UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

BÁRBARA LUIZA SILVA SANTIAGO

Avaliação do tratamento alcalino do bagaço de malte e seu efeito sobre a bioconversão das frações açucaradas em etanol

Lorena - SP

2013

BÁRBARA LUIZA SILVA SANTIAGO

Avaliação do tratamento alcalino do bagaço de malte e seu efeito sobre a bioconversão das frações açucaradas em etanol

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: Prof[a]. Dr[a]. Inês Conceição Roberto

Versão original

Lorena - SP

2013

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

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Santiago, Bárbara Luiza Silva
Avaliação do tratamento alcalino do bagaço de malte e seu efeito sobre a bioconversão das frações açucaradas em etanol / Bárbara Luiza Silva Santiago. – 2013.
110 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.
Orientadora: Inês Conceição Roberto

1. Bagaço de Malte 2. Bioconversão 3. Tratamento alcalino. I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

662.636 - CDU

Dedico essa dissertação à memória de minha mãe, Soraia Augusta da Silva Campos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

À Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, pela maravilhosa orientação, dedicação, comprometimento e esforço para a realização deste trabalho.

À minha mãe, Soraia, que sacrificou seus sonhos pelos meus, pelo amor incondicional.

À toda minha família, em especial à minha avó Maria Auxiliadora, à minha madrinha Nininha e ao meu padrasto Geovani.

À minhas grandes amigas Isabela, Isabelle, Dayelle, Mayara, Ana Paula, Bruna, Fernanda por trazerem leveza aos meus dias.

Aos meus amigos de laboratório Rafael, Bruno, Tulio, Dani, João e Isabela, que fizeram o trabalho ainda mais prazeroso e divertido.

À todos os amigos do Departamento de Biotecnologia pela troca de idéias e experiências.

À todos os professores, funcionários e alunos da Escola de Engenharia de Lorena, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

SANTIAGO, B. L. S. “**Avaliação do tratamento alcalino do bagaço de malte e seu efeito sobre a bioconversão das frações açucaradas em etanol”** 2013. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

O presente trabalho se propôs a avaliar o efeito de uma etapa de tratamento alcalino no bagaço de malte visando à extração de acetato e de compostos fenólicos, e como consequência diminuir a concentração destes no hidrolisado hemicelulósico. Foi ainda objetivo deste trabalho, estudar o efeito do tratamento alcalino na bioconversão das frações celulósica e hemicelulósica do bagaço de malte, por meio de fermentação com as leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia stipitis,* respectivamente. Os resultados mostraram que para todas as condições de tratamento alcalino avaliadas, ocorreu solubilização de acetato, compostos fenólicos e furanos, não sendo observada solubilização de açúcares. A capacidade de solubilização destes compostos aumentou com o aumento da concentração de hidróxido de sódio empregada até o tempo de 40 min, sendo observada uma concentração máxima de 0,86 g/L, 13,0 g/L e 0,58 g/L empregando 1%%, 2% e 2% de NaOH, respectivamente. Para todas as condições avaliadas, o tratamento alcalino do bagaço de malte reduziu a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico. A menor concentração (0,026 g/L) foi obtida após 20 minutos de tratamento com 2% de NaOH. Com relação à concentração xilose, o menor teor desta pentose (8,3 g/L) foi obtido após o tratamento do bagaço com 0,25 % de NaOH por 2 minutos e o maior (22,0 g/L) com 0,5% de NaOH por 60 minutos. Visando estabelecer as condições de tratamento alcalino que permitissem uma redução na concentração de ácido acético, concomitantemente ao favorecimento da solubilização de xilose no hidrolisado hemicelulósico e de glicose no hidrolisado celulósico, as condições de temperatura e concentração de NaOH do tratamento alcalino do bagaço de malte foram otimizadas através de um planejamento estatístico. Nas condições otimizadas (concentração de NaOH de 0,63%, temperatura de 67,6°C e tempo de 20 min), o tratamento alcalino do bagaço de malte promoveu uma redução de 90% na concentração de ácido acético, concomitante ao aumento de 4,5% e 15% na concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e concentração de glicose no hidrolisado celulósico, respectivamente. Os resultados referentes à bioconversão da fração celulósica demonstraram que para ambas as configurações de processo avaliadas (SHF e SSF) a fermentação da celulignina do material tratado (CLT) forneceu maior concentração de etanol, e essa diferença foi mais pronunciada na SSF. Além disso, na SSF, a produtividade volumétrica total em etanol, a qual considera o tempo de sacarificação e fermentação no processo foi aumentada em 2,2 vezes em relação à SHF. Com relação a bioconversão da hemicelulose, os resultados mostraram que tanto para o hidrolisado do bagaço referência não tratado (HHR) quanto para o previamente tratado com álcali (HHT), a concentração máxima de etanol foi obtida após 89 horas de fermentação, porém na fermentação do (HHT) a produção de etanol foi cerca de 3 vezes superior a obtida no (HHR), passando de 5,8 para 17,4 g/L. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a etapa de tratamento alcalino do bagaço de malte, provavelmente promoveu mudanças estruturais na celulignina aumentando a liberação de glicose no hidrolisado e ainda foi capaz de remover substâncias inibidoras do metabolismo microbiano, especialmente o ácido acético, favorecendo o processo fermentativo da fração hemicelulósica.
Palavras chave: Bagaço de Malte. Tratamento alcalino. Bioconversão.

SANTIAGO, B. L. S. "**Evaluation of the alkaline treatment on brewer' spent grain and its effect over the bioconversion of sugar fractions in ethanol"** 2013. 110p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

This study aimed to evaluate the effect of alkaline treatment in brewer's spent grain on extraction of acetate and phenolic compounds, and consequently to decrease their levels on hemicellulosic hydrolyzate. In addition, the effect of the