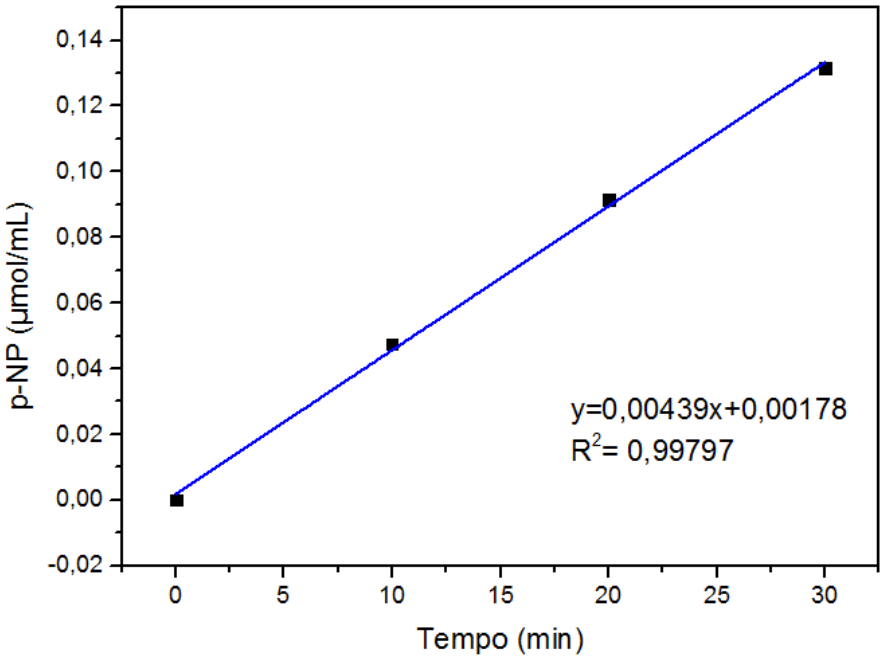
d_R= Diluição da reação

Figura 4.3 - Curva padrão de 4-nitrofenol (p-NP)



Fonte: Autor

Figura 4.4 - Curva que relaciona quantidade de p-NP por minuto



Fonte: Autor

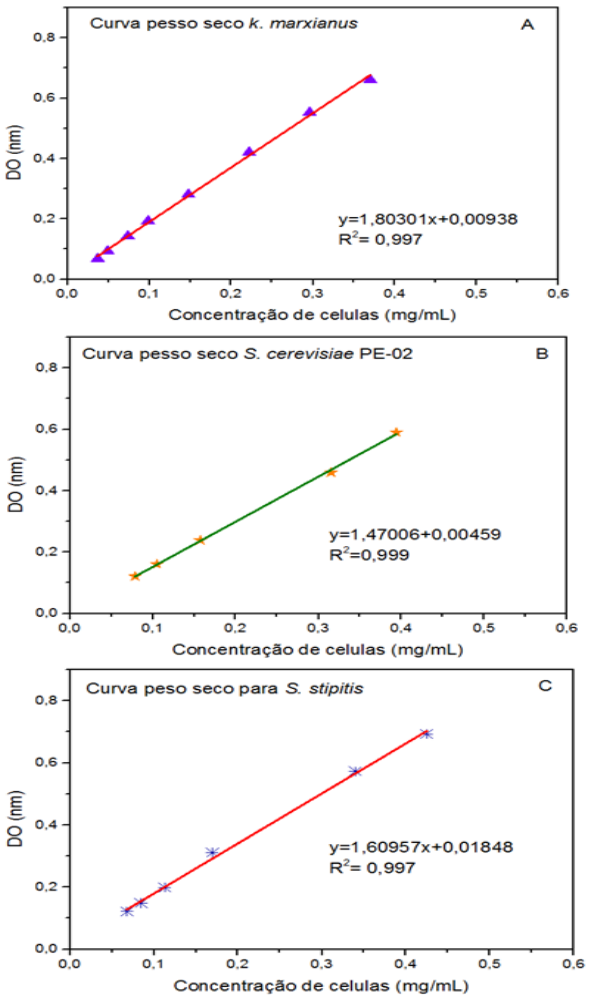
4.6.8 Curva de pesso seco das leveduras e determinação da concentração celular

Para cada uma das leveduras empregadas neste estudo, foi feita uma curva que relaciona a concentração de células (mg/mL) com densidade ótica (DO) em nm. Para isto, primeiramente a partir das leveduras recém repicadas, se fez a transferência de uma alçada de células, para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de um meio semi definido contendo: 30,0 g/L de glicose, 2,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4, 0,3 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 5,0 g/L de extrato de levedura. Os nutrientes foram preparados em uma solução concentrada 25 vezes, que foi esterilizada a 121 °C por 20 minutos. Os meios inoculados foram incubados em agitador rotatório a 30 °C, com agitação de 150 rpm por 16 horas. Após este tempo as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água estérilizada e centrifugadas novemente a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram resuspensas em 25 mL de agua destilada esterilizada. Desta suspenção, um volume de 5 mL foram colocados em cadinho de porcelana previamente tarado e secado em estufa a 100°C por 24 horas. O cadinho junto com a suspenção de células

foi secada em estufa a 100°C até peso constante e a massa de células em mg por cada mL foi determinada. Com a suspenção de células restante foram feitas diluições de 20x a 100x e em seguida foi lida a densidade ótica a 600 nm. Com a massa seca das células em mg/ml se calculou a concentração de células para cada diluição e com estes dados foi feita a curva que relaciona concentração de células em mg/mL e densidade ótica em nm (Figura 4.5).

A concentração celular foi determinada pela medida das absorbâncias das amostras diluídas em espectrofotômetro (Thermo Genesys) utilizando o meio de cultivo sem células como branco. Os valores de concentração foram calculados através da equação das curvas de calibração entre o peso seco e absorbância, a 600 nm.

Figura 4.5 - Curva de pesso seco das leveduras *K. marxianus* (A), *S. cerevisiae* (B) e *S. stipitis* (C)



Fonte: Autor

4.6.9 Determinação dos parâmetros fermentativos

Para a análise dos resultados das fermentações foram determinados os seguintes parâmetros: fator de conversão de substrato em etanol (Equação 15), produtividade volumétrica em etanol (Equação 16) e eficiência do bioprocesso (Equação 17).

a) Fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$, g/g):

$$Y_{P/S} = \left(\frac{\Delta P}{-\Delta S}\right) = \left(\frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}\right) \qquad (15)$$

Onde:

P_f = Concentração final de etanol (g/L)

P_i = Concentração inicial de etanol (g/L)

S_i = Concentração inicial de substrato (g/L)

S_f = Concentração final de substrato (g/L)

b) Produtividade volumétrica em etanol:

$$Q_p = \left(\frac{\Delta P}{t_f}\right) = \left(\frac{P_f - P_i}{t_f}\right) \qquad (16)$$

Onde:

Q_p = Produtividade volumétrica em etanol (g/L.h)

P_f = Concentração final de etanol (g/L)

P_i = Concentração inicial de etanol (g/L)

t_f = Tempo final da fermentação (h)

c) Eficiência do bioprocesso

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y'_{P/S}} \times 100 \qquad (17)$$

Onde:

η = eficiência do bioprocesso (%)

$y_{p/s}$= Fator de conversão de glicose em etanol experimental

$y'_{p/s}$= Fator de conversão de glicose em etanol teórico (0,51 g/g)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado físico-quimicamente com sulfito em meio alcalino

O conhecimento da composição química da biomassa antes e após a etapa de pré-tratamento, é de vital importância para o desenvolvimento do processo de produção de etanol de 2G, pois a eficiência das etapas subsequentes (hidrólise enzimática e fermentação) está intimamente relacionada com as modificações estruturais resultantes do pré-tratamento.

No presente trabalho o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a um pré-tratamento físico-químico com sulfito em meio alcalino, visando sua utilização como substrato para produção de etanol. Uma vez que este pré-tratamento envolve uma etapa de lavagem onde são utilizados em torno de 20 L de água, a composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento com sulfito alcalino foi avaliada nos sólidos lavados (BPL) e não lavados (BPNL). Os resultados referentes a massa recuperada e as porcentagens de remoção dos principais componentes estão apresentados na Tabela 5.1.

Verifica-se que os principais componentes do bagaço in natura em termos de celulose (glucana), hemicelulose (xilana + arabinana) e lignina (insolúvel e solúvel) apresentam teores de 38,9; 24,2; e 23,1%, respectivamente. Nota-se que a celulose e a hemicelulose são os componentes majoritários, indicando que esta biomassa contém um potencial de 63% em açúcares fermentescíveis. A hemicelulose, por sua vez, apresenta uma proporção molar xilose/arabinose de 12:1, ou seja, para cada 12 moles de xilose há um mol de arabinose.

Os grupamentos acetil presentes no bagaço de cana *in natura*, os quais estão ligados na cadeia de xilana apresentaram teores de 3,2 %. Estes resultados revelam que a proporção molar xilose/acetil é de 10:1, ou seja por cada 10 moles de xilose há aproximadamente uma ligação de um grupo acetil na molécula. Nota-se ainda na Tabela 5.1, que os teores dos componentes não açucarados como a lignina total (23,1%) juntamente com os extrativos (6%) e as cinzas (3,1%) correspondem a aproximadamente 32% em massa seca do bagaço.

Tabela 5.1-Composição química do bagaço de cana-de-açúcar *In natura* e após pré-tratamento com sulfito alcalino

Componentes	Composição (% m/m)			Massa recuperada (g/100 g)*		Remoção (% m/m)	
	In natura	**BPL**	**BPNL**	**BPL**	**BPNL**	**BPL**	**BPNL**
Celulose	**38,9 ± 0,7**	**45,6 ± 0,5**	**45,7 ± 0,9**	36,0	37,5	**7,5**	3,7
Hemicelulose	**24,2 ± 0,5**	**26,0 ± 0,4**	**25,7 ± 0,6**	20,5	21,1	**15,1**	**12,8**
Xilana	22,3 ± 0,4	23,5 ± 0,3	23,4 ± 0,5	18,6	19,2	16,7	13,9
Arabinosil	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,9	1,9	0,0	0,0
Grupo Acetil	3,2 ± 0,5	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,1	0,1	0,1	98,3	97,0
Lignina Total	**23,1 ± 0,2**	**16,5 ± 0,6**	**15,1 ± 0,2**	13,0	12,3	**43,6**	**46,6**
Insolúvel	19,3 ± 0,2	11,7 ± 0,5	10,6 ± 0,2	9,3	8,7	52,0	54,9
Solúvel	3,8 ± 0,1	4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,1	3,8	3,6	0,3	4,5
Extrativos	6,0 ± 0,7	4,1 ± 0,2	5,5 ± 0,1	3,3	4,5	45,6	24,9
Cinzas	3,1 ± 0,7	6,8 ± 0,1	8,3 ± 0,03	5,4	6,8	-75,6	-119,9
Total	**98,5**	**99,1**	**100,4**	**79,0**	**82,0**		

*Calculada a partir do porcentagem dos sólidos recuperados após pré-tratamento BPL = 471 g; BPNL = 491 g (massa inicial de 600 g).
**Os teores estão corrigidos com o respectivo teor de extrativos

Estes resultados, com a exceção do teor de hemicelulose, estão na faixa dos valores reportados por Rocha et al., 2015, que avaliaram a composição química de 60 amostras de bagaço de cana provenientes de diversas usinas do Brasil. Segundo os autores foram encontrados teores variando de 36,9 a 45,7% para a celulose; de 25,6 a 29,6% para a hemicelulose; de 18,9 a 26,1% para a lignina; de 2,3 a 10,5% para os extrativos e de 1,14 a 5,11% de cinzas. Os menores valores de hemicelulose obtidos no presente estudo podem ser atribuídos ao fato de que Rocha et al., 2015 incluíram o grupo acetil na somatória para referir-se a hemicelulose.

No que se refere ao bagaço pré-tratado com sulfito alcalino (Tabela 5.1), os resultados mostraram que os teores de glucana e de hemicelulose tiveram um pequeno incremento, de 17% e 7%, respectivamente, independentemente da etapa de lavagem. Este aumento se deve a redução nos teores dos outros componentes incluindo a lignina total, a qual passou de 23,1% para 16,5% e 15,1% no BPL e BPNL, respectivamente; os grupos acetil que decresceram de 3,2% para cerca de 0,1% em ambos materiais (BPL e BPNL), assim como os extrativos foram reduzidos de 6% para 4,1% e 5,5%, no BPL e BPNL, respectivamente. Porém, levando em consideração a massa de sólidos recuperados, verifica-se que as frações polissacarídicas sofreram pequenas perdas, sendo mais pronunciada na hemicelulose onde se observou uma remoção de 15% e 12,8% para BPL e BPNL, respectivamente. Os baixos níveis de remoção das frações polissacarídicas se devem ao fato de que em pH alcalino, tanto a solubilização da hemicelulose, quanto a despolimerização da celulose é diminuída, o que é vantajoso, pois possibilitarão uma maior recuperação dos açúcares para a produção de etanol.

Ainda na Tabela 5.1, verifica-se que as maiores perdas ocorreram nos grupos acetil (~95%), na lignina (~45%) e extrativos (45,6% para o BPL e 24,9% para o BPNL). A remoção dos grupos acetil se deve ao fato de que sua ligação com a cadeia de xilana é do tipo éster; e estas são quebradas em meio alcalino através de reações de saponificação, promovendo solubilização do acetato no licor. Tais ligações são responsáveis pelo controle de absorção de água, e portanto no momento da quebra, fazem com que ocorra o inchamento da fibra e como consequência incrementa a acessibilidade enzimática (KONG; ENGLER; SOLTES, 1992). A parcial remoção da lignina por sua vez, além de favorecer a acessibilidade das enzimas ao substrato, seus resíduos que permanecem no bagaço tornam-se sulfonados pela ação do sulfito. Esta modificação aumenta a hidrofilicidade do material, o que traz como consequência o inchamento das fibras de celulose diminuindo sua

cristalinidade. Quanto aos extrativos, a menor remoção destes no BPNL pode ser atribuída aos compostos solubilizados no licor que ficaram suspensos no material.

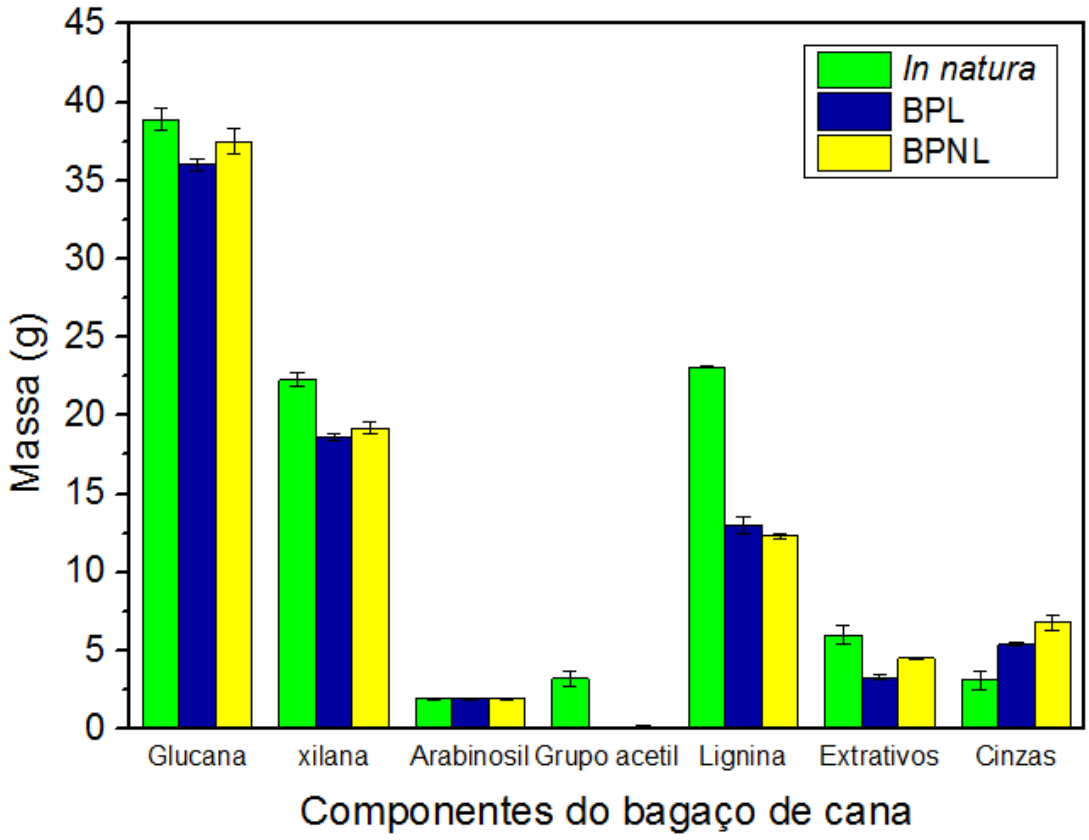
Mendes et al., (2011,2013) empregando o mesmo pré-tratamento com a lavagem do bagaço de cana e algumas variações após cozimento, relataram uma remoção média de 9% no teor de celulose, 29% na hemicelulose e 50% na lignina. Em comparação ao presente trabalho, os resultados de remoção no teor de glucana e de lignina no BPL foram similares, porém a remoção de hemicelulose foi superior. Esta diferença pode ser atribuída a variabilidade da matéria-prima e de diferenças no processamento. As menores perdas das frações açucaradas obtidas no presente trabalho, são vantajosas, pois possibilitarão uma maior recuperação dos açúcares para a produção de etanol. Os resultados de remoção extrativos se comparam aos obtidos por Mesquita et al., (2016), que obtiveram valores de 48% após pré-tratamento do bagaço de cana com sulfito alcalino com a etapa de lavagem.

Com respeito ao teor de cinzas, ao contrário dos outros componentes, observa-se um aumento de 119% e 167% no BPL e BPNL, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos tanto a remoção dos outros componentes quanto aos resíduos de sódio e sulfito que ficaram impregnados no material. No caso do BPNL (material não lavado) traços de sódio e sulfito solubilizados no licor poderiam ficar suspensos no material, o que explica o maior teor de cinzas nesta amostra. O aumento no teor de cinzas após o pré-tratamento sabugo milho com sulfito em meio alcalino foi também observado por Bu et al., (2012). Segundo os autores, o teor de cinzas foi elevado de 6,84 para 9,21% após lavagem dos sólidos, o que correspondeu a um aumento de 35%. Esta diferença pode ser atribuída ao tipo de biomassa e as condições de pré-tratamento empregadas pelo autor.

Para sumarizar os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, a Figura 5.1 mostra a magnitude de remoção de cada um dos componentes do BPL e BPNL em relação ao bagaço in natura. Os resultados apresentados na Figura 5.1 mostram claramente que o pré-tratamento com sulfito alcalino não promoveu perdas consideráveis dos polissacarídeos estruturais, e que seu principal efeito foi à remoção parcial da lignina e quase que total dos grupos acetil do bagaço. Estes resultados estão em concordância com a composição do licor alcalino obtida na Tabela 5.2 onde se constatou uma baixa solubilização de açúcares monoméricos (<1 g/L). Nota-se ainda baixos teores de furfural (<0,01), o qual é um composto produto da desidratação da xilose, e uma maior quantidade de ácido furóico (0,37 g/L), produto da oxidação do furfural, indicando que a maior parte de furfural formado é oxidado neste pré-tratamento. Quanto ao produto de degradação de glicose (5-

hidroximetilfurfural - 5-HMF), verifica-se que o mesmo não foi detectado no licor, o que sugere que reações de desidratação da glicose não é favorecida.

Figura 5.1 - Massa recuperada de cada um dos componentes do bagaço de cana pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL) com relação ao bagaço de cana *In natura* (g/100g)



Fonte: Autor

Na Tabela 5.2, também se observou elevados níveis de ácido acético devido à eficiente solubilização dos grupos acetil, assim como a presença de compostos fenólicos de baixa massa molar provenientes da parcial degradação da lignina. Dentre os fenólicos detectados no licor preto encontram-se o ácido p-cumárico e ácido ferúlico, sendo a concentração de p-cumárico (0,47 g/L) cerca de 10 vezes maior do que ácido ferúlico (0,054 g/L), assim como a presença de ácido gálico (0,082 g/L), produto de hidrolise dos mesmos. Também, foram quantificados pirocatecol (0,13 g/L), formado pela pirólises da catequina, cerca de 0,038 g/L de ácido vanílico e vanilina, os quais são formados a partir da degradação de unidades de guaiacil-propano, e 0,015 g/L de ácido siríngico, que é formado pela degradação de unidades de siringil-propano.

Tabela 5.2- Composição química do licor negro após cozimento do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito alcalino com a etapa de lavagem (BPL)

Componente	Concentração (g/L)
Açucares e ácido acético	
Glicose	0,12 ± 0,002
Xilose	0,53 ± 0,011
Arabinose	0,25 ± 0,006
Ácido acético	5,87 ± 0,302
Produtos de degradação de açúcares	
5- HMF	Não detectado
Furfural	<0.01 ± 0,000
Ácido furóico	0,37 ± 0,020
Produtos de degradação de lignina	
Ácido *p*-cumárico	0,470 ± 0,023
Pirocatecol	0,130 ± 0,007
Ácido gálico	0,082 ± 0,002
Ácido ferúlico	0,054 ± 0,000
Ácido vanílico	0,039 ± 0,001
Vanilina	0,038 ± 0,001
Ácido siríngico	0,015 ± 0,000

A presença de fenólicos no licor negro após pré-tratamento alcalino do bagaço de cana, foram também relatados por alguns autores na literatura. Por exemplo, Deschamps e Ramos, (2002) avaliaram qualitativamente a composição de ácidos fenólicos livres no bagaço de cana após pré-tratamento da biomassa com NaOH (NaOH 1 mol/L) e similar ao presente trabalho, observaram maior proporção de ácido *p*-cumárico do que ácido ferúlico. Em outro estudo realizado por Barquinero et al., (1980), foi constatada a presença de ácido *p*-cumárico, vanilina, ácido vanílico e ácido siríngico no licor negro proveniente da polpação soda do bagaço de cana. Estes autores também identificaram compostos como *p*-hidroxibenzaldeído, ácido sinápico e ácido *p*-hidroxibenzóico. As variações encontradas na composição e tipo de fenólicos nos diferentes estudos, podem ser atribuídas a fatores como: I) idade e desenvolvimento vegetativo da planta; II) razão H/G/S da lignina; III) tipo de pré-tratamento empregado e IV) metodologia de analise utilizada.

Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que o pré-tratamento do bagaço de cana com sulfito alcalino, permitiu a obtenção de um material com elevado teor de polissacarídeos, assim como baixo teor de lignina, a qual é responsável, em parte, pela recalcitrância da biomassa, podendo em altos níveis afetar os processos enzimáticos de sacarificação e insignificantes níveis de grupos acetil, o qual quando solubilizados na forma de ácido acético/acetato também pode impactar negativamente tanto a etapa de hidrólise enzimática quanto a de fermentação. É importante ainda ressaltar que, grande parcela da fração hemicelulósica (~86%) permaneceu no bagaço pré-tratado e que, este componente pode também influenciar negativamente o processo de hidrólise enzimática (MART; KLINKE; BELINDA, 2007; MUSSATTO et al., 2008) Neste sentido, estratégias para minimizar este efeito devem ser consideradas em estudos posteriores.

5.2 Avaliação do tipo e carga de enzima na sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino

Na produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas onde se empregam enzimas na etapa de sacarificação para se obter os açúcares fermentescíveis, ainda existe uma barreira econômica relacionada com o custo das enzimas (KABIR et al., 2010). Neste sentido, a definição do tipo de extrato enzimático, assim como a quantidade a ser utilizada no processo, de forma que se possa atingir eficientes conversões dos polissacarídeos ao menor custo possível, constitui um grande desafio para as indústrias que visam a produção de etanol 2G.

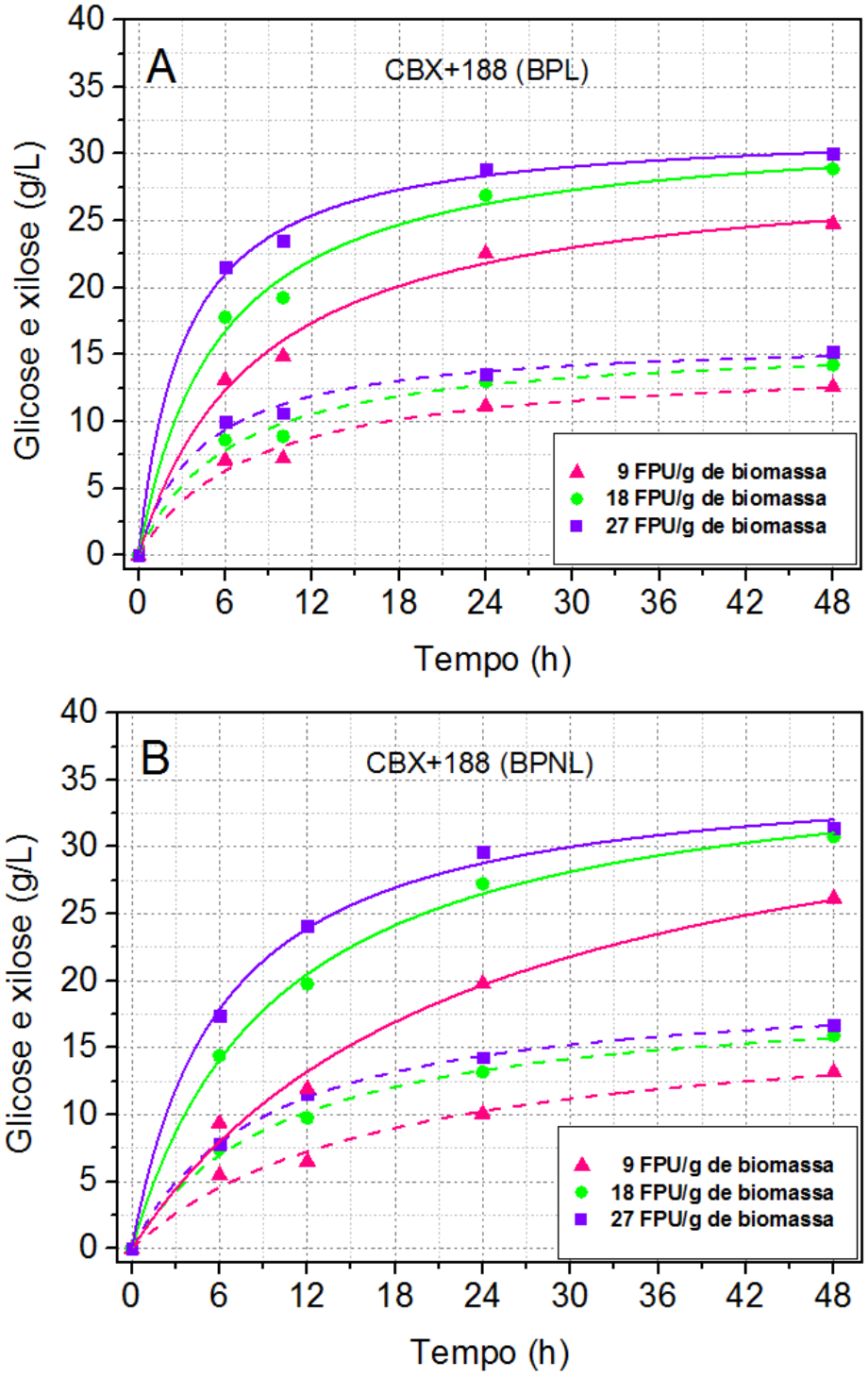
Visando definir as condições de sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL), nesta etapa do trabalho, foram avaliados dois tipos de extratos enzimáticos comerciais (Cellubrix + Novozyme 188 e CelliCtec2), assim como a carga necessária para atingir a maior produção de glicose e xilose nos hidrolisados enzimáticos. Para este estudo, empregou-se um planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais, conforme a matriz apresentada no item 4.6.1 de materiais e métodos. Os resultados referentes à liberação dos açúcares (glicose e xilose) nas diferentes condições de hidrólise estão apresentados na Figura 5.2 e 5.3.

Nota-se que para o extrato enzimático Cellubrix + Novozyme 188 (CBX+188), a velocidade da reação de hidrólise no BPL (Figura 5.2 A) e no BPNL (Figura 5.2 B), aumentou com o aumento da carga de enzima até o tempo de 24 horas; sendo que a partir

deste tempo, a velocidade de reação diminuiu acentuadamente promovendo pouca variação nos níveis de açúcares liberados. Este comportamento é típico do processo de sacarificação enzimática em batelada, onde se observa claramente três fases características (rápida, moderada e recalcitrante) e pode ser explicado pelo fato de que no início da reação às enzimas celulolíticas degradam rapidamente a fração amorfa mais acessível do substrato, e com o progresso da reação, a cristalinidade da celulose é aumentada tornando-a mais resistente à hidrólise. (ARANTES; SADDLER, 2011). No presente trabalho, para as três cargas do extrato enzimático CBX+188 avaliadas, a fase rápida ocorreu no período de 0 a 6 horas e a fase moderada de 6 a 24 horas, sendo notório nestas fases, um aumento proporcional da liberação de açúcares com o aumento na carga de enzima. Já a fase recalcitrante, que ocorreu entre 24 e 48 horas, a velocidade de reação foi drasticamente reduzida atingindo um patamar de saturação após 48 horas. As baixas velocidades de hidrólise observada nesta fase podem ser atribuídas tanto a barreira física causada pela lignina residual presente na biomassa, assim como pela limitada acessibilidade da enzima ao substrato. Rollin et al., (2011) demonstraram que o aumento da acessibilidade da celulose é mais relevante do que a presença de lignina do material. Segundo os autores após tratamento da gramínea *Panicum virgatum* com solventes que promovem rompimento das ligações de hidrogênio que une as fibras de celulose sem remoção da lignina, a celulose se tornou mais acessível resultando em maior eficiência da etapa de sacarificação enzimática mesmo com menor carga enzimática. Além disso, outros fatores relacionados com o sistema enzimático também podem contribuir para a diminuição da velocidade da hidrólise da celulose, incluindo a adsorção irreversível ao substrato e inibição das enzimas pelo produto da reação. (GREGG; SADDLER, 1996).

Ainda na Figura 5.2 A e B, é possível verificar que, para ambos os materiais avaliados (BPL e BPNL), os valores máximos de concentração de glicose e xilose, atingidos em 48 horas, variaram com da carga da enzima CBX + 188 empregada. Neste tempo de reação, os menores valores de concentração de glicose (~ 25 g/L) e de xilose (~ 13 g/L) foram obtidos com a menor nível de enzima (9 FPU/g de biomassa). Com o aumento da carga de 9 para 18 FPU/g de biomassa, a concentração de glicose e de xilose no BPL teve um incremento de 20% e 8%, respectivamente, enquanto que no BPNL este aumento foi de 19% e 23%, atingindo uma concentração de glicose e xilose em torno de 30 g/L e 15 g/L, respectivamente.

Figura 5.2 - Produção de glicose (linha continua) e xilose (linha tracejada) durante a sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (A) e não lavado (B) empregando diferentes cargas do extrato Cellubrix suplementado com Novozyme 188 (CBX+188).



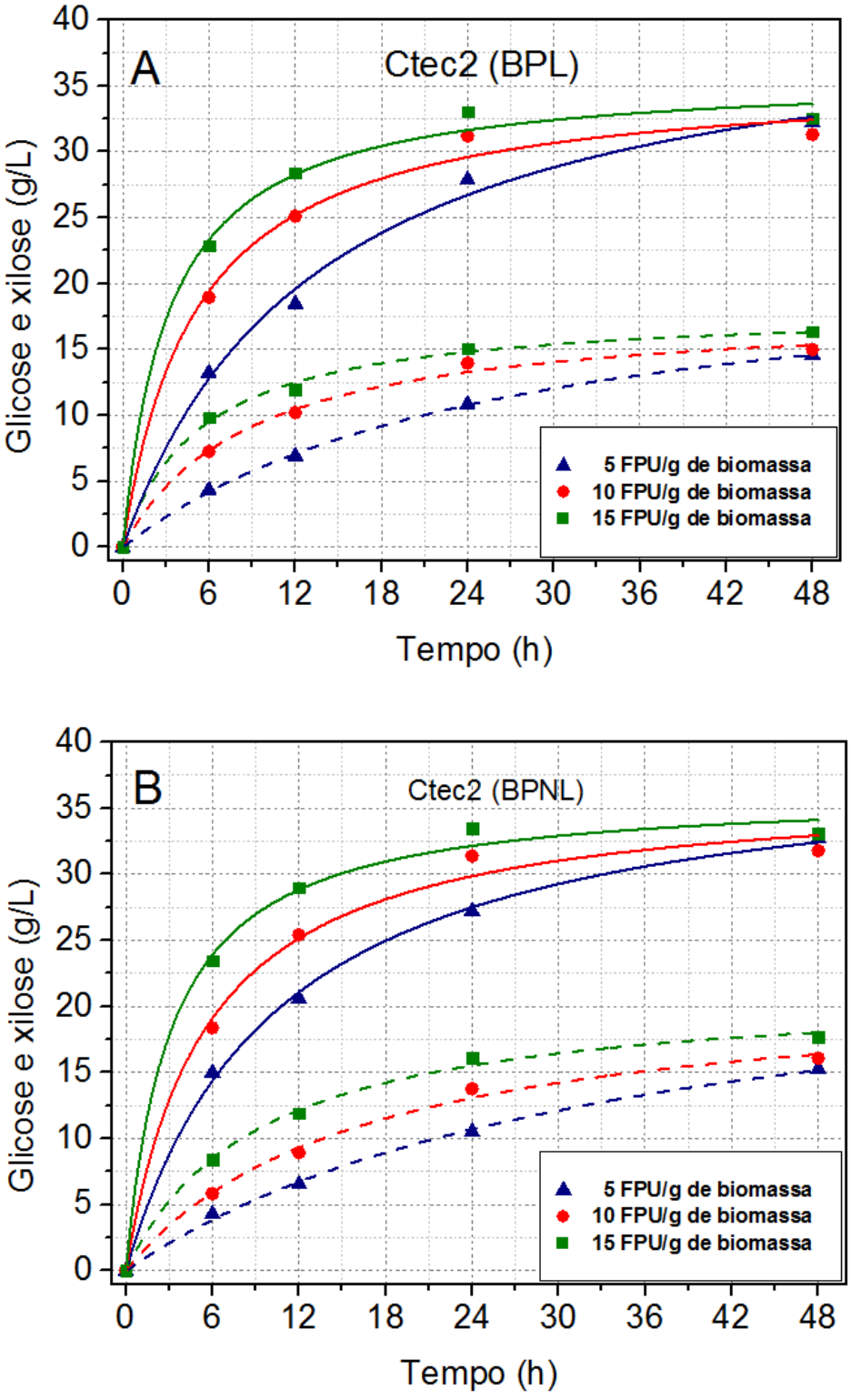
Fonte: Autor

No entanto, com o aumento da carga de enzima de 18 para 27 FPU/g de biomassa, não se observou incrementos relevantes na concentração de ambos os açúcares (<8%) tanto no BPL quanto no BPNL. Estes resultados sugerem, portanto, que na faixa de estudo avaliada, existe um efeito positivo da carga de enzima CBX + 188 sobre a liberação de açúcares até certo limite, acima do qual a reação é paralisada. Estes dados são bastante relevantes, pois demonstram que é possível reduzir cerca de 50% da quantidade da enzima sem alterar substancialmente os rendimentos de conversão de celulose e de xilana em 48 horas. Por esta razão, os ensaios onde se utilizou 18 FPU/g de biomassa pode ser considerado o mais adequado para a hidrólise do BPL e BPNL a partir do extrato CBX + 188. Nestas condições, o rendimento de conversão de celulose (RCC) e de xilana (RCX) foi cerca de 74% e 70%, respectivamente. Vale ressaltar que em nenhuma das cargas avaliadas foi obtida uma completa conversão de celulose e xilana em glicose e xilose, respectivamente, indicando uma importante limitação da acessibilidade da celulose residual, ou mesmo a ocorrência de adsorção irreversível da enzima ao substrato.

Os resultados referentes à liberação de glicose e xilose a partir do bagaço pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL), empregando o extrato enzimático CelliCtec2 (Ctec2), estão apresentados na Figura 5.3 A e B, respectivamente. Semelhante ao comportamento observado nos ensaios com CBX + 188, a velocidade da reação de hidrólise da celulose e da xilana aumentou com o aumento da carga de Ctec2 até o tempo de 24 horas; sendo que a partir deste tempo, os níveis dos açúcares mostraram pouca variação, demonstrando algum tipo de limitação do sistema enzimático. Com este extrato enzimático, é possível verificar que, para ambos os materiais avaliados (BPL e BPNL), a concentração máxima de glicose e xilose obtida após 48 horas de hidrólise, foi independente da carga de enzima sendo obtido cerca de 32 g/L de glicose e 16 g/L de xilose. No entanto, com o aumento da carga de 10 FPU/ g de biomassa para 15 FPU/g de biomassa, o tempo de hidrólise para alcançar este mesmo nível de açucares foi reduzido para 24 horas, revelando que o maior impacto causado pelo aumento da carga da Ctec2 é na velocidade inicial da reação.

Em geral, os resultados obtidos no presente estudo, mostram que a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino foi influenciada pelo tipo e carga de enzima empregada. Porém, para melhor definir as condições do processo, realizou se uma análise estatística dos dados, os quais foram expressos em rendimento de conversão de celulose (RCC) e de xilana (RCX), conforme dados sumarizados na Tabela 5.3.

Figura 5.3 - Produção de glicose (linha continua) e xilose (linha tracejada) durante a sacarificação enzimática do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (A) e não lavado (B) empregando diferentes cargas do extrato CelliCtec2 (Ctec2).



Fonte: Autor

Tabela 5.3 - Valores máximos dos rendimentos de conversão da celulose (RCC) e xilana (RCX) e das concentrações de glicose e xilose atingidas na sacarificação enzimática após 48 horas de reação com dois tipos de extratos enzimáticos e 3 cargas de enzima.

Ensaios	Variáveis Independentes		Bagaço pré-tratado lavado (BPL)				Bagaço pré-tratado não lavado (BPNL)			
	Tipo de extrato	Carga (FPU/g de biomassa)	Glicose (g/L)	RCC[a] (%)	Xilose (g/L)	RCX[b] (%)	Glicose (g/L)	RCC[a] (%)	Xilose (g/L)	RCX[b] (%)
1	Ctec2	5	32 ± 0,5	80 ± 1,2	15 ± 0,3	68 ± 1,4	33 ± 0,8	81 ± 0,5	15 ± 0,5	72 ± 2,2
2	CBX+188	9	24 ± 0,6	59 ± 1,6	13 ± 0,3	59 ± 1,5	26 ± 0,9	65 ± 2,2	13 ± 0,6	64 ± 0,5
3	Ctec2	15	33 ± 0,3	80 ± 0,8	16 ± 0,3	77 ± 1,6	33 ± 0,7	82 ± 1,7	17 ± 0,7	82 ± 2,8
4	CBX+188	27	30 ± 0,8	74 ± 1,9	15 ± 0,3	71 ± 1,4	32 ± 1,1	79 ± 2,8	17 ± 0,5	78 ± 2,1
5	Ctec2*	10	31 ± 0,9	78 ± 1,9	15 ± 0,2	70 ± 1,1	32 ± 1,6	79 ± 1,4	16 ± 0,8	75 ± 2,8
6	CBX+188*	18	29 ± 0,1	72 ± 1,2	14 ± 0,3	67 ± 1,6	31 ± 0,8	76 ± 1,9	16 ± 0,2	75 ± 0,9

*Média de dois repetições
[a] RCC = Rendimento de conversão da celulose
b RCX= Rendimento de conversão da xilan

Observar-se na Tabela 5.3 que as maiores variações ocorreram com o extrato enzimático CBX+188. Para a análise dos efeitos estimados das variáveis (tipo e carga de enzima) sobre o RCC e RCX foi utilizado o teste t de Student, sendo o resultado ilustrado através de gráficos de Pareto conforme apresentado na Figura 5.4. Nesta análise, os valores dos efeitos calculados pelo teste *t* de *Student*, os quais estão representados por barras no Pareto, são comparados ao valor de *t* tabelado (linha pontilhada) para o número de graus de liberdade do experimento e o nível de confiança desejado, que neste caso foi de 90%. Os efeitos com valores maiores que o valor de t tabelado são considerados significativos.

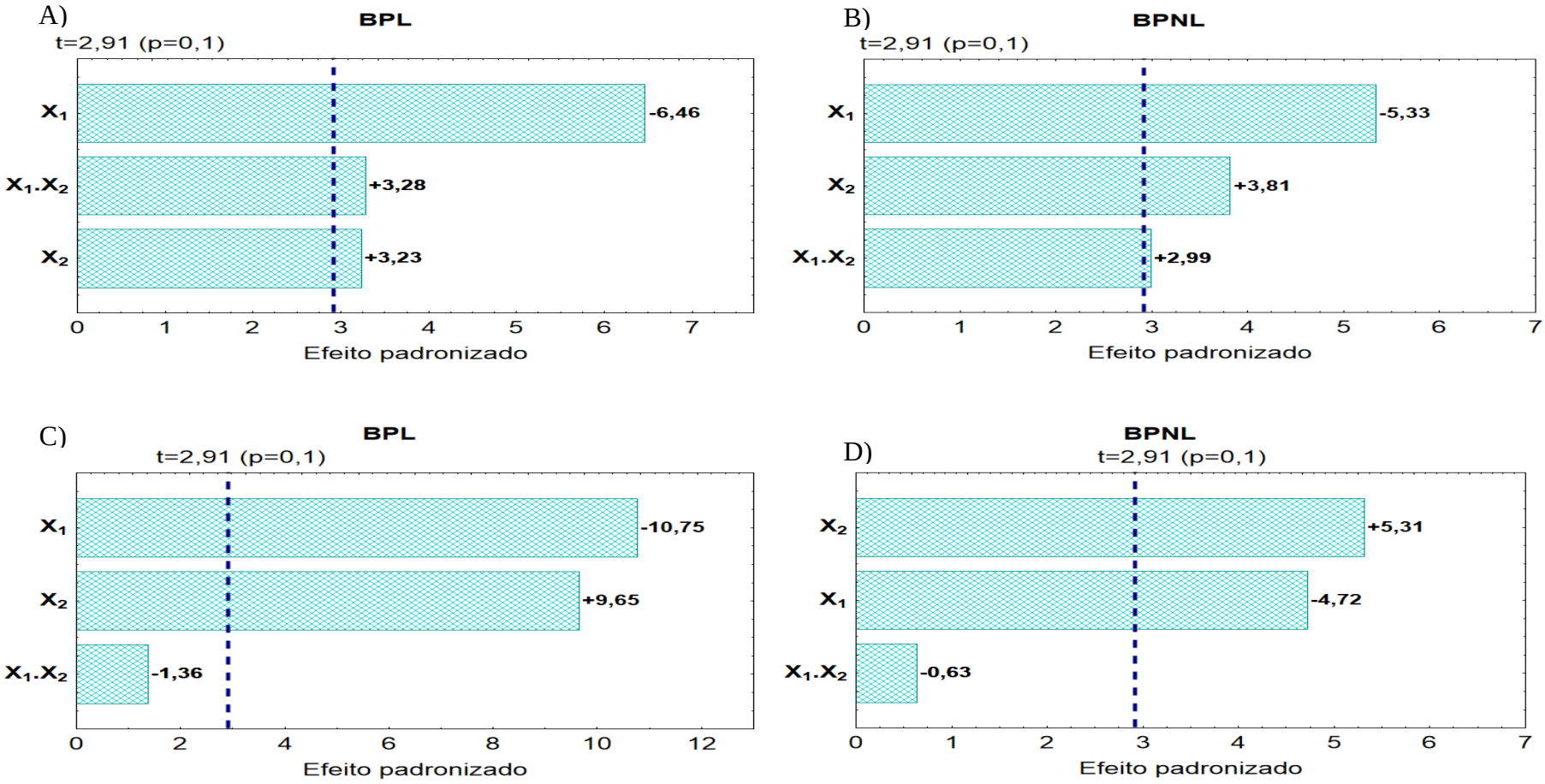
Conforme pode ser visto nas Figuras 5.4 A e B, para ambos os materiais avaliados (BPL e BPNL), tanto o tipo de extrato (X_1) quanto a carga de enzima (X_2) apresentaram efeito significativo sobre a variável de resposta rendimento de conversão de celulose (RCC), sendo de sinal negativo para X_1 e positivo para X_2. Vale ressaltar que o valor do efeito padronizado para a variável tipo de enzima (X_1) foi praticamente o dobro (-6,46 para o BPL e de -5,33 para o BPNL) quando comparado ao efeito da carga de enzima (+3,23 para o BPL e +3,81 para o BPNL), confirmando a análise direta dos dados, onde se observou valores de RCC superiores com o extrato Ctec2, em ambos os materiais avaliados. Nota-se ainda, que o efeito de interação entre as variáveis ($X_1.X_2$) apresentou sinal positivo, indicando que os maiores rendimentos de conversão da celulose podem ser obtidos com o emprego da CBX+188 nas maiores cargas ou com Ctec2 nas menores cargas de enzima avaliadas.

Na Figura 5.4 C e D estão mostrados os gráficos de Pareto para os efeitos estimados das variáveis: tipo de extrato enzimático e carga de enzima sobre o rendimento de conversão da xilana (RCX) no bagaço pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL)

Observa-se na Figura 5.4 C e D, que tanto para o bagaço pré-tratado lavado (BPL) quanto para o não lavado (BPNL), o tipo de extrato enzimático (X_1) e a carga de enzima (X_2) também mostraram efeitos significativos sobre a variável de resposta (RCX), porém o efeito de interação entre as variáveis ($X_1.X_2$) não se mostrou significativo ao nível de 90% de confiança, e que tanto no BPL quanto no BPNL os maiores rendimentos de conversão da xilana podem ser obtidos empregando as maiores cargas do extrato enzimático Ctec2.

A significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre o rendimento de conversão da celulose (RCC) e de xilana (RCX) no BPL e BPNL, para o processo de sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino foi

Figura 5.4 - Estimativa dos efeitos X_1 (Tipo de enzima) e X_2 (Carga de enzima) e da sua interação $X_1.X_2$ ao nível de 90% de confiança pelo gráfico de Pareto para o rendimento de conversão da celulose (RCC) (A e B) e rendimento de conversão da xilana (RCX) (C e D) para o bagaço pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL).



Fonte: Autor

confirmada através da análise da variância dos efeitos (Tabelas 5.4 a 5.7). Os termos considerados significativos foram os mesmos observados nos gráficos de Pareto e o coeficiente de correlação alcançado foi superior a 0,80 para as duas respostas avaliadas, o que demonstra a relevância das variáveis estudadas.

Tabela 5.4 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da celulose (RCC) no bagaço pré-tratado lavado (BPL).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
X_1	104,51	1	104,51	41,80	*0,0230**
X_2	26,22	1	26,22	10,49	*0,0835**
$X_1.X_2$	26,93	1	26,93	10,77	*0,0816**
Falta de ajuste	33,15	2	16,57	6,63	0,1310
Erro total	5,00	2	2,50		
Total (*corr.*)	338,87	7			
			R^2 = 0,88		

Tabela 5.5 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da celulose (RCC) no bagaço pré-tratado não lavado (BPNL).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
X_1	56,89	1	56,89	28,44	*0,0300**
X_2	29,15	1	29,15	14,57	*0,0622**
$X_1.X_2$	17,94	1	17,94	8,97	*0,0957**
Falta de ajuste	23,72	2	11,86	5,93	0,1442
Erro total	4,00	2	2,00		
Total (*corr.*)	202,87	7			
			R^2 = 0,86		

Tabela 5.6 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da xilana (RCX) no bagaço pré-tratado lavado (BPL).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
X_1	115,75	1	115,75	115,75	*0,0085**
X_2	93,19	1	93,19	93,19	*0,0105**
$X_1.X_2$	1,87	1	1,87	1,87	0,3042
Falta de ajuste	11,37	2	5,68	5,68	0,1494
Erro total	2,00	2	1,00		
Total (*corr.*)	179,87	7			
		R^2 = 0,92			

Tabela 5.7- Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais e de interação das variáveis sobre o rendimento de conversão da xilana (RCX) no bagaço pré-tratado não lavado (BPNL).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
X_1	94,68	1	94,68	22,27	*0,0420**
X_2	120,05	1	120,05	28,24	*0,0336**
$X_1.X_2$	1,72	1	1,72	0,40	0,5894
Falta de ajuste	17,95	2	8,97	2,11	0,3212
Erro total	8,50	2	4,25		
Total (*corr.*)	193,87	7			
		R^2 = 0,86			

Com base nos termos significativos, modelos lineares foram ajustados para descrever o rendimento de conversão da celulose (RCC) no BPL e BPNL em função das variáveis estudadas. Através de uma análise de variância da regressão verificou-se que tanto para o BPL quanto para o BPNL a resposta (RCC) apresentou coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,86; indicando uma boa concordância entre os resultados experimentais e os valores previstos pela regressão do modelo. Desta forma, o rendimento de conversão da celulose (RCC) no BPL e BPNL, dentro da região estudada, em função do tipo e carga de enzimas podem ser descritos pelas Equações 18 e 19, respectivamente.

$$\hat{Y}_1 = 72{,}9 - 5{,}7X_1 + 4{,}6X_2 + 4{,}7X_1X_2 \left(R^2 = 0{,}88\right) \quad (18)$$

$$\hat{Y}_2 = 76{,}6 - 4{,}2X_1 + 4{,}8X_2 + 3{,}8X_1X_2 \left(R^2 = 0{,}86\right) \quad (19)$$

Onde: $\hat{Y}_1$ e $\hat{Y}_2$, representam o valor estimado de RCC (%) no BPL e BPNL, respectivamente; X_1 e X_2 representam os níveis codificados das variáveis: tipo de extrato enzimático e carga de enzima, respectivamente.

De acordo com o modelo obtido, o máximo rendimento de conversão de celulose foi de 76% para o BPL e de 81% no BPNL quando se utiliza o extrato CBX +188 empregando 27 FPU/g de biomassa. Nestas condições do processo, os valores de rendimento de conversão da xilana foram de 72% e 80%, respectivamente. Já para o extrato Ctec2, os modelos preveem um máximo rendimento de conversão de celulose de 69 % no BPL e de 72 % no BPNL empregando uma carga de 5 FPU/g de biomassa.

Para uma definição do tipo de extrato enzimático a ser empregado nos experimentos posteriores, levou-se em consideração tanto a disponibilidade do extrato no laboratório, assim como a quantidade mínima possível de extrato enzimático para reduzir os custos do processo sem comprometer os rendimentos de conversão da celulose. Quanto à disponibilidade da enzima, foi selecionado o extrato CBX + 188, o qual encontra-se em quantidades suficientes para obtenção dos hidrolisados que serão utilizados como meio de fermentação na etapa seguinte deste trabalho, e quanto a quantidade mínima necessária, observou-se que, de acordo com o modelo obtido, o aumento da carga do extrato CBX + 188 de 18 para 27 FPU/g de biomassa, ou seja cerca de 50% a mais na quantidade desta enzima, não promoveria ganhos superiores a 10% no rendimento de conversão de celulose tanto no BPL quanto no BPNL, o que não justificaria o emprego da maior carga. De acordo com o estudo realizado por Shen e Agblevor, (2008) ficou demonstrado que o uso de altas cargas de enzimas para atingir rendimentos de conversão de celulose inferiores a 90% não se justificam devido ao incremento no custo da enzima.

Com base nestes resultados definiu-se como melhor condição para a obtenção dos hidrolisados enzimáticos empregando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino a utilização do extrato CBX + 188 com a carga de 18 FPU/g de biomassa. Nestas condições, foram realizados ensaios de sacarificação enzimática, sendo obtidos valores de 71±3,5% e 76±1,4% para o BPL e BPNL, respectivamente, os quais são bastante próximos aos previstos pelos modelos (69% para o BPL e 74% para o BPNL).

Empregando o bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (com etapa de lavagem) Laurito-Friend et al., (2015) relataram valores de RCC e RCX de 81 e 79%, respectivamente após 48 horas sacarificação enzimática (Celluclast 10 FPU/g de biomassa

+ 20 UI/g de biomassa de Novozyme 188). Estes resultados se comparam bem aos obtidos no presente estudo, sendo a pequena diferença observada atribuída ao tipo de extrato enzimático utilizado. No entanto, os resultados de RCC obtidos no presente trabalho com o extrato CBX + 188 na carga de 18 FPU/g de biomassa, foram superiores aos obtidos por Siqueira et al., (2013), que reportaram 63% de RCC, após 48 horas de reação empregando o mesmo extrato enzimático. No pré-tratamento utilizado pelos autores, embora tenha ocorrido remoção parcial da lignina, que foi similar à do presente trabalho, não foi observada a remoção da hemicelulose, o que provavelmente explica o menor rendimento de conversão de celulose observada pelos autores. De fato, a presença de hemicelulose na biomassa foi apontada por Mesquita et al., (2016) como sendo o fator responsável pelos baixos rendimentos de conversão da celulose (64%) obtidos a partir do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (com etapa de lavagem) utilizando o extrato enzimático Multifect CX 15L (20 FPU/g de substrato).

Os rendimentos máximos de RCC (80%) e RCX (70%) obtidas com o extrato de Ctec2, do presente trabalho, se comparam aos publicados por Batalha et al., (2015), que empregaram o bagaço de cana pré-tratado por auto hidrólise (180°C, 20 minutos). Estes autores obtiveram um rendimento máximo de conversão de celulose de 82% e de xilana de 78%, com 5 FPU/g de biomassa utilizando o extrato enzimático Ctec2, porém com 96 horas, o que mostra a importância do pré-tratamento sobre a velocidade de reação. Em outro trabalho Cheng et al., (2014) utilizando o extrato enzimático de Ctec2 na carga de 15 FPU/g de glucana para hidrolisar cachos do fruto de palmeiras pré-tratados com sulfito em meio ácido (7% SO_2 e 1,4% H_2SO_4), obtiveram um rendimento de conversão da celulose (RCC) de 97% após 48 horas. Estes elevados resultados obtidos pelos autores podem ser atribuídos, especialmente a elevada remoção de hemicelulose (~80%) e ao baixo teor de lignina presente nesta biomassa.

Ainda no presente trabalho, ao se comparar os valores de RCC para o bagaço pré-tratado lavado (BPL) e não lavado (BPNL), nas condições previamente definidas (CBX + 188 com a carga de 18 FPU/g de biomassa) verifica-se que a conversão no BPNL (76±1,4%) foi ainda superior ao obtido no BPL (71±3,5%), podendo-se concluir que a etapa de lavagem do bagaço após tratamento com sulfito alcalino pode ser omitida do processo, o que é relevante devido a uma possível redução de custos durante o processamento da biomassa

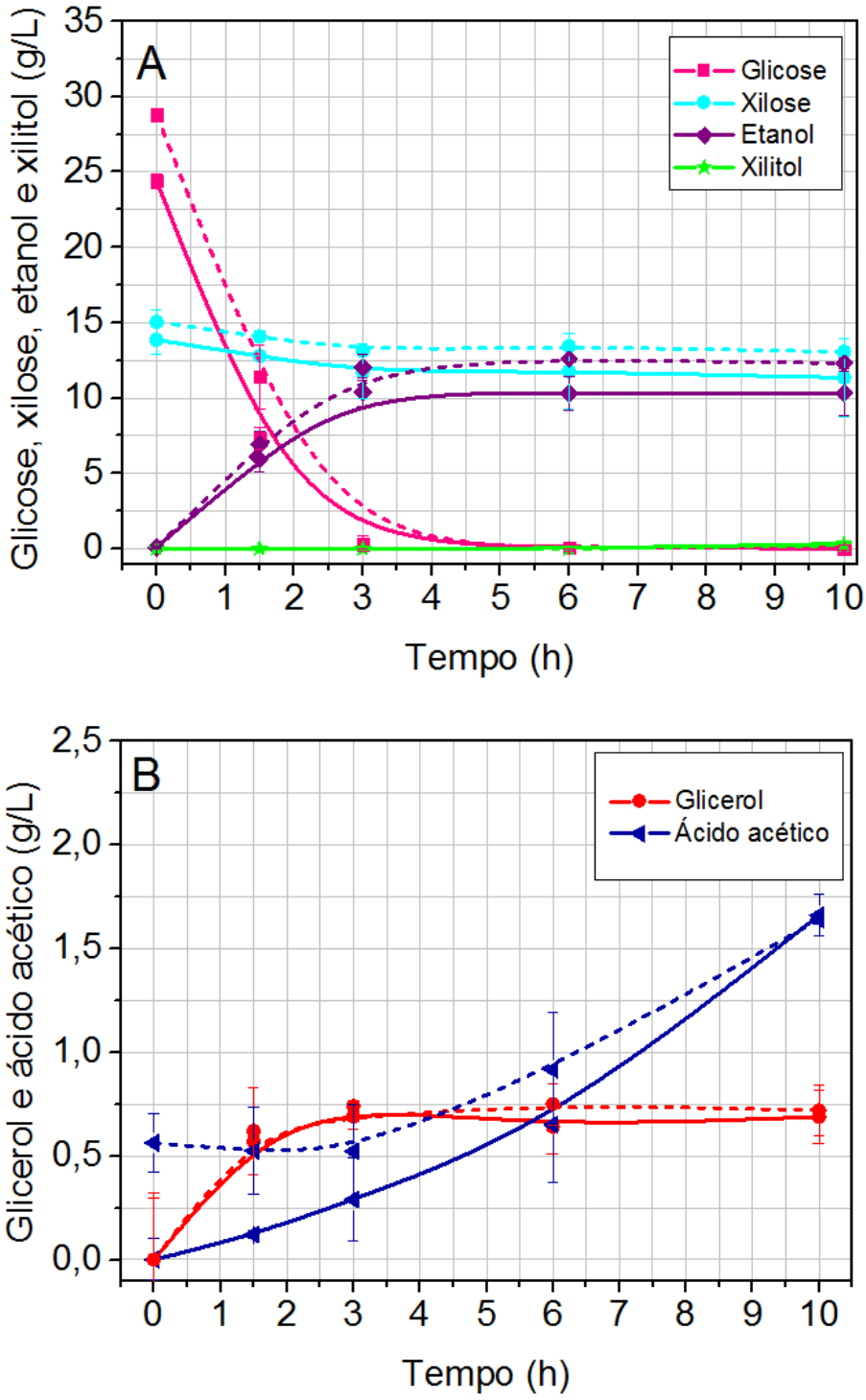
5.3 Fermentação do hidrolisado enzimático obtido a partir do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino empregando a levedura *k. marxianus* Y-6860

O hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino, obtido no presente trabalho, contém uma mistura de glicose (~24 g/L) e xilose (~14 g/L) como açúcares fermentescíveis. Desta forma, para que este hidrolisado possa ser devidamente fermentado, é necessária a utilização de micro-organismos capazes de assimilar ambos os açúcares. Dentre as leveduras com esta característica, destaca-se a linhagem *Kluyveromyces marxianus* Y-6860, a qual apresenta elevado potencial em produzir etanol a partir de glicose (CASTRO; ROBERTO, 2014), e xilitol a partir de xilose (SANTOS, 2015). No entanto, o perfil fermentativo desta linhagem de *K. marxianus* em meios contendo glicose e xilose, especialmente em meios formulados com hidrolisados de biomassa lignocelulósica não tem sido ainda reportado. Destaca-se ainda que a fermentabilidade dos hidrolisados lignocelulósicos pode ser afetada pela escolha dos reagentes de impregnação utilizados durante o pré-tratamento, bem como dos subprodutos formados (MARTÍN et al., 2002a). De acordo com Alves, 1994 apud Basso; Basso; Rocha, 2011, resíduos de sulfito podem ser considerados tóxicos para algumas leveduras em uma concentração de 200 mg/L, causando estresse osmótico. Dentro deste contexto, esta etapa do trabalho teve como objetivo avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos provenientes de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL) empregando a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860. Para isso, os hidrolisados foram suplementados com nutrientes, conforme descrito no item 4.5.2 de materiais e métodos e os cultivos foram realizados na temperatura de 40^{o}C.

Os perfis de consumo de açúcares, formação de produtos e subprodutos por *K. marxianus* NRRL Y-6860 nos hidrolisados enzimáticos provenientes de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL) estão mostrados na Figura 5.5. Verifica-se na Figura 5.5 A, que para os dois hidrolisados enzimáticos avaliados (BPL e BPNL) o esgotamento quase que total da glicose ocorreu nas primeiras 3 horas de

Figura 5.5 - Perfis de consumo de açúcares e formação de produtos (A) e subprodutos (B) pela levedura *K. marxianus* Y-6860 a partir do hidrolisado enzimático obtido a partir do

bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino lavado (linha continua) e não lavado (tracejada)



Fonte: Autor

fermentação, tempo no qual foram verificadas as máximas concentrações de etanol, 9,3 e 11g/L para o BPL e BPNL, respectivamente. Nota-se ainda que, a xilose foi lentamente consumida atingindo-se um total de 20%, após 10 horas de fermentação, apresentando neste tempo, uma produção de xilitol irrelevante (<0,5/g L). A baixa assimilação de xilose pela levedura pode ser atribuída ao efeito de repressão catabólica da glicose. Um comportamento similar ao obtido no presente trabalho foi observado por Rodrussamee et al., (2011) com a levedura *k. marxianus* DMKU3-1042 empregando meio sintético contendo glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L) como fonte de carbono na temperatura de 41 ^{o}C. Estes autores observaram que a glicose foi totalmente consumida após 12 horas de fermentação, atingindo neste tempo a máxima concentração de etanol (10 g/L), enquanto que a xilose foi consumida lentamente, resultando em uma assimilação de 25 % em 96 horas de fermentação com baixa produção de xilitol. Os autores atribuíram este comportamento ao efeito de repressão catabólica da glicose sobre a xilose, uma vez que verificaram que no meio contendo os dois açúcares (glicose e xilose) a expressão do gene XYL-1 (que codifica para a xilose redutase) foi de 5,7 vezes menor quando comparado ao meio que continha apenas xilose no meio de fermentação.

Canazart, Roberto e Braganc (2013) empregando a levedura *K. marxianus* UFV-3 em meio semi-definido contendo diferentes proporções de glicose/xilose como substrato verificaram que a assimilação de xilose foi dependente da concentração inicial de glicose no meio. O maior consumo de xilose (54%, após 25h) ocorreu quando o meio continha 5 g/L de glicose e 20 g/L de xilose, e que a assimilação desta pentose foi iniciada imediatamente após o esgotamento da glicose no meio. Por outro lado, quando a concentração de glicose foi aumentada para 20 g/L, o consumo de xilose foi inferior a 10% neste mesmo período.

Com relação a formação de subprodutos (Figura 5.5 B), verifica-se que em ambos os hidrolisados avaliados (BPL e BPNL) se evidenciou uma baixa produção de glicerol, o qual atingiu um valor máximo de aproximadamente 0,7 g/L após 3 horas de cultivo, mantendo-se neste nível até o final do processo fermentativo. O glicerol pode ser um subproduto do metabolismo de glicose ou xilose em cultivos realizados com baixas concentrações de oxigênio, bem como um osmolito compatível para compensar a pressão osmótica extracelular, causada pela alta concentração de glicose, sais ou sulfito no meio de fermentação (PETROVSKA; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1999).

Signori et al., (2014) também observaram a produção de glicerol pela levedura *K. marxianus* CBS712 em meio sintético contendo uma mistura de glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L). Os autores avaliaram o cultivo sob diferentes condições de oxigenação do meio (20,95%, 11,00% e 1,75%) e observaram que a acumulação de glicerol aumentou na condição de menor fornecimento de oxigénio (1,75% O_2). Nesta condição, a concentração de glicerol atingiu 2 g/L após 12 horas de fermentação, mantendo-se inalterada até 70 horas de cultivo. Em outro trabalho, Petrovska; Winkelhausen e Kuzmanova, (1999), estudaram a formação de glicerol por 4 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae, Candida bordinii, Pichia angusta e Pichia anomala*) sob condições de estresse osmótico induzido por sulfito de sódio (40 g/L) em meio semi-definido contendo 100 g/L de glicose. Os autores observaram que o metabolismo de todas as leveduras avaliadas se deslocou para a formação de glicerol, em detrimento da produção de etanol, na presença de sulfito de sódio. Dentre as leveduras avaliadas, a *S. cerevisiae* foi a que atingiu a maior eficiência na produção de glicerol 68,6%, a qual foi aumentada para 82,3% em condições microaerofílicas.

No presente estudo, não se verificou um desvio do metabolismo da levedura para o glicerol, o que sugere a baixa toxicidade dos hidrolisados enzimáticos empregados (BPL e BPNL), apesar da presença de resíduos de sódio e de sulfito no meio de fermentação, especialmente no BPNL, o qual foi obtido omitindo a etapa de lavagem do bagaço após tratamento com sulfito de sódio.

Ainda na Figura 5.5 B também se evidenciou a produção de ácido acético em ambos os hidrolisados avaliados (BPL e BPNL). Destaca-se que no hidrolisado enzimático do BPL, a concentração de ácido acético aumentou progressivamente com o tempo e atingiu 1,66 g/L após 10 horas de cultivo. No entanto, no hidrolisado enzimático do BPNL, o qual já continha um teor inicial deste ácido em 0,5 g/L se observou um comportamento um pouco diferente, já que a produção de ácido acético iniciou após 3 horas de cultivo, alcançando após 10 horas de cultivo, uma concentração similar à atingida no hidrolisado enzimático do BPL (1,64 g/L). Apesar da concentração final de ácido acético ter sido similar nos dois meios, a produção deste metabólito foi 45% maior no BPL com relação ao BPNL, o que pode ter contribuído para a sensível redução na produção de etanol observada no BPL. Outros estudos empregando leveduras da espécie *K. marxianus* também observaram a produção de ácido acético em concentrações próximas aos do presente trabalho (~ 2 g/L), em meio sintético contendo glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L) como fonte de carbono, em condições limitadas de oxigênio (SIGNORI et al., 2014) e em condições anaeróbias (WILKINS et al., 2008).

Para uma análise geral dos dados, foram determinados os parâmetros fermentativos da levedura *K. marxianus* Y-6860 empregando os hidrolisados enzimáticos a partir do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL), conforme sumarizados na Tabela 5.8.

É possível observar na Tabela 5.8 que a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e o fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) foram ligeiramente superiores na fermentação do hidrolisado enzimático do BPNL, em comparação ao BPL. Este comportamento está coerente com os menores valores de conversão dos subprodutos formados no BPNL.

Tabela 5.8 - Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* Y-6860 em hidrolisado enzimático obtido do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino lavado (BPL) e não lavado (BPNL).

Parâmetros	Produtos e subprodutos							
	Etanol[1]		Glicerol[1]		Ácido acético[1]		Xilitol[2]	
	BPL	BPNL	BPL	BPNL	BPL	BPNL	BPL	BPNL
t_f (h)	3	3	10	10	10	10	10	10
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,38	0,40	0,026	0,022	0,061	0,037	0,13	0,11
Q_P (g/L.h)	3,1	3,7	0,069	0,072	0,166	0,140	0,033	0,022
η(%)	74,5	78,3	2,9	2,5	6,1	3,7	14,3	12,1

t_f = tempo para atingir a máxima concentração do metabólito; [1] $Y_{P/S}$ calculado a partir de glicose e xilose; [2] $Y_{P/S}$ calculado a partir de xilose

Os valores de eficiência de fermentação em etanol, observados no presente trabalho para ambos os hidrolisados enzimáticos avaliados (BPL = 74,5% e BPNL= 78,3%) foram superiores ao obtido por Faria; Ferraz e Aguiar, (2016) que reportaram um valor de 56% após 24 horas empregando um hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana também pré-tratado com sulfito alcalino (com etapa de lavagem) utilizando *S. cerevisiae* comercial, a uma temperatura de 30°C. Embora as características do hidrolisado enzimático sejam similares ao presente trabalho, à diferença observada na eficiência na produção de etanol pode ser atribuída ao tipo de microrganismo fermentativo empregado.

Castro e Roberto, (2014) avaliando a produção de etanol por *K. marxianus* Y-6860, à 45 °C em um processo de sacarificação e fermentação simultânea da palha de arroz pré-tratada com ácido diluído, obtiveram após 12 horas valores de Q_P = 1,4 g/L.h , $Y_{P/S}$ = 0,24

g/g e η = 47%. Em outro trabalho, Moreno et al., (2013) observaram também a partir de 12 horas, valores de Q_P = 0,07 g/L.h; $Y_{P/S}$ = 0,06 g/g e η = 10,8% para a linhagem de *K. marxianus* CECT 10875 em hidrolisado enzimático da palha de trigo pré-tratada com explosão a vapor. Estes resultados são inferiores aos obtidos no presente trabalho, podendo esta diferença ser explicada tanto pela configuração do processo (sacarificação e fermentação simultânea), quanto pelo tipo e pré-tratamento da biomassa empregada.

Os resultados do presente estudo, em geral, confirmam o grande potencial fermentativo da levedura *K. marxianus* Y-6860 para a produção de etanol a partir apenas da glicose presente no hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Considerando que a xilose ainda permanece em quase sua totalidade no hidrolisado enzimático, faz-se necessário a busca de estratégias para estimular o consumo desta pentose, ou mesmo avaliar outras cepas de leveduras fermentadoras da mistura glicose e xilose. Os resultados também mostram que a etapa de lavagem do bagaço pré-tratado, anterior ao seu refinamento, não produziu um hidrolisado com características mais favoráveis ao processo fermentativo.

5.4 Efeito da suplementação nutricional e da temperatura na fermentabilidade do hidrolisado enzimático (BPNL)

A suplementação nutricional de hidrolisados obtidos a partir da biomassa lignocelulósica tem sido amplamente estudada, uma vez que os componentes essenciais para o metabolismo celular, especialmente o nitrogênio, podem não estar presentes em níveis adequados. Normalmente, a composição química destes hidrolisados varia com o tipo de biomassa e com o pré-tratamento utilizado para obtenção dos açúcares fermentescíveis, e sua fermentabilidade irá depender da necessidade nutricional do micro-organismo empregado, assim como das condições de cultivo.

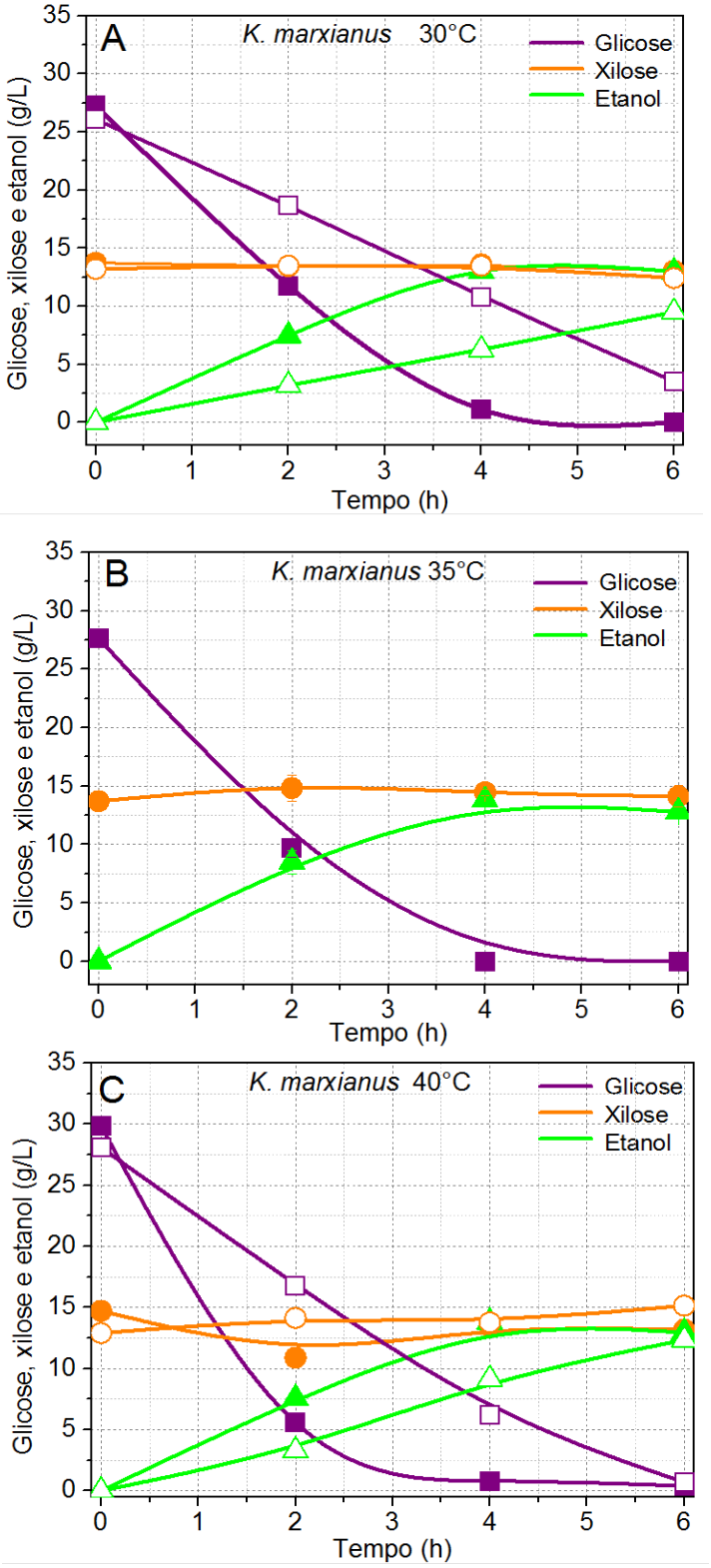
Na etapa anterior, a levedura *K. marxianus* Y-6860 mostrou um grande potencial para a produção de etanol na temperatura de 40°C a partir da glicose presente no hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado não lavado (BPNL), o qual foi suplementado com nutrientes. Com o objetivo de avaliar a necessidade de suplementação nutricional do BPNL, assim como as possíveis interações desta variável com a temperatura sobre a produção de

etanol por *K. marxianus* Y-6860 foi realizado um planejamento fatorial 2^2, onde se avaliou duas condições nutricionais (com e sem adição da solução de nutrientes) e três temperaturas (30, 35 e 40°C). Para efeito de comparação, a fermentabilidade do BPNL foi também avaliada com *S. cerevisiae* PE-2, a qual é uma espécie utilizada amplamente em processos fermentativos industriais a partir da cana de açúcar, pela sua elevada eficiência fermentativa, altas velocidades e tolerância as condições de estresse impostas pelo próprio processo (BASSO et al., 2008), especificamente a cepa PE-2 é utilizada em um 30% das destilarias nacionais (ARGUESO et al., 2009) e também será comparado com *S. stipitis* Y-7124, que é uma espécie de levedura com o metabolismo natural para assimilar tanto glicose quanto xilose para a produção de etanol (AGBOGBO et al., 2006). O perfil fermentativos das leveduras nas condições avaliadas se apresentam nas Figuras 5.6 a 5.8.

As Figuras 5.6, 5.7 e 5.8 mostram o perfil fermentativo das leveduras *K. marxiaus*, *S. cerevisiae* e *S. stipitis* em hidrolisado enzimático do bagaço de cana pre-tratado por sulfito alcalino (BPNL) nas condições do planejamento experimental. Nota-se que, independentemente da temperatura do cultivo, a levedura *K. marxiaus* (Figura 5.6), foi capaz de consumir quase que totalmente a glicose, após 4 horas de fermentação, apresentando neste tempo, valores similares de produção de etanol (cerca de 12,5 g/L). No entanto, sem a adição de nutrientes, a assimilação de glicose se mostrou mais lenta, e na menor temperatura avaliada (30ºC), o consumo deste açúcar foi incompleto (86,4%) com uma produção de etanol cerca de 30% inferior em relação a obtida nos hidrolisados suplementados. Com relação à xilose, verifica-se pouca ou nenhuma variação na concentração desta pentose durante o período de fermentação em todas as condições avaliadas, o que confirma a incapacidade de *K. marxianus* em assimilar eficientemente a xilose na presença de glicose.

Comportamento semelhante ao obtido no presente trabalho foi relatado por Castro e Roberto (2015) estudando o efeito da suplementação nutricional ao hidrolisado enzimático da palha de arroz sobre a produção de etanol empregando a mesma linhagem de *K. marxianus* a 45ºC. Os autores observaram similar produção de etanol (11 g/L a partir de aproximadamente 22 g/L de glicose) em hidrolisado com ou sem suplementação de nutrientes, porém com tempos diferentes (4 e 12 horas de fermentação, respectivamente) e concluíram que o principal efeito da suplementação nutricional do hidrolisado enzimático de palha de arroz foi o favorecimento da velocidade do processo.

Figura 5.6 - Perfil fermentativo da levedura *K. marxianus* Y-6860 em três temperaturas diferentes com suplementação nutricional (símbolo cheio) e sem suplementação nutricional (símbolo vazio)

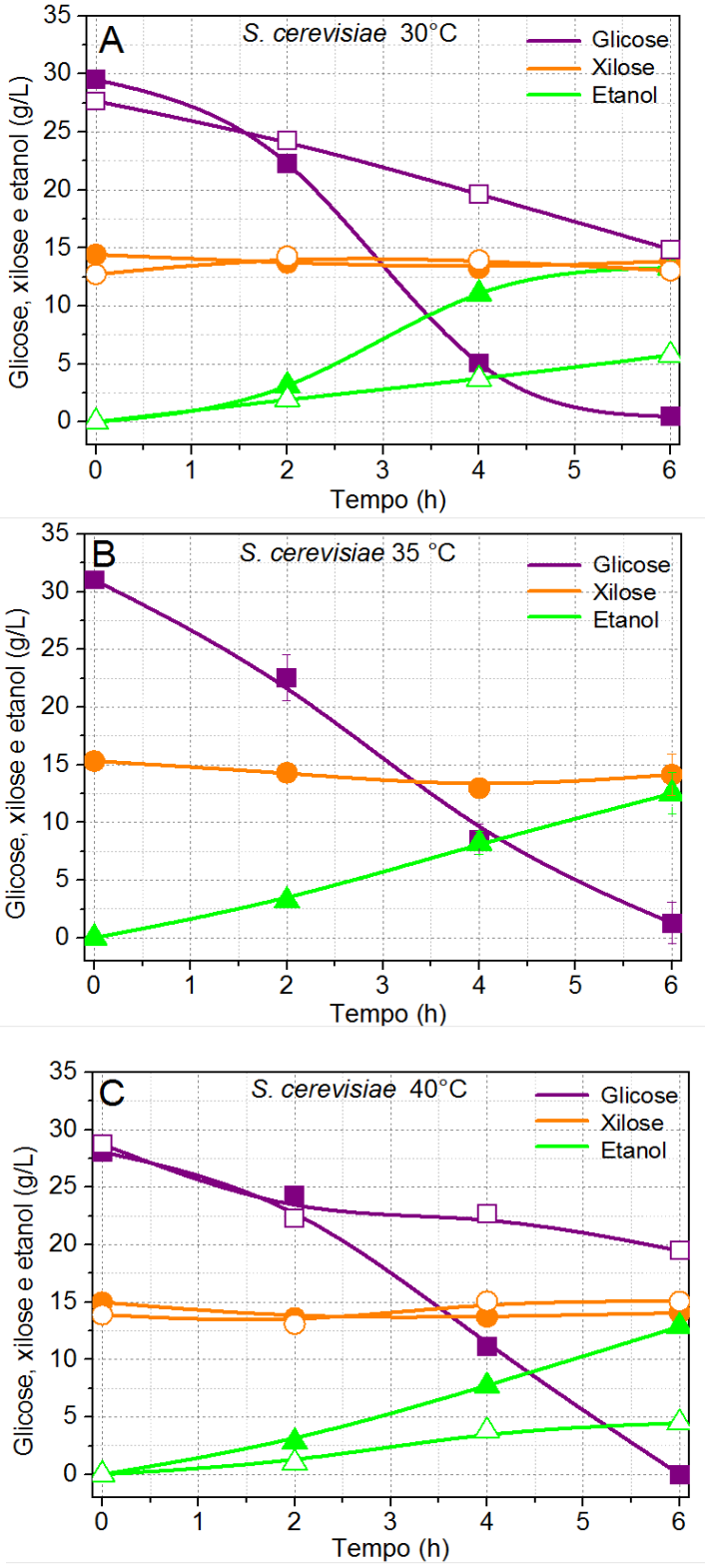


Fonte: Autor

Com relação ao perfil fermentativo de *S. cerevisiae* mostrado na Figura 5.7, observa-se que para o hidrolisado suplementado com nutrientes, nas 3 temperatura avaliadas, a levedura foi capaz de assimilar totalmente a glicose, após 6 horas, com uma produção média de etanol de 12 g/L. Estes resultados de produção de etanol são similares aos observados para *K. marxianus*, porém com um tempo de 2 horas a mais. Nota-se ainda que, quando o hidrolisado não foi suplementado com nutrientes, o perfil fermentativo de *S. cerevisiae* se mostrou muito mais limitado em comparação com *K. marxianus*, uma vez que sem suplementação, a produção de etanol por *S. cerevisiae* decresceu para 5,8 e 4,5 g/L durante o cultivo a 30 e 40ºC, respectivamente, devido ao baixo consumo de glicose pelas células. De acordo com a literatura, a temperatura ótima de fermentação para *S. cerevisiae* encontra-se na faixa de 30 a 35 °C (TAHERZADEH; KARIMI, 2015), porém, no presente trabalho, a linhagem PE-2 foi capaz de fermentar e produzir etanol a uma temperatura de 40°C a partir do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) suplementado com nutrientes. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que a linhagem PE-2 contem genomas (JAY 270 e JAY 291) que contribuem para sua adaptação em condições ambientais adversas, exibindo fenótipos desejáveis para a resistência a altas temperaturas, e a altas concentrações de etanol (ARGUESO et al., 2009)

O perfil fermentativo de uma linhagem industrial de *S. cerevisie* (UFPEDA 1238) em hidrolisado enzimático do bagaço de cana de açúcar foi estudado por Wanderley et al., (2013). Neste trabalho, o hidrolisado foi suplementado com nutrientes (4 g/L de extrato de levedura; 2 g/L de (NH4)2SO4; 2 g/L KH2PO4 e 0,75 g/L MgSO4·7H2O) e os ensaios foram realizados em pH de 5,5, na temperatura de 34°C. A produção de etanol obtida a partir de 27, 67 g/L de glicose foi de 10,17 g/L, mostrando um valor similar ao obtido no presente estudo com a linhagem PE-2 na mesma temperatura. No entanto, o tempo de fermentação da linhagem UFPEDA 1238 foi de 24 h, ou seja, cerca de 4 vezes superior ao da PE-2. Em outro estudo, Hernandez-Salas et al., (2009) avaliando a fermentabilidade do hidrolisado enzimático de resíduos de Agave empregando uma linhagem comercial de S. cerevisiae constataram uma baixa produção de etanol (6,3 g/L, após 48 h) a partir de 28,44 g/L de açucares redutores. Os autores suplementaram o meio com nutrientes minerais e o processo foi conduzido a 30°C. Estes resultados revelam o grande potencial da linhagem PE-2 para a produção de etanol a partir do hidrolisado enzimático de bagaço de cana obtido no presente estudo.

Figura 5.7- Perfil fermentativo da levedura *S. cerevisiae* PE-2 em três temperaturas diferentes com suplementação nutricional (símbolo cheio) e sem suplementação nutricional (símbolo vazio)

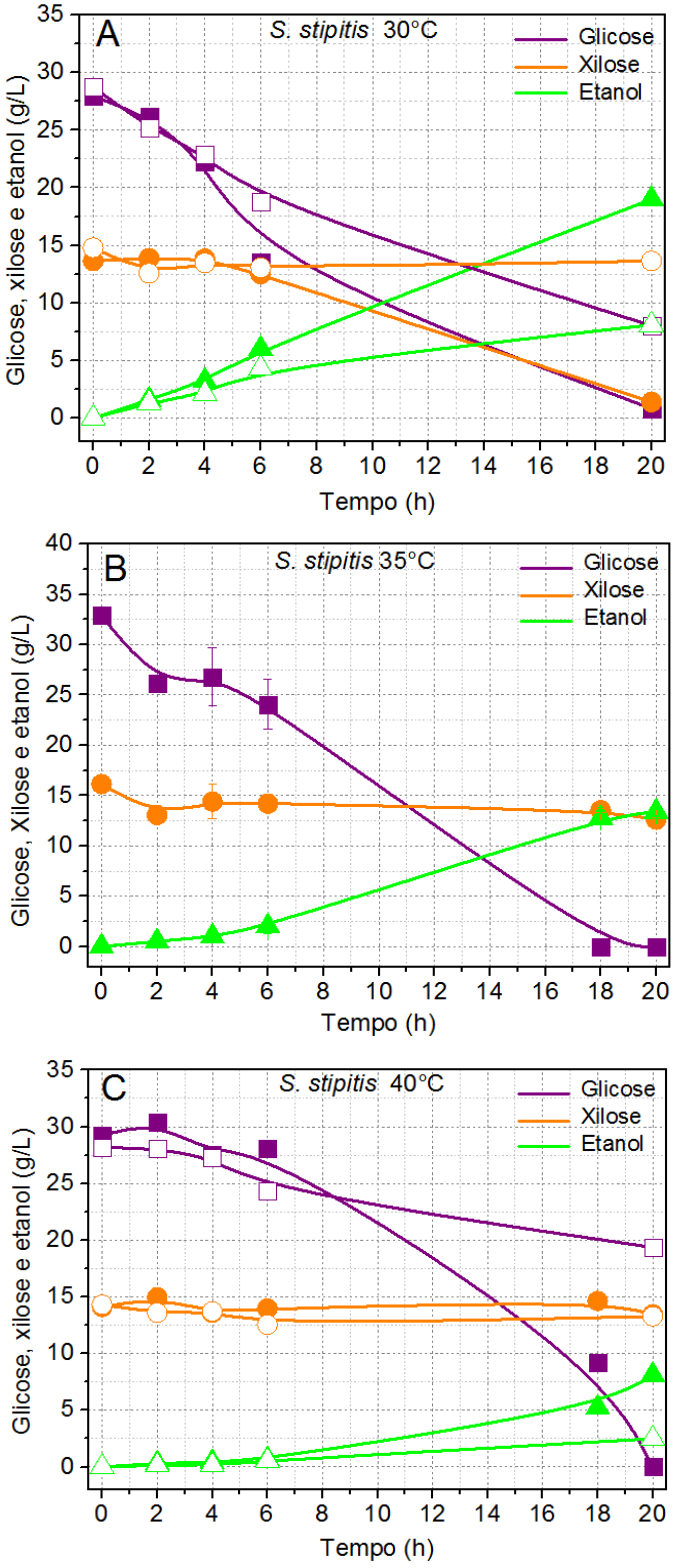


Fonte: Autor

Com o objetivo de selecionar um micro-organismo capaz de utilizar a maior parte dos açúcares presentes no hidrolisado enzimático de bagaço cana de açúcar, Martín et al., (2002b) compararam a fermentabilidade do hidrolisado com e sem tratamento de destoxificação empregando uma linhagem de *S. cerevisiae* isolada de uma planta de fermentação de licor sulfitico (ATCC 96581) e uma recombinante construída em laboratório para utilizar pentoses (TMB 3001). Os hidrolisados enzimáticos foram enriquecidos com nutrientes para eliminar qualquer deficiência nutricional e um elevado nível de inóculo (cerca de 4,0 g/L) para evitar a contaminação bacteriana. Os resultados mostraram uma melhor performance da estirpe recombinante TMB 3001 em comparação coma a isolada ATCC 96581 em hidrolisado não destoxificado, obtendo-se valores próximos de produção de etanol (7,4 e 8,2 g/L), a partir de 26 g/L de açucares totais, após 2 e 12 horas, respectivamente. Embora, os métodos de destoxificação avaliados tenham promovido melhorias na produção de etanol pela linhagem recombinante, o consumo de xilose durante a fermentação foi lento e incompleto. Segundo os autores, a baixa taxa de utilização de xilose durante a fermentação pode ser uma consequência da inibição competitiva do transporte de xilose pela glucose. Conforme reportado por Van Zyl et al., (1989) em *S. cerevisiae* a glucose e xilose compartilham o mesmo sistema de transporte, o qual tem uma afinidade muito maior pela glicose do que pela xilose. Estes resultados demonstram a importância da seleção das condições de cultivo em função da linhagem da levedura empregada e das características químicas do hidrolisado obtido.

Analisando a fermentabilidade do hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) pela levedura *S. stipitis* (Figura 5.8), verifica-se que após 20 horas de fermentação, apenas nos ensaios com suplementação nutricional, a glicose foi totalmente assimilada pela levedura. Nota-se ainda que, em meios não suplementados, o impacto da temperatura sobre o consumo desta hexose foi mais evidente, uma vez que com o aumento da temperatura de 30 para 40^{o}C, a concentração residual de glicose foi elevada de 8 para 19 g/L. Com relação a xilose, nota-se um baixo consumo desta pentose (< 20%), tanto nos hidrolisados não suplementados; independentemente da temperatura; quanto nos hidrolisados suplementados nas temperaturas de 35 e 40^{o}C. Ressalta-se ainda que a na temperatura de 40^{o}C, independentemente da suplementação nutricional, praticamente não ocorreu consumo de xilose, uma vez que a variação na concentração desta pentose ao final do processo foi de apenas 5%. Estes resultados sugerem uma forte influência de ambas as

Figura 5.8 - Perfil fermentativo da levedura *S. stipitis* Y-7124 em três temperaturas diferentes com suplementação nutricional (símbolo cheio) e sem suplementação nutricional (símbolo vazio).



Fonte: Autor

variáveis (temperatura e suplementação de nutrientes) sobre metabolismo de *S. stipitis* e que a condução do processo a 30ºC em hidrolisado suplementado, foi a condição que permitiu o consumo eficiente de ambos os açúcares (total de 94%) com uma produção de 19 g/L de etanol, após 20 horas. Nestas condições, observa-se que o consumo dos açúcares apresentou um comportamento sequencial; sendo primeiramente assimilada a glicose, e somente após 6 horas foi iniciado o consumo de xilose, e durante a fase de consumo simultâneo, a velocidade de assimilação de ambos os açúcares foi similar (cerca de 1 g/L.h).

Um comportamento semelhante ao observado no presente trabalho foi reportado por Biswas; Uellendahl e Ahring, (2013), com a levedura *S. stipitis* CBS6054 empregando o hidrolisado enzimático de bagaço de cana de açúcar pré-tratado com explosão úmida, contendo 17,3 g/L de glicose e 9,6 g/L de xilose. A assimilação de xilose foi iniciada após 10 horas de cultivo e somente após 38 horas de fermentação a levedura conseguiu esgotar ambos os açúcares do meio, atingindo neste tempo a máxima concentração de etanol (~ 20 g/L). Segundo os autores, a presença de glicose no meio estimula a assimilação de xilose, porém esta estimulação se dá quando a concentração de glicose é menor que 20 g/L. Este mesmo comportamento foi observado no presente estudo, uma vez que a assimilação de xilose por *S. stipitis* no hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) foi iniciada quando o meio apresentava uma concentração residual de glicose de 16 g/L.

Comparando a velocidade de consumo de glicose pelas 3 leveduras avaliadas no presente trabalho na mesma condição de fermentação (30°C com suplementação nutricional), é evidente a superioridade das leveduras *K. marxianus* e *S. cerevisiae* em relação a *S. stipitis*. No entanto, apenas *S. stipitis* Y-7124 foi capaz de consumir totalmente os açúcares presente no meio de fermentação, o que é um aspecto relevante para utilização de substratos lignocelulósicos na produção de etanol. A baixa velocidade de assimilação dos açúcares, certamente impacta o parâmetro de produtividade volumétrica, porém a capacidade de *S. stipitis* em assimilar ambos os açúcares (glicose e xilose) presentes no hidrolisado permitiu a obtenção de maiores níveis de etanol no meio (19 g/L) o que correspondeu a um aumento de 46%, quando comparado ao *K. marxianus* Y-6860 e *S. cerevisiae* PE-2 as quais atingiram uma concentração de etanol de 13 g/L em média.

Estes resultados são relevantes e sugerem que o potencial de *S. stipitis* para produção de etanol celulósico precisa ser explorado. De acordo com Agbogbo e Coward-Kelly, (2008), *S. stipitis* apresenta qualidades únicas que fazem desta levedura o organismo natural mais promissor para produção de etanol celulósico, sendo ainda necessário o desenvolvimento de estratégias que permitam melhorar as velocidades do processo. Dentre as principais características relevantes desta levedura, incluem: as exigências nutricionais menos rigorosas, a baixa formação de subprodutos e à grande resistência à contaminação. Ainda segundo os autores, o conhecimento das limitações para o transporte dos açúcares em *S. stipitis* poderá contribuir para as melhorias das velocidades do processo fermentativo.

Com base nos perfis fermentativos das leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae e S. stipitis,* em hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (BPNL) observados no presente trabalho, ficou evidenciado, de uma forma geral, que as condições de cultivo influenciam os parâmetros fermentativos, porém com impactos diferentes dependendo do tipo de levedura utilizada. Desta forma, para uma melhor análise dos resultados, a Tabela 5.9 apresenta de forma sumarizada os parâmetros fermentativos de *K. marxianus, S. cerevisiae e S. stipitis,* nas diferentes condições estudadas.

Na Tabela 5.9, estão apresentados os parâmetros fermentativos das leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae e S. stipitis* em hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (BPNL) com e sem adição de nutrientes em diferentes temperaturas, de acordo com o planejamento experimental.

Para a levedura *K. marxianus,* observa-se uma grande variação nos valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) em função das condições do planejamento (de 1,6 até 3,3 g/L.h). Nota-se que na ausência de nutrientes, o aumento da temperatura de 30 para 40^{o}C elevou o valor de Q_P de 1,6 para 2,1 g/L.h, porém na presença de nutrientes, este aumento de temperatura não afetou o valor deste parâmetro, o qual se manteve em torno de 3,0 g/L.h. Observa-se ainda que somente no ensaios 1 (sem adição de nutrientes e temperatura de 30^{o}C), o consumo de glicose pela levedura *K. marxianus* ficou abaixo de90%, indicando que o efeito da limitação nutricional do meio foi mais pronunciado na menor temperatura avaliada. Com relação ao fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$), os resultados revelaram um comportamento diferente do observado para o parâmetro Q_P, já que na presença de nutrientes o fator de conversão de glicose em etanol decresceu de 0,48 para 0,41 g/g com o aumento da temperatura de 30 para 40°C.

Tabela 5.9 - Parâmetros fermentativos das leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae* e *S. stipitis* em hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino com e sem adição de nutrientes em diferentes temperaturas.

Ensaios	Levedura	Variáveis Independentes		Parâmetros Fermentativos*							
		Temperatura (°C)	Suplementação de Nutrientes	Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	η (%)	G (%)	X (%)	G+X (%)	Q_G (g/L.h)	Q_X (g/L.h)
1	*K. marxianus* Y-6860	30	Não	1,6	0,41	80	86,4	6,4	59,4	3,75	0,13
2		40	Não	2,1	0,45	88	97,9	0,0	66,7	4,58	nc
3		30	Sim	3,3	0,48	95	95,9	5,6	65,6	6,54	0.18
4		40	Sim	3,2	0,41	81	97,3	13,5	69,1	7,25	0,43
5		35	Sim**	2,6±0,1	0,48±0,02	93±3,6	99,4±0,3	2,2±3,7	67,2±1,5	6,5±0,1	nc
6	*S. cerevisiae* PE-2	30	Não	1,0	0,45	89	46	0	31	2,11	nc
7		40	Não	0,8	0,49	95	32	0	22	1,54	nc
8		30	Sim	2,6	0,44	86	100	0	67	4,53	nc
9		40	Sim	2,1	0,46	90	100	0	65	4,68	nc
10		35	Sim**	1,8±0,02	0,37±0,02	73±3,7	96±5,7	0±0,0	65±3,3	5,0±0,1	nc
11	*S. stipitis* Y-7124	30	Não	0,40	0,37	73	72	8,1	50,2	1,03	0,06
12		40	Não	0,13	0,27	53	31	4,9	22,2	0,42	0,03
13		30	Sim	0,95	0,48	95	97	89,9	94,8	1,36	0,61
14		40	Sim	0,40	0,27	53	100	4,7	69,0	1,46	0,03
15		35	Sim**	0,67±0,02	0,37±0,02	72±3,0	100±0,0	22±1,4	74±0,5	1,64±0,0	0,18±0,

* Os valores dos parâmetros foram calculados no ponto de máximo do etanol; ** Ensaios do ponto central do planejamento, os quais foram suplementados com a metade dos níveis dos nutrientes; G = Glicose X = Xilose; Q_G e Q_X= velocidade de consumo de glicose e xilose respectivamente (g/L.h); nc = não consumido

Para a levedura *S. cerevisiae* (Tabela 5.9), os valores de Q_P mostraram uma variação de 0,8 a 2,6 g/L.h, sendo observado um favorecimento deste parâmetro no menor nível de temperatura avaliada e na presença de nutrientes. Nota-se ainda nesta tabela que, com exceção dos ensaios realizados a 35ºC, o qual continha a metade do nível dos nutrientes, o fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) apresentou valores elevados (>0,45 g/g). No entanto, o consumo total da glicose foi bastante reduzido na ausência de nutrientes (consumo <50%), sendo o menor valor (32%) obtido na maior temperatura de fermentação avaliada.

Estes resultados podem se comparar a os reportados por Da silva et al., (2010) quem publicaram um Q_P=3,42 g/L.h e $Y_{P/S}$=0,44 g/g após 4 horas de cultivo pela cepa industrial *S. cerevisiae* IR-2, empregando hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado fisicamente em moinho de bolas contendo glicose (29,8 g/L) e xilose (16,9 g/L)suplementado com nutrientes a uma temperatura de 30°C. Embora o Q_P foi maior ao obtido no presente trabalho o $Y_{P/S}$ foi inferior, no em tanto as diferenças entre os resultados se atribuem a cepa empregada como ao tipo de pré-tratamento.

No que refere a fermentação do hidrolisado por *S. stipitis*, verifica-se que os valores de Q_P variaram entre 0,13 e 0,95 g/L.h, sendo o maior valor deste parâmetro, o qual foi observado na temperatura de 30ºC e presença de nutrientes, foi cerca de 3 vezes inferior aos obtidos com *K. marxianus* e *S. cerevisiae.* É importante ainda ressaltar que para *S. stipitis*, os valores de $Y_{P/S}$ mostraram grandes variações (0,27 a 0,48 g/g) e que este parâmetro foi afetado tanto pelo aumento da temperatura quanto pela ausência de nutrientes no meio. Dentre todas as condições avaliadas com a *S. stipitis* os melhores resultados (Q_P = 0,95 g/L.h, $Y_{P/S}$ = 0,48 g/g, Q_G =1,36g/L.h, Q_X= 0,61g/L.h) foram observados na temperatura de 30°C com suplementação nutricional.

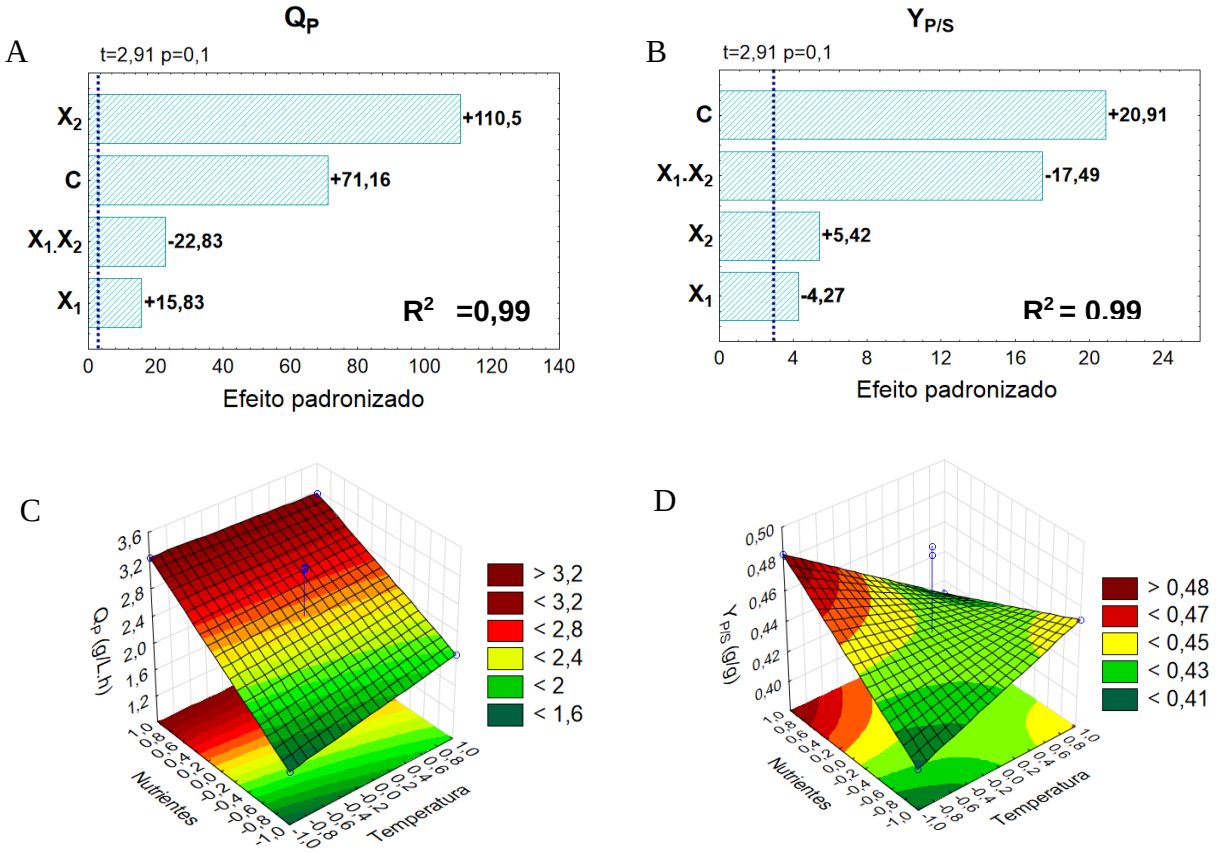
Comparando a fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana com as 3 leveduras avaliadas, verifica-se que mesmo sem suplementação nutricional a 40ºC (ensaio 2) a levedura *K. marxianus* foi capaz de consumir eficientemente a glicose presente no meio (> 90%) apresentando elevados valores para o fator de conversão e produtividade volumétrica em etanol ($Y_{P/S}$ = 0,45 g/g; Q_P = 2,1 g/L.h) com uma eficiência de 88%. Desse modo, pode-se inferir que o hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) possui nutrientes essenciais para o crescimento e metabolismo da levedura *K. marxianus*, possibilitando um bom desempenho fermentativo mesmo sem suplementação nutricional. No entanto, apenas a produtividade volumétrica pode ser sensivelmente melhorada com a adição de nutrientes ao hidrolisado.

Devido às diferenças observadas nos perfis fermentativos das leveduras *K. marxianus* Y-6860, *S. cerevisiae* PE-2 *e S. stipitis* Y-7124 durante os cultivos nos hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana, frente as variações nas condições de temperatura e suplementação nutricional, uma análise estatística foi realizada para avaliar os efeitos destas variáveis sobre os parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ e Q_P) para cada levedura. A significância dos efeitos foi determinada pelo teste *t* (teste de *Student*) ao nível de confiança de 90%, e para uma melhor interpretação do comportamento das respostas em função das variáveis significativas, são também apresentadas as superfícies de resposta, conforme mostrado nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11

Como pode ser visto na Figura 5.9 A e B, para a levedura *K. marxianus* Y-6860, a variável temperatura (X_1) e suplementação nutricional do hidrolisado (X_2), assim como sua interação ($X_1.X_2$) apresentaram efeitos significativos sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e o fator de conversão ($Y_{P/S}$). Analisando o parâmetro Q_P, nota-se que tanto a suplementação nutricional quanto a temperatura apresentaram sinal positivo, sendo que o valor do efeito estimado para a variável suplementação nutricional (+110,5) foi cerca de 7 vezes maior do que o estimado para a temperatura (+15,83), indicado que a suplementação nutricional tem maior impacto sobre Q_P do que a variação de temperatura. No entanto, o efeito da interação entre estas variáveis ($X_1.X_2$) mostrou um sinal negativo (-22,83), sugerindo um comportamento antagônico ao efeito principal das variáveis que foi positivo, ou seja, os que maiores valores de Q_P podem ser obtidos em hidrolisado suplementado com nutrientes na menor temperatura de fermentação (30°C), mas este mesmo aumento não pode ser verificado no hidrolisado sem suplementação na maior temperatura. Este comportamento pode ser melhor visualizado através da superfície de resposta mostrado na Figura 5.9 C.

Com relação ao parâmetro $Y_{P/S}$, verifica-se que o efeito de interação entre as variáveis ($X_1.X_2$) foi o que apresentou o maior valor, sendo também de sinal negativo (-17,49), evidenciando a elevada dependência destas variáveis sobre o fator de conversão em etanol. De fato, o perfil da superfície de resposta para este parâmetro (Figura 5.9D) revelou a existência de 2 regiões distintas que apresentam elevados valores de $Y_{P/S}$, sendo estas, no menor nível de temperatura 30°C com o hidrolisado suplementado e no maior nível de temperatura 40°C empregando o hidrolisado sem suplementação nutricional. Porém, no menor nível de temperatura 30°C com o hidrolisado suplementado os valores de $Y_{P/S}$ se mostraram sensivelmente maiores.

Figura 5.9 - Gráfico de Pareto (A e B) e perfil das superfícies de resposta (C e D) para a estimativa dos efeitos da temperatura (X_1); suplementação nutricional (X_2), interação ($X_1.X_2$) e C (curvatura) sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para a levedura *K. marxianus* Y-6860. Efeitos acima da linha de p = 0,1 no gráfico de Pareto são significativos ao nível de 90% de confiança.



Fonte: Autor

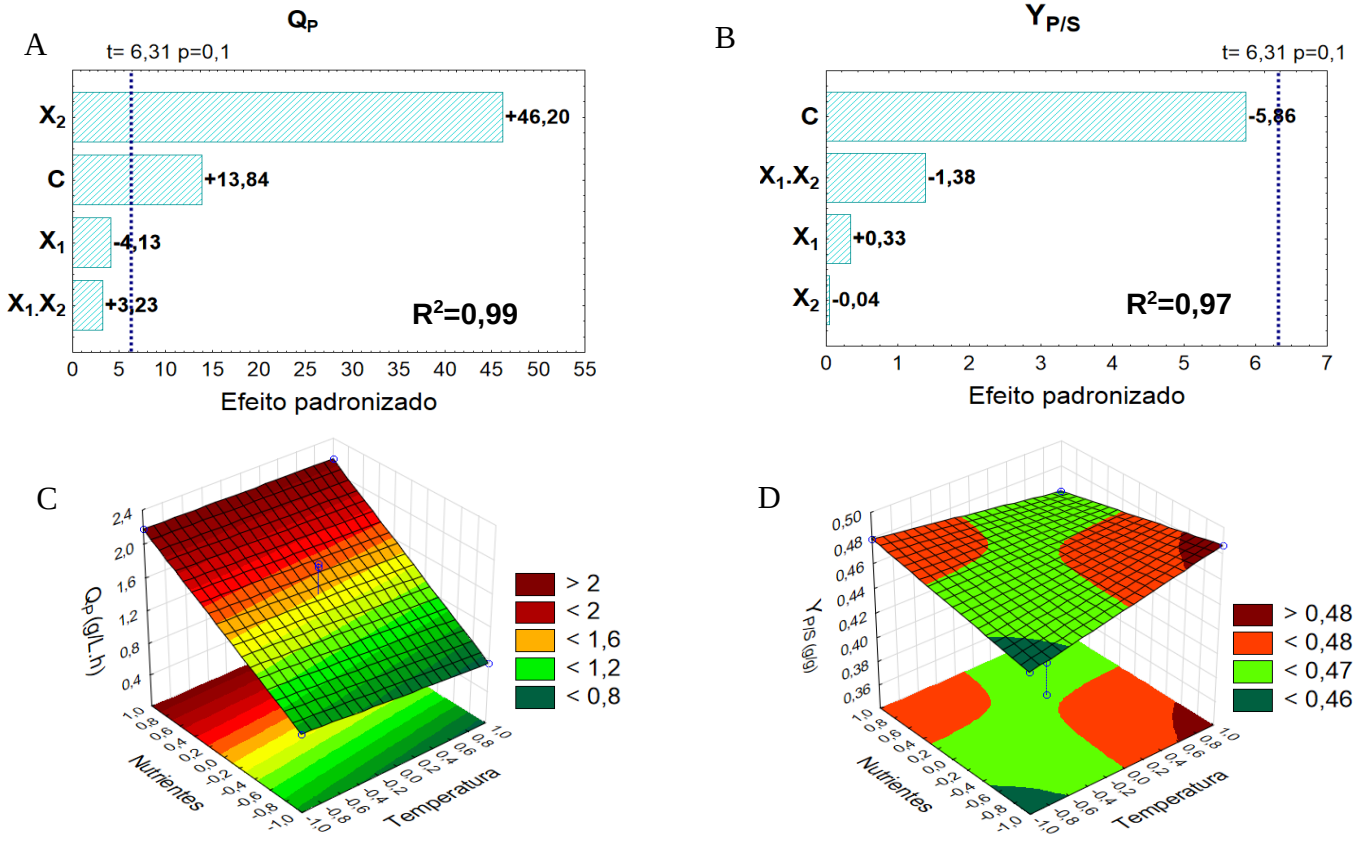
A significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* (Q_P e $Y_{P/S}$), em hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado (BPNL) foi confirmada através de uma análise de variância (ANOVA), a qual pode ser visualizada no apêndice A (Tabela A.1 e A.2). Vale ressaltar que para ambas as respostas avaliadas; Q_P e $Y_{P/S}$, foi constatado um efeito significativo da curvatura, indicando que o comportamento das variáveis poderiam ser melhor explicados através de modelos quadráticos. No entanto, a construção de modelos mais complexos exigiria a realização de um número maior de experimentos, o que não se justificaria, visto que, o parâmetro $Y_{P/S}$ atingiu um valor muito próximo ao teórico (0,48 g/g) empregando o hidrolisado suplementado na temperatura de 30°C, e nestas condições, o parâmetro produtividade volumétrica (Q_P) foi também favorecido. Desta forma, os modelos matemáticos para descrever as respostas produtividade volumétrica Q_P e fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$, para *K. marxianus* Y-6860 dentro da região estudada, podem ser apresentados pelas equações 20 e 21, respectivamente.

$$Q_P = 2{,}51 + 0{,}098X_1 + 0{,}69X_2 - 0{,}14X_1.X_2 \quad (20)$$

$$Y_{P/S} = 0{,}43 - 0{,}007X_1 + 0{,}008X_2 - 0{,}028X_1.X_2 \quad (21)$$

Analisando os efeitos relativos a fermentação da levedura *S. cerevisiae* PE-2, observa-se através do gráfico de Pareto (Figura 5.10 A) e da superfície de resposta (Figura 5.10 C) que apenas a suplementação nutricional (X_2) apresentou efeito significativo e positivo (+46,20) sobre a produtividade volumétrica em etanol, indicando que os maiores valores de Q_P, podem ser obtidos quando o hidrolisado é suplementado com nutrientes, independentemente do nível de temperatura. Por outro lado, o parâmetro $Y_{P/S}$ (Figura 5.10 B e D) não foi influenciado pelas variáveis estudadas (temperatura e suplementação nutricional), devido a pequena variação nos valores deste parâmetro (0,46 a 0,48 g/g) na região experimental estudada. A significância estatística dos efeitos sobre o parâmetro Q_P no processo de produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, foi confirmada através de análise de variância (apêndice A, Tabela A.3), que apresentou um elevado coeficiente de determinação (R^2 = 0,99). Esta análise demostra uma concordância entre os resultados experimentais e os valores teóricos previstos pelos modelos matemáticos, os quais estão representados pelas equações 22 e 23, respectivamente.

Figura 5.10 – Gráfico de Pareto (A e B) e perfil das superfícies de resposta (C e D) para a estimativa dos efeitos da temperatura (X_1); suplementação nutricional (X_2), interação ($X_1.X_2$) e C (curvatura) sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para a levedura *S. cerevisiae* PE-2. Efeitos acima da linha de p = 0,1 no gráfico de Pareto são significativos ao nível de 90% de confiança.



Fonte: Autor

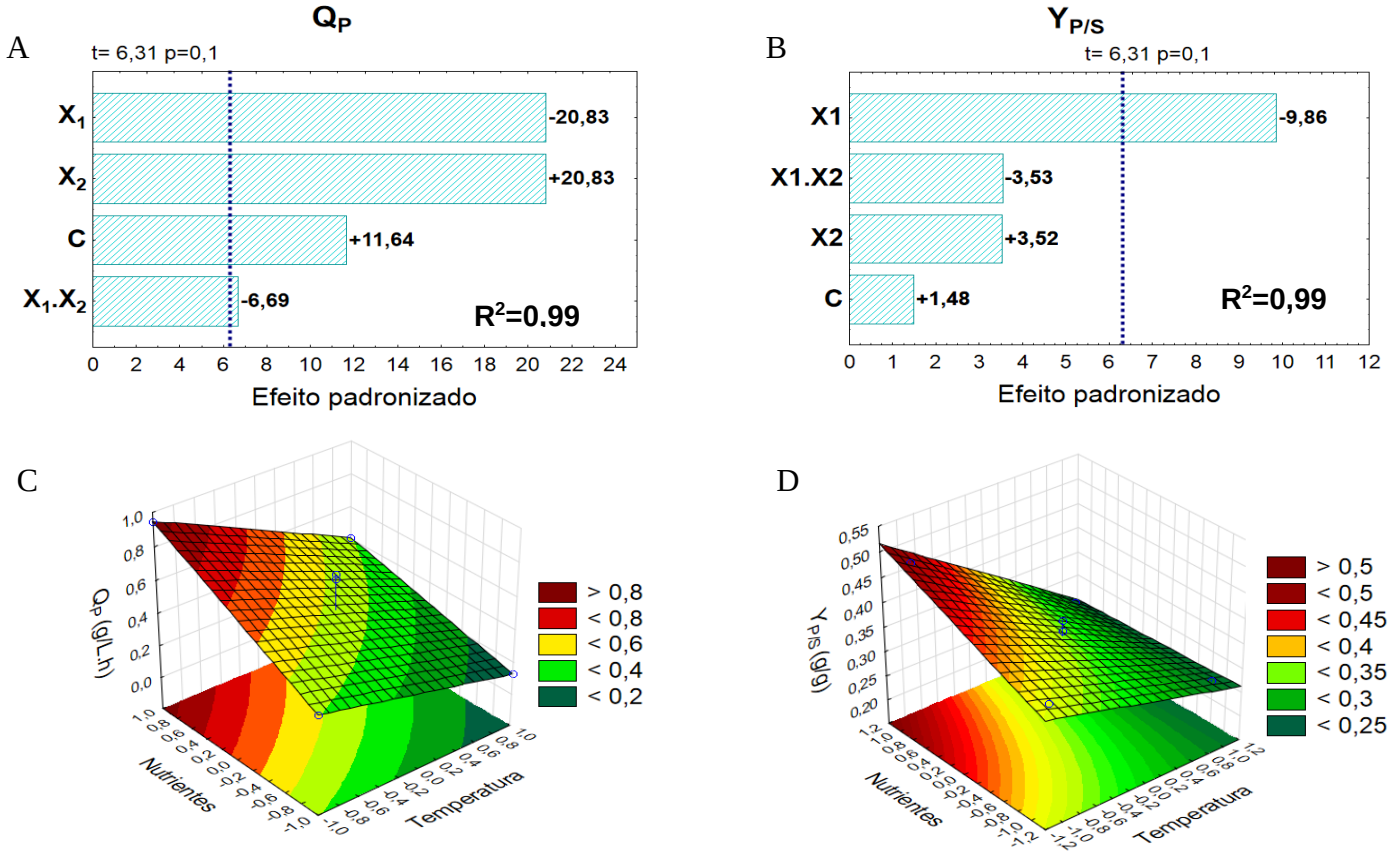
$$Q_P = 1{,}5 + 0{,}05X_1 + 0{,}65X_2 - 0{,}04X_1.X_2 \quad (22)$$

$$Y_{P/S} = 0{,}46 - 0{,}003X_1 + 0{,}004X_2 - 0{,}013X_1.X_2 \quad (23)$$

Vale ressaltar que, embora tenha sido observado elevados valores de $Y_{P/S}$ na região experimental estudada, a assimilação de glicose pela levedura nas condições em que se empregou o hidrolisado não suplementado foi incompleta (<50%), e portanto para a seleção das condições ótimas do processo deve-se levar em consideração a resposta produtividade volumétrica. Desta forma, os melhores resultados podem ser obtidos empregando o hidrolisado suplementado, independentemente da temperatura de fermentação.

O efeito da temperatura e suplementação de nutrientes ao hidrolisado sobre os parâmetros fermentativos de *S. stipitis* Y-7124 esta apresentado na Figura 5.11 A. Como se pode observar, ambas as variáveis apresentaram efeito principal e de interação significativo ao nível de 90% de confiança sobre o parâmetro Q_P, enquanto que para $Y_{P/S}$, apenas o efeito da temperatura, de sinal negativo, foi significativo. Observa-se ainda que o tamanho do efeito principal das variáveis X_1 e X_2 sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), foram similares (20,83), porém com sinais distintos, sendo negativo para a temperatura (X_1) e positivo para a suplementação nutricional (X_2). Estes resultados revelam a relevância de ambas as variáveis sobre o Q_P. Considerando ainda que, o efeito da interação (X_1 X_2) sobre o Q_P é negativo e que, o parâmetro $Y_{P/S}$ foi influenciado apenas pela temperatura com sinal negativo, pode-se inferir que os maiores valores de Q_P e $Y_{P/S,}$ podem ser obtidos na menor temperatura (30°C) empregando o hidrolisado enzimático de bagaço de cana suplementado com nutrientes. As superfícies de resposta mostradas na Figura 5.11 C e D mostram claramente que o aumento da temperatura e a suplementação nutricional favoreceu linearmente o aumento de Q_P e $Y_{P/S}$. Como já discutido anteriormente, o efeito de curvatura, embora significativo, não justificaria a realização de ensaios para uma modelagem quadrática, A significância estatística dos efeitos e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos QP e YP/S, no processo de produção de etanol por *S. stipitis* Y-7124 foi confirmada através de análise de variância (ANOVA) (Apendice A, Tabela A.5 e A.6) com um coeficiente de determinação elevado (R2 = 0,99). Assim, as respostas produtividade volumétrica (QP) e fator de conversão de substrato em produto (YP/S) para a levedura *S. stipitis* Y-7124, dentro da região estudada, pode ser descrita pelas equações 24 e 25, respectivamente.

Figura 5.11 - Gráfico de Pareto (A e B) e perfil das superfícies de resposta (C e D) para a estimativa dos efeitos da temperatura (X_1); suplementação nutricional (X_2), interação ($X_1.X_2$) e C (curvatura) sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) para a levedura *S. stipitis* Y-7124. Efeitos acima da linha de p = 0,1 no gráfico de Pareto são significativos ao nível de 90% de confiança.



Fonte: Autor

$$Q_P = 0{,}47 - 0{,}206X_1 + 0{,}20X_2 - 0{,}06X_1.X_2 \quad (24)$$

$$Y_{P/S} = 0{,}34 - 0{,}07X_1 + 0{,}027X_2 - 0{,}027X_1.X_2 \quad (25)$$

A Tabela 5.10 sumariza as condições selecionadas para a fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) pelas leveduras *K. marxianus*Y-6860, *S. cerevisiae* PE-2 e *S. stipitis* Y-7124, conforme resultados previstos pelos modelos. Vale destacar que, para as leveduras *S. cerevisiae* PE-2 e *S. stipitis* Y-7124que são espécies mesófilas, o melhor desempenho foi confirmado na faixa de temperatura de 30 a 35°C, enquanto que para *K. marxianus* Y-6860, que é uma espécie termotolerante, além da temperatura de 30°C, esta levedura mostrou um excelente desempenho a 40°C.

Tabela 5.10 - Sumário dos melhores resultados de fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito (BPNL) pelas as leveduras *K. marxianus* Y-6860, *S. cerevisiae* PE-2 e *S. stipitis* Y-7124.

Leveduras	Condições de Fermentação		Parâmetros	
	Temperatura (°C)	Suplementação Nutricional[a]	Q_P (g/Lh)	$Y_{P/S}$ (g/g)
K. marxianus Y-6860	30	+	3,25	0,48
	40	+	3,16	0,41
S. cerevisiae PE-2	30	+	2,17	0,48
	40	+	2,14	0,45
S. stipitis Y-7124	30	+	0,95	0,48
	35	+[b]	0,46	0,36

[a] 2,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1,0 g/L de KH_2PO_4, 0,3 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 5,0 g/L de extrato de levedura); [b] metade da concentração dos nutrientes.

No que se refere aos valores dos parâmetros fermentativos da levedura *K. marxianus* Y-6860 na temperatura de 30°C obtidos no presente trabalho, foram superiores aos reportados por Castro e Roberto, (2014) durante um processo de sacarificação e fermentação simultânea empregando a mesma linhagem também a 30°C em hidrolisado enzimático de palha de arroz pré-tratada com ácido diluído (Q_P= 0,51 g/L.h e $Y_{P/S}$=0,14 g/g) após 12 horas. Esta diferencia no resultado apesar de empregar a mesma linhagem pode ser explicada tanto pelo tipo de pré-tratamento da biomassa como o tipo de processo fermentativo.

Os resultados obtidos com a levedura *S. cerevisiae* PE-2 podem ser comparados aos reportados por Da Silva et al., (2010) empregando uma cepa industrial *S. cerevisiae* IR-2. As fermentações foram realizadas a 30°C em hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado com moinho de bolas suplementado com nutrientes contendo 29,8 g/L de glicose e 16,9 g/L de xilose. Os autores encontraram um valor de Q_P de 3,42 g/L.h, cerca de 57% superior ao obtido pela PE-2, porém com um fator de conversão sensivelmente inferior ($Y_{P/S}$=0,44 g/g).

Com relação aos parâmetros de *S. stipitis* Y-7124 na temperatura de 30°C, os resultados se mostram superiores aos obtidos por Buaban et al., (2010) durante a fermentação de *S. stipitis* BCC15191, nesta mesma temperatura, em hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado com moinho de bolas contendo glicose (15 g/L) e xilose (6 g/L) suplementado com nutrientes (Q_P= 0,35 g/L.h e $Y_{P/S}$=0,29 g/g) após 24 horas. Em outro trabalho Biswas; Uellendahl; Ahring, (2013) observaram uma produção máxima de etanol após 36 horas com linhagem *S. stipitis* CBS6054 (Q_P= 0,28 g/L.h e $Y_{P/S}$=0,39 g/g) a 30°C em hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor contendo glicose (17,3 g/L) e xilose (9,6 g/L) também suplementado com nutrientes. Estas diferenças nos resultados podem ser explicadas tanto pelo tipo de pré-tratamento da biomassa quanto pela cepa empregada.

5.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana com alta concentração de glicose

Um dos principais desafios para a viabilização da produção de etanol celulósico é a obtenção de elevadas concentrações de etanol (≥50 g/L), o que requer uma concentração inicial de substrato de no mínimo 100 g/L. De acordo com Nguyen et al., (2016) estes níveis de etanol contribuem para reduzir a demanda energética necessária ao processo de downstream. Dentro deste contexto, são desejáveis microrganismos resistentes às diferentes condições de estresse impostas pelo próprio processo de fermentação, incluindo o efeito osmótico devido à alta concentração de açúcar e o efeito de inibição pelo produto causado pela elevada concentração de etanol no meio (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Para verificar a capacidade fermentativa das leveduras *K. marxianus* Y-6860, *S. cerevisiae* PE-2

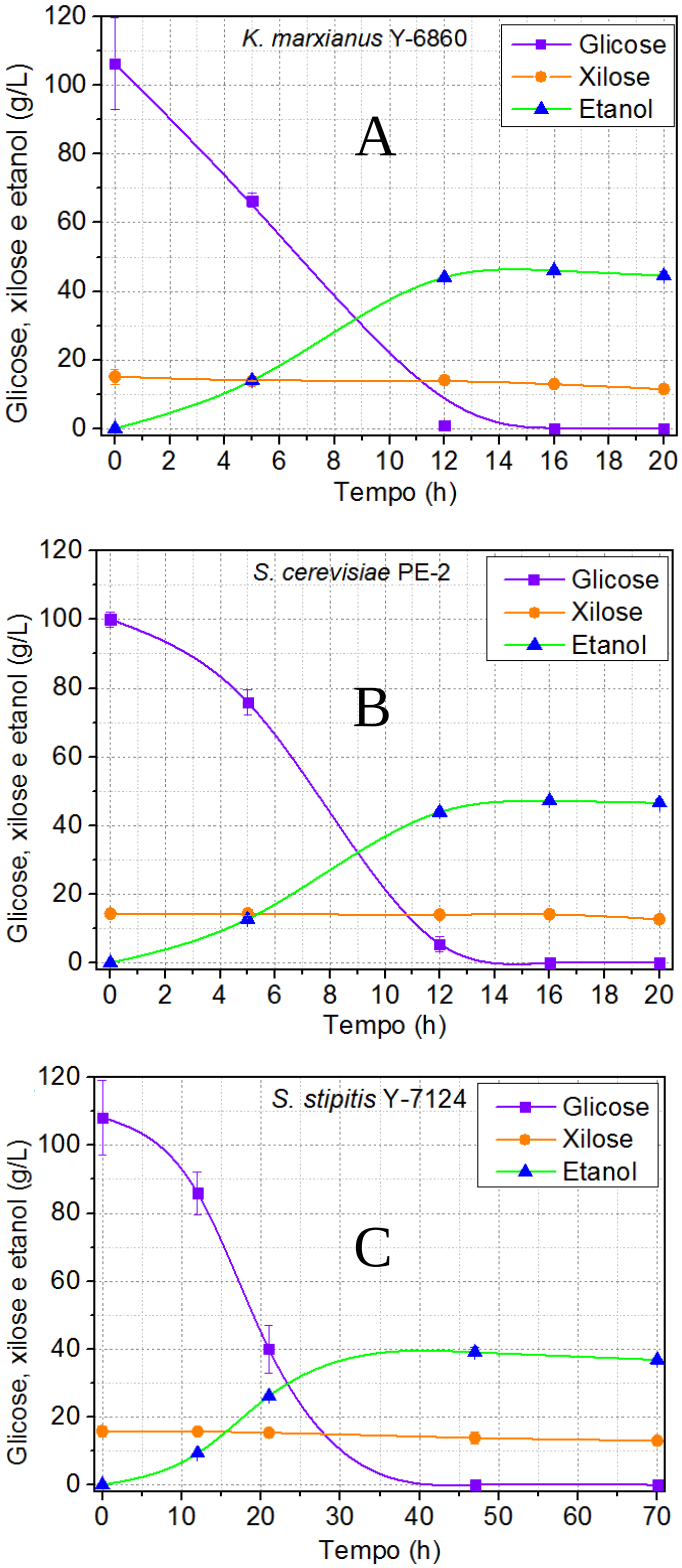
e *S. stipitis* Y-7124 em hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (BPNL) com elevada concentração de glicose, o meio foi suplementado com glicose comercial para atingir uma concentração de 100 g/L. Nesta etapa, o hidrolisado foi suplementado com os mesmos nutrientes avaliados anteriormente e a fermentação foi conduzida a 30ºC. A Figura 5.12 mostra o perfil fermentativo das leveduras nestas condições de processo.

De forma geral, observa-se que as três leveduras avaliadas foram capazes de fermentar o hidrolisado enzimático do bagaço de cana com cerca de 100 g/L de glicose e que, as leveduras *K. marxianus* Y-6860 e *S. cerevisiae* PE-2 tiveram um desempenho fermentativo similar. Para estas duas leveduras, a glicose foi totalmente consumida após 12 horas de cultivo com uma produção máxima de etanol em torno de 46 g/L. Já a levedura *S. stipitis* Y-7124 necessitou de 35 horas de cultivo para total assimilação de glicose, apresentando neste tempo uma concentração de etanol em torno de 40 g/L. Destaca-se ainda que as leveduras *K. marxianus* Y-6860 e *S. stipitis* Y-7124 apresentaram um pobre consumo de xilose (< 15%), o que pode ser explicado pela elevada concentração de glicose.

Analisando os parâmetros fermentativos mostrados na Tabela 5.11 verifica-se que as leveduras *K. marxianus* e *S. cerevisiae* apresentaram melhores resultados frente a *S. stipitis* atingindo valores similares de produtividade volumétrica em etanol (3,9 g/L.h), os quais foram aproximadamente 3 vezes maior do que o obtido com a levedura *S. stipitis*.

Os parâmetros fermentativos observados para *K. marxianus* Y-6860 em hidrolisado enzimático de bagaço de cana foram inferiores aos observados por YANASE et al., (2010) empregando a levedura *K. marxianus* NBRC1777. Os autores obtiveram em meio semi-definido contendo 100 g/L de glicose a 30°C uma concentração máxima de etanol de 47,4 g/L com 8 h (Q_P = 5,92 g/L.h, e η = 92,9%). Em outro estudo empregando a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 em meio semi-definido LARK et al., 1997 relataram um produção de 50 g/L de etanol a parir de 100 g/L de glicose (Q_P = 6,25 g/L.h e η = 87%). Vale destacar que os melhores resultados em produtividade volumétrica das diferentes cepas *K. marxianus* reportadas na literatura podem ser atribuídas a utilização do meio semi-definido, que ao contrário do hidrolisado enzimático de bagaço de cana utilizado no presente estudo, apresenta uma composição complexa e com substancias inibitórias. -

Figura 5.12 - Perfil fermentativo *K. marxianus* Y-6860 (A); *S. cerevisiae* PE-2 (B) e *S. stipitis* Y-7124 (C) em hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (BPNL), a partir de 100 g/L de glicose e temperatura de 30°C.



Fonte: Autor

Tabela 5.11 - Parâmetros fermentativos das leveduras *K. marxianus*, *S. cerevisiae* e *S. stipitis* em hidrolisado enzimático de bagaço de cana com 100 g/L de glicose a 30°C.

Parâmetros	**Leveduras**		
	K. marxianus [1]	***S. cerevisiae***	***S. stipitis*** [1]
t_f (h)	12	12	35
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,44	0,47	0,36
Q_P (g/L.h)	3,9	3,9	1,10
Q_{Gli} (g/L.h)	8,7	8,3	3,1
Q_{Xil} (g/L.h)	0,1	0	0,1
η (%)	87	92	72

t_f = tempo para atingir a máxima concentração de etanol; Q_G = velocidade de consumo de glicose; Q_{Xil} = velocidade de consumo de xilose; [1] $Y_{P/S}$ calculado a partir de glicose e xilose.

Os parâmetros fermentativos observados com a levedura S. cerevisiae PE-2 foram superiores aos obtidos por SILVA et al., (2015), que utilizaram esta mesma linhagem, porém, em hidrolisado enzimático de bagaço obtido a partir de outro procedimento de pré-tratamento (Q_P = 1,94 e η = 85,4%). Estes resultados revelam que variações no pré-tratamento da biomassa interferem na fermentabilidade destes meios.

Com relação aos valores dos parâmetros fermentativos obtidos com a levedura *S. stipitis* Y-7124 em hidrolisado enzimático de bagaço de cana se comparam aos reportados Okonkwo et al., (2016) empregando a levedura *S. stipitis* Y-1551. Os autores obtiveram em meio semi-definido contendo 200 g/L de glicose a 30°C uma concentração máxima de etanol de 49,12 g/L com 133 h (Q_P = 0,37 g/L.h, e η = 72%), embora os autores inicialmente empregaram o dobro de concentração de glicose com relação ao presente trabalho, a levedura *S. stipitis* Y-1551 só consumiu 131,40 g/L atingindo um valor de Q_P inferior e eficiência similar.

Com base nos resultados obtidos anteriormente, pode-se afirmar que as leveduras *K. marxianus* Y-6860, *S. cerevisiae* PE-2 e *S. stipitis* Y-7124, apresentam uma elevada capacidade de fermentar altas concentrações de glicose em hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino (não lavado). Entretanto estratégias para estimular o consumo de xilose, pelas leveduras *K. marxianus* Y-6860 e *S. cerevisiae* PE-2 devem ser estudadas para o aproveitamento integral desta biomassa.

Uma das estratégias que se podem implementar para a utilização tanto da glicose como da xilose do hidrolisado enzimático do BPNL para a produção de etanol, seria a co-cultura, de *S. stipitis* com *K. marxianus* ou a co-cultura de *S. stipitis* com *S. cerevisiae*. Na fermentação com co-cultura requer que a levedura fermentadora de pentoses e a levedura fermentadora de hexoses sejam inoculadas ao mesmo tempo e cresçam juntas (CHANDRAKANT; BISARIA, 1998). Segundo Chen, (2011) este tipo de estratégia poderia incrementar os rendimentos de produção de etanol, diminuir o tempo de fermentação e reduzir custos do processo. No em tanto também existe a dificuldade de proporcionar as condições ótimas ambientais a ambos microrganismos simultaneamente (CHANDRAKANT; BISARIA, 1998).Um estudo realizado por Rouhollah et al., (2007) em um meio semi-definido contendo uma concentração total de açúcares de 80g/L (30g/L de glicose, 30 g/L de xilose, 13 g/L de manose e 7g/L de galactose) a 30°C, avaliou a fermentabilidade das leveduras *S. stipitis* CCUG18492 , *K. marxianus e S. cerevisiae* comercial tanto individualmente como a co-cultura *S. stipitis- K. marxianus* e *S. stipitis- S. cerevisiae*. Individualmente as leveduras *S. stipitis, K. marxianus e S. cerevisiae* atingiram uma eficiência de 78, 70 e 62% respectivamente, com esgotamento total dos açúcares no meio, com exceção da *S. cerevisiae* que não assimilou xilose. Quando os autores avaliaram a co- cultura de *S. stipitis- K. marxianus* no mesmo meio, notaram uma melhoria na eficiência na produção de etanol atingindo um valor de 80% com depleção total dos açúcares disponíveis, e além foi superior comparada a co-cultura de *S. stipitis- S. cerevisiae* a qual atingiu um 70% de eficiência, e deixou xilose residual no meio (5 g/L), no em tanto os autores ressaltaram que o tempo de fermentação da *S. stipitis* decresceu de 72 horas para 62 horas quando a fermentação foi em co-cultura com a *S. cerevisiae.*

Outra estratégia que se poderia implementar para o eficiente consumo de ambos açúcares do hidrolisado seria a fermentação sequencial. Esta estratégia consiste em inocular um microrganismos que utiliza hexoses primeiramente, e seguidamente se inocule u outro microrganismos que assimile pentoses (CHANDRAKANT; BISARIA, 1998). Um estudo

realizado por Li et al., (2011) para converter os açúcares (glicose e xilose) contida no hidrolisado enzimático da palha de arroz pré-tratada em etanol em um processo de sacarificação e fermentação simultânea os autores empregaram a estratégia de fermentação sequencial utilizando as leveduras *S. cerevisiae* NBRC 0224 e *S. stipitis* NBRC 10063 a uma temperatura de 30°C. Para isso os autores primeiramente inocularam a levedura *S. cerevisiae* NBRC 0224 por um tempo de 24 horas, no qual a levedura fermentou praticamente toda a glicose atingindo uma produção de 19,1 g de etanol a partir de 100 g de palha de arroz, logo a *S. cerevisiae* NBRC 0224 foi inativada por aquecimento a 50°C por um tempo de 6 horas, e após diminuir a temperatura para 30°C a levedura *S. stipitis* NBRC 10063 foi inoculada no meio para fermentar a xilose, a qual produz 4,7 g de etanol, no geral os autores atingiram uma concentração final de etanol de 21,1g/L e um rendimento na produção e etanol a partir de glicose e xilose de 72,5%, segundo os autores este valor é superior a outros estudos (54-64%) quando fermentam materiais lignocelulósicos no processo de sacarificação e fermentação simultânea e afirmam que um a fermentação sequencial é uma estratégia que pode ser usada para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos em regiões onde o uso de microrganismos recombinantes aplicados em grande escala é restrito.

6 CONCLUSÕES

- O pré-tratamento com sulfito alcalino no bagaço de cana-de-açúcar, não produz perdas consideráveis das frações polissacarídeas e seu efeito principal é a remoção parcial da lignina e quase total dos grupos acetil.
- Os máximos valores de conversão da celulose e da xilana podem ser obtidos em diferentes cargas de enzimas, em função do extrato enzimático empregado, sendo beneficiado com extrato Cellubrix suplementado com novozyme 188 na carga de 18 FPU/g de biomassa e com o extrato CellicCtec2 na carga de 5 FPU/g de biomassa.
- A fermentabiliade do hidrolisado enzimático do bagaço de cana pré-tratado com sulfito pela levedura *K. marxianus* Y-6860 mostrou grande potencial para a produção de etanol apenas a partir da glicose, pelo que se devem buscar estratégias para estimular o consumo de xilose.
- A etapa de lavagem do bagaço de cana anterior ao seu refinamento durante o pré-tratamento não proporciono um material com características mais favoráveis para os processos de sacarificação enzimática e fermentação, pelo que poderia ser omitida do processo.
- Os parâmetros fermentativos obtidos pelas leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae* e S. *stipitis* na fermentação do hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino não lavado (BPNL) são influenciados pelas condições do cultivo, sendo favorecidos quando há suplementação nutricional no meio, e em quanto a temperatura é dependente conforme a espécie de levedura utilizada.
- As leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae* e S. *stipitis* apresentam uma elevada capacidade de fermentar altas concentrações de glicose em hidrolisado enzimático do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino não lavado (BPNL), entre tanto estratégias para estimular o consumo de xilose devem ser estudadas para o aproveitamento integral desta biomassa.

REFERENCIAS

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities. **Chemical Analysis and Testing Task Laboratory Analytical Procedure LAP006**, n. 8-1296, p. 7–18, 1996.

AGBOGBO, F. K. et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333–2336, 2006.

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia stipitis. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515–1524, 2008.

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

AGNIHOTRI, S.; DUTT, D.; TYAGI, C. H. Complete characterization of bagasse of early species of. **Bioresource Technology**, v. 5, n. 2, p. 1197–1214, 2010.

AMAVEDA, H.; LOZANO, A. On the optimization of boiler efficiency using bagasse as fuel. **Fuel**, v. 82, n. 12, p. 1451–1463, 2003.

ANTONIO, W. et al. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane , its characterization and its use in energy production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 589–603, 2014.

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

ARGUESO, J. L. et al. Genome structure of a Saccharomyces cerevisiae strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2258–2270, 2009.

ARNAO, J. H. **Caldeiras Aquatubulares de Bagaço – Estudo do Sistema de Recuperação de Energia**. 2007.233 f. Tese (Doutoriado em engenharia mecânica)-Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 2007.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89–105, 2008.

BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. Curitiba: INTECH, 2011. v. 271

BATALHA, L. A. R. et al. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 97–105, 2015.

BATRA, V. S.; URBONAITE, S.; SVENSSON, G. Characterization of unburned carbon in bagasse fly ash. **Fuel**, v. 87, n. 13, p. 2972–2976, 2008.

BERLIN, A. et al. Inhibition of cellulase , xylanase and ␣ -glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 2, p. 198–209, 2006.

BISWAS, R.; UELLENDAHL, H.; AHRING, B. K. Conversion of C 6 and C 5 sugars in undetoxified wet exploded bagasse hydrolysates using Scheffersomyces (Pichia) stipitis CBS6054. p. 1–7, 2013.

BRAUNBECK, O.; BAUEN, A.; CORTEZ, L. Prospects for green cane harvesting and cane residue use in. **Biomass and Bioenergy**, v. 17, n. 6, p. 495–506, 1999.

BUABAN, B. et al. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting Pichia stipitis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 18–25, 2010.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by Penicillium echinulatum. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2-3, p. 642–647, 2009.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

CASTRO, R. C. A; ROBERTO, I. C. Selection of a thermotolerant Kluyveromyces marxianus strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1553–1564, 2014.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 295–331, 1998.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (Saccharum X officinarum): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose : a systematic review. **Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 581–597, 2011.

CHENG, J. et al. Ethanol production from non-detoxified whole slurry of sulfite-pretreated empty fruit bunches at a low cellulase loading. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 331–337, 2014.

CHUSILP, N.; JATURAPITAKKUL, C.; KIATTIKOMOL, K. Utilization of bagasse ash as a pozzolanic material in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 23, n. 11, p. 3352–3358, 2009.

CONAB, C. N. DE A. **Indicadores da Agropecuária**. Brasília: 2016.

DA SILVA, A. S. A. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Método para a Determinação de Ácidos Fenólicos na Parede Celular de Forragens Method for Phenolic Acid Determination in Forage Cell Wall. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1634–1639, 2002.

DIAS, M. O. S. et al. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, n. 9, p. 1206–1216, 2009.

DILLEWIJN, C. VAN. **Botany of sugarcane**. 1. ed. Waltham: Chronica Botanica Co., 1952.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1**. Stockholm: Deutsche Nationalbibliothek, 2009. v. 1

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.

FERNANDES, A. J. **Manual da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livroceres, 1984.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Factors Affecting Cellulose Hydrolysis and the Potential of Enzyme Recycle to Enhance the Efficiency of an Integrated Wood to Ethanol Process. **Biotechnology and bioengineering**, v. 51, n. 4, p. 375–383, 1996.

HE, L.; TERASHIMA, N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. III. heterogeneity of sugarcane (Saccharum officinarum L.) lignin with respect to the composition of structural Units in different morphological regions. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 10, n. 4, p. 435–459, 1990.

HEINZ, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**. New York: Elsever, 1987.

HERNANDEZ-SALAS, J. M. et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238–1245, 2009.

HOFSETZ, K.; APARECIDA, M. Brazilian sugarcane bagasse : energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564–573, 2012.

JONKER, J. G. G. et al. Outlook for ethanol production cost in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, n. -, p. 593–610, 2015.

KABIR, F. et al. Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. **Fuel**, v. 89, p. S20–S28, 2010.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.

KONG, F.; ENGLER, C. R.; SOLTES, E. D. J. Effects of cell-wall acetate , xylan backbone , and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 23–35, 1992.

KOZYUKOV, E. A.; LAPIDUS, A. L. Ethanol and Diesel Fuel from Plant Raw Materials : A Review. **Solid Fuel Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 358–364, 2008.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.-E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Biotechnology in the pulp and paper industry.**, v. 57, p. 45–125, 1997.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 302–314, 2009.

LARK, N. et al. Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast, Kluveromyces marxianus. **Biomass and Bioenergy**, v. 12, n. 2, p. 135–143, 1997.

LARRAHONDO, J. E. **Componentes de la materia extraña en la caña cosechada**. Disponível em: <http://bibliotecadigital.cenicana.org/browse?type=subject&order=ASC&rpp=20&value=tallo>. Acesso em: 24 out. 2016.

LASHINSKY, A.; SCHWARTZ, N. D. **How to Beat the High Cost of Gasoline. Forever!** Disponível em: <http://archive.fortune.com/magazines/fortune/fortune_archive/2006/02/06/8367959/index.htm>. Acesso em: 20 nov. 2016.

LI, Y. et al. Bioethanol production from rice straw by a sequential use of Saccharomyces cerevisiae and Pichia stipitis with heat inactivation of Saccharomyces cerevisiae cells prior to xylose fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 682–686, 2011.

LIU, C. Deciphering the enigma of lignification : precursor transport , oxidation , and the topochemistry of lignin assembly. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 304–317, 2012.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809–825, 2011.

MART, C.; KLINKE, H. B.; BELINDA, A. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 426–432, 2007.

MARTÍN, C. et al. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98-100, p. 699–716, 2002a.

MARTÍN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising Saccharomyces cerevisiae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 274–282, 2002b.

MASARIN, F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 55, 2011.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 395–401, 2011.

MENDES, F. M. et al. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 890–895, 2013.

MESQUITA, J.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 39, n. 3, p. 441–448, 2016.

MHHE, M. G. H. E. **Cotton: The fiber of life**. Disponível em: <http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/botany_map/articles/article_30.html>. Acesso em: 18 fev. 2016.

MOONEY, C. A. et al. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 2, p. 113–119, 1998.

MORENO, A. D. et al. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae on steam-exploded biomass treated with laccase. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 239–245, 2013.

MUSSATTO, S. I. et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 124–129, 2008.

NEBRA, S. A. **Secagem pneumatica de bagaço de cana**, 1895. 121 f. Tese (Doutorado em engenharia mecânica) - Departamento de enganharia mecânica, Universidade Estadual De Campinas, Campinas, 1985.

NGUYEN, T. Y. et al. CELF pretreatment of corn stover boosts ethanol titers and yields from high solids SSF with low enzyme loading. **Green Chemistry**, v. 18, p. 1581–1589, 2016.

NIGAM, J. N. Cultivation of Candida langeronii in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 367–372, 2000.

OKONKWO, C. C. et al. Enhancing ethanol production from cellulosic sugars using Scheffersomyces (Pichia) stipitis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1023–1032, 2016.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PETROVSKA, B.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 8, p. 695–699, 1999.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar á bioconversáo via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**, 2007. 125 f. Dissertação (Mestre em quimica) - Departamento de quimica, Universidade federal do Paraná, Ciritiba 2007.

REIN, P. **Cane Sugar Engineering**. Berlim: Bartens, 2007.

RFA. **World Fuel Ethanol Production**. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>. Acesso em: 12 jul. 2015.

RÍPOLI, T. C.; MOLINA, W. F.; RÍPOLI, M. L. Energy potential of sugar cane biomass in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 677–681, 2000.

ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by Candida guilliermondii for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 3, p. 271–275, 1991a.

ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by pichia stipitis for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 15–21, 1991b.

ROCHA, G. J. D. M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.

RODRUSSAMEE, N. et al. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1573–1586, 2011.

ROUHOLLAH, H. et al. Mixed sugar fermentation by Pichia stipitis , Sacharomyces cerevisiaea , and an isolated xylose- fermenting Kluyveromyces marxianus and their cocultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 9, p. 1110–1114, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SANTOS, H. T. **Avaliação da produção de xilitol a partir da palha de arroz empregando leveduras termotolerantes**.2015. 129 f. Tese (Doutorado em ciencia) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade De São Paulo, Lorena, 2015.

SANTOS, V. C. et al. Kinetics of growth and ethanol formation from a mix of glucose / xylose substrate by Kluyveromyces marxianus. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 153–161, 2013.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 3, p. 241–250, 2008.

SIGNORI, L. et al. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in Kluyveromyces marxianus CBS712 strain. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 51, 2014.

SILVA, V. F. N. et al. Using of cell recycle batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, p. 1853–1859, 2016.

SIQUEIRA, G. et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 7, 2011.

SIQUEIRA, G. et al. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.

SLUITER, A et al. Determination of extractives in biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, v. 2008, n. July, p 1-9, 2008.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, v. 2011, n. July, p. 1–14, 2004.

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v. 92, n. 2, p. 169–183, 2005.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 53–78, 2006.

SUN, J. X. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331–339, 2004a.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004b.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-Based Hydrolysis Processes for Ethanol From Lignocellulosic Materials: a Review. **Bioresources**, v. 2, n. 2007, p. 472–499, 2015.

TAO, L. et al. Improved ethanol yield and reduced minimum ethanol selling price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 2) Techno-economic analysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 69, 2012.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, v. 88, n. 11, p. 2142–2147, 2009.

VAN ZYL, C. et al. D-Xylose Utilization by Saccharomyces cerevisiae. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 1989, p. 2791–2798, 1989.

WANDERLEY, M. C. D. A. et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448–453, 2013.

WANG, Z. J.; LAN, T. Q.; ZHU, J. Y. Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 9, 2013.

WILKINS, M. R. et al. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains Kluyveromyces marxianus IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 346–350, 2008.

YANASE, S. et al. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus displaying cellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 381–388, 2010.

YANG, L. et al. Sodium carbonate-sodium sulfite pretreatment for improving the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 711–717, 2013.

ZHU, J. Y. et al. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. **Chemical Engineering Science**, v. 64, n. 3, p. 474–485, 2009a.

ZHU, J. Y. et al. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2411–2418, 2009b.

ZHU, J. Y. et al. Using sulfite chemistry for robust bioconversion of Douglas-fir forest residue to bioethanol at high titer and lignosulfonate: a pilot-scale evaluation. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 390–397, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de variância (ANOVA)

Tabela A.1 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais X_1 (Temperatura) X_2 (suplementação nutricional) e de interação das variáveis ($X_1.X_2$) sobre a produtividade volumétrica em etanol (QP), pela levedura *K. marxianus* Y-6860 ao nível de 90% de confiança.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
Curvatura	0,7912	1	0,7912	50,63,87	*0,0001**
X_1	0,0391	1	0,0391	250,69	*0,0039**
X_2	1,9078	1	1,9078	12210,25	*0,0000**
$X_1.X_2$	0,0814	1	0,0814	521,36	*0,0019**
Erro	0,0003	2	0,0001		
Total SS	2,8200	6			
			R^2 = 0,99		

Tabela A.2 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais X_1 (Temperatura) X_2 (suplementação nutricional) e de interação das variáveis ($X_1.X_2$) sobre o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), pela levedura *K. marxianus* Y-6860 ao nível de 90% de confiança.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
Curvatura	0,0047	1	0,0047	437,43	*0,0022**
X_1	0,0002	1	0,0002	18,31	*0,0504**
X_2	0,0003	1	0,0003	29,40	*0,0323**
$X_1.X_2$	0,0033	1	0,0033	306,03	*0,0032**
Erro	0,0000	2	0,0000		
Total SS	0,0086	6			
			R^2 = 0,99		

Tabela A.3 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais X_1 (Temperatura) X_2 (suplementação nutricional) e de interação das variáveis ($X_1.X_2$) sobre a produtividade volumétrica em etanol (QP), pela levedura *S. cerevisiae* PE-2 ao nível de 90% de confiança.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
Curvatura	0,1532	1	0,1532	191,582	*0,0459**
X_1	0,0136	1	0,0136	17,087	0,1511
X_2	1,7080	1	1,7080	2135,039	*0,0137**
$X_1.X_2$	0,0083	1	0,0083	10,446	0,1910
Erro	0,0008	1	0,0008		
Total SS	1,8841	5			
			R^2 = 0,99		

Tabela A.4 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais X_1 (Temperatura) X_2 (suplementação nutricional) e de interação das variáveis ($X_1.X_2$) sobre o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), pela levedura *S. cerevisiae* PE-2 ao nível de 90% de confiança.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
Curvatura	0,0125	1	0,0125	34,3433	0,1075
X_1	0,0000	1	0,0000	0,1134	0,7931
X_2	0,0000	1	0,0000	0,0020	0,9710
$X_1.X_2$	0,0007	1	0,0007	1,9272	0,3974
Erro	0,0003	1	0,0003		
Total SS	0,0136	5			
			R^2 = 0,97		

Tabela A.5 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais X_1 (Temperatura) X_2 (suplementação nutricional) e de interação das variáveis ($X_1.X_2$) sobre a produtividade volumétrica em etanol (QP), pela levedura *S. stipitis* Y-7124 ao nível de 90% de confiança

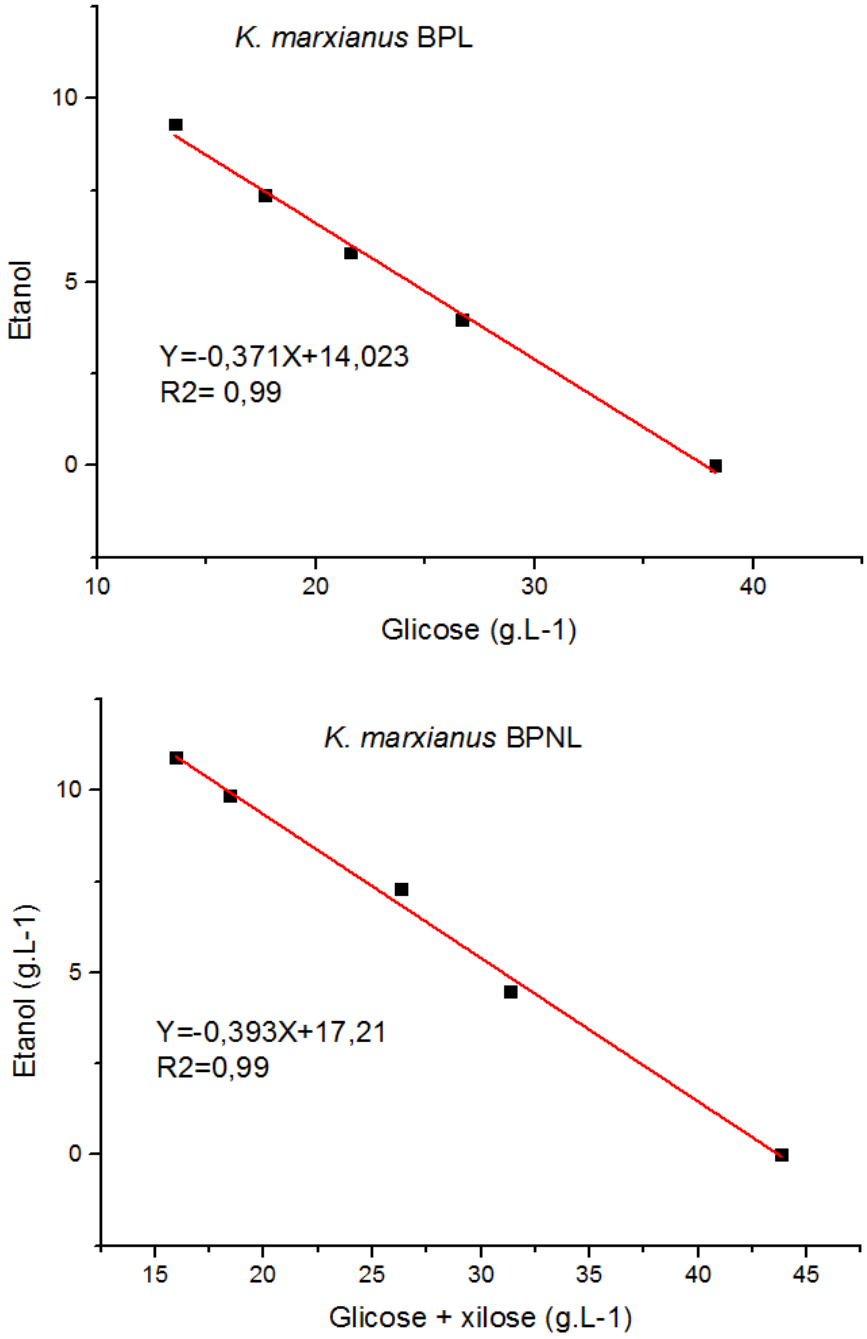
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
Curvatura	0,0532	1	0,0532	135,71	*0,0545**
X_1	0,1701	1	0,1701	434,0721	*0,0305**
X_2	0,1701	1	0,1701	4,34,0721	*0,0305**
$X_1.X_2$	0,0175	1	0,0175	44,7864	*0,0944**
Erro	0,0003	1	0,0039		
Total SS	0,4114	5			
			R^2 = 0,99		

Tabela A.6 - Análise de variância (ANOVA) dos efeitos principais X_1 (Temperatura) X_2 (suplementação nutricional) e de interação das variáveis ($X_1.X_2$) sobre o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), pela levedura *S. stipitis* Y-7124 ao nível de 90% de confiança.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	*F*	*p-valor*
Curvatura	0,0005	1	0,0005	2,2042	0,3773
X_1	0,0241	1	0,0241	97,3318	*0,0643**
X_2	0,0030	1	0,0030	12,4280	0,1759
$X_1.X_2$	0,0031	1	0,0031	12,5133	0,1759
Erro	0,0002	1	0,0002		
Total SS	0,0311	5			
			R^2 = 0,99		

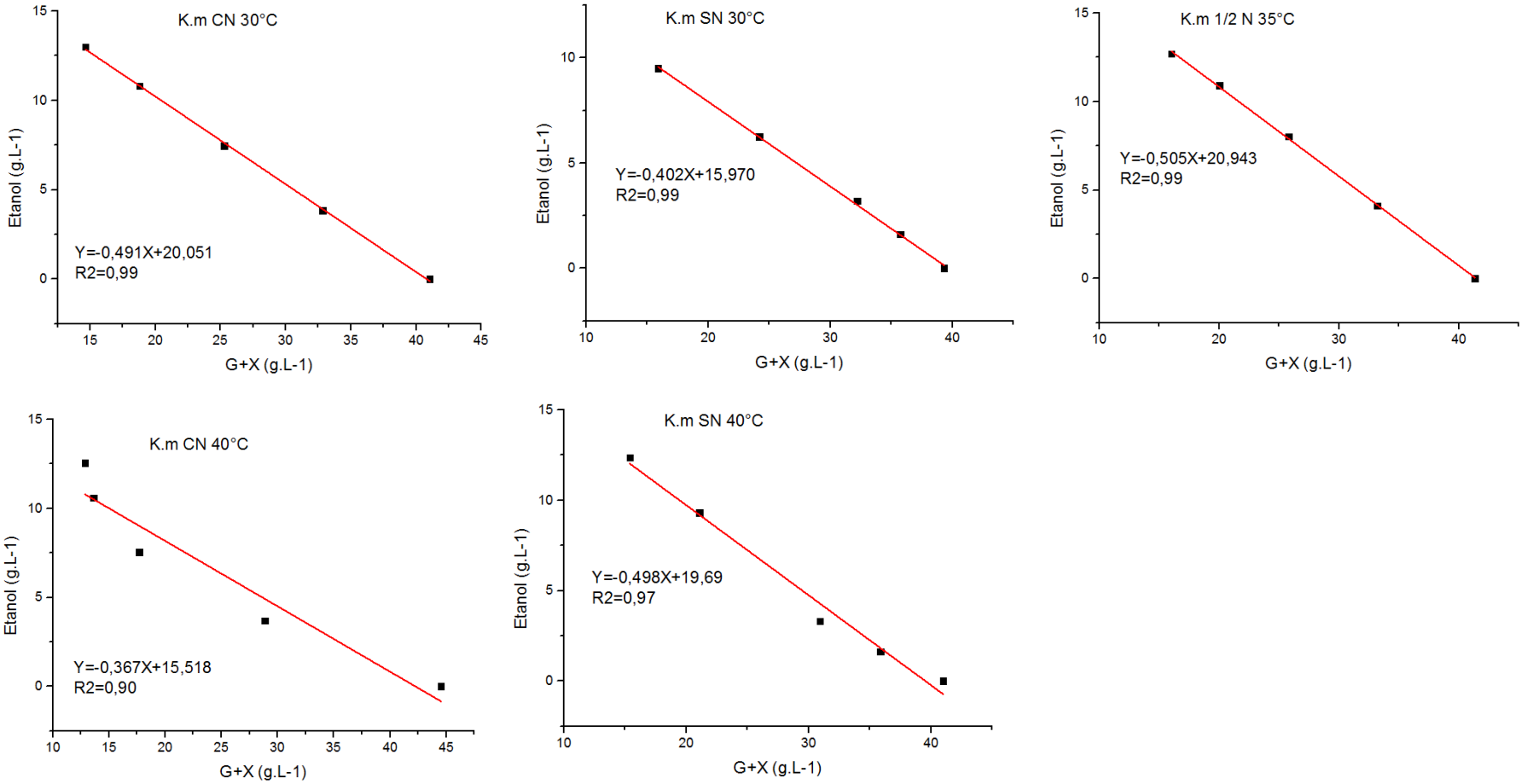
APÊNDICE B – Gráficos de correlação concentração de produto formado com concentração de substrato consumido pelas leveduras durante o processo de fermentação do hidrolisado enzimático pré-tratado com sulfito alcalino.

Figura B.1 - Gráfico que correlaciona concentração de produto formado com concentração de substrato consumido pela levedura *K. marxianus* no BPL e BPNL.



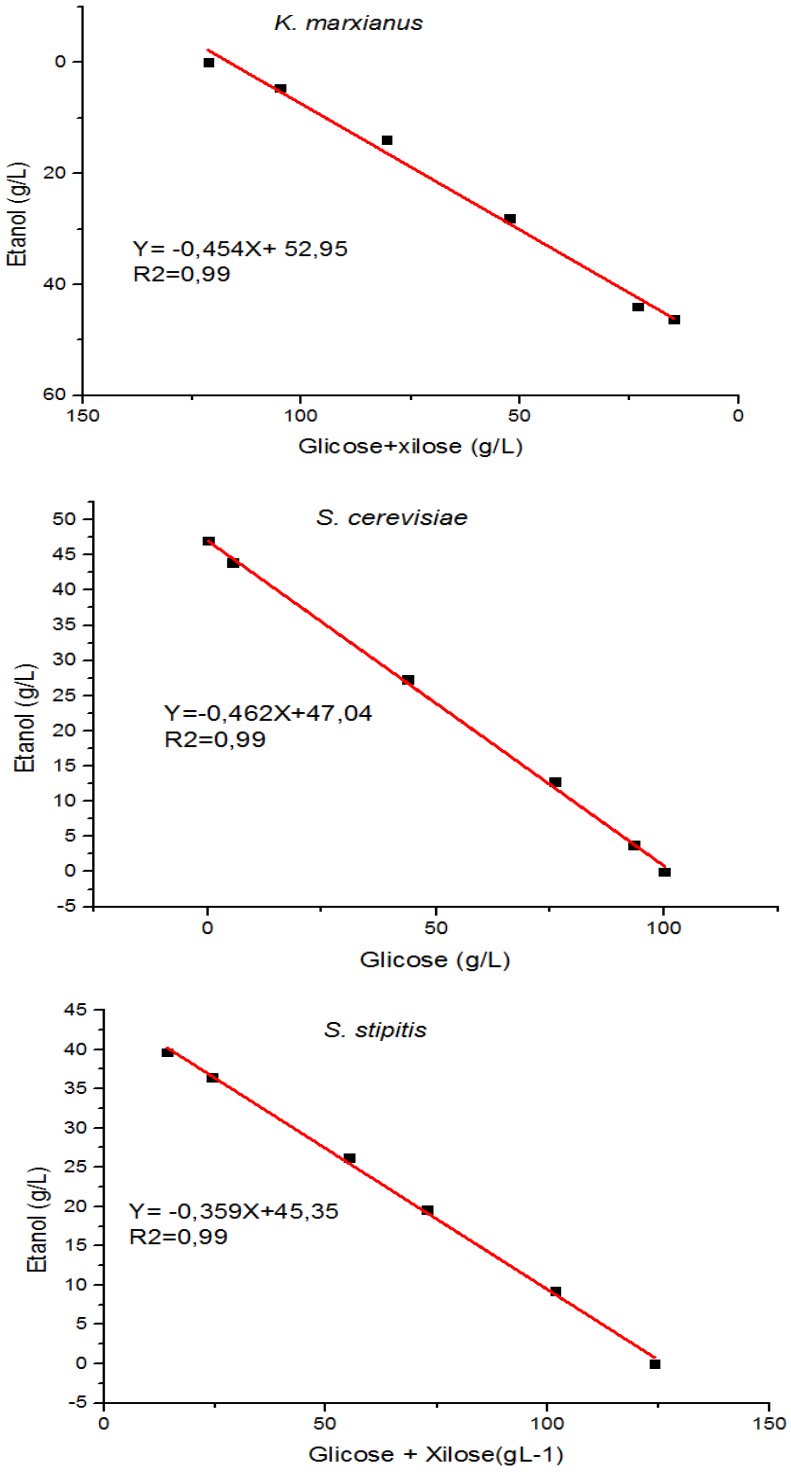
Fonte: Autor

Figura B.2 - Gráfico que correlaciona concentração de produto formado com concentração de substrato consumido pela levedura *K. marxianus* em diferentes temperaturas e condição nutricional



Fonte: Autor

Figura B.3 - Gráfico que correlaciona concentração de produto formado com concentração de substrato consumido pelas leveduras *K. marxianus, S. cerevisiae e S. stipitis* durante a fermentação do hidrolisado enzimático do BPL com alta concentração de glicose.



Fonte: Autor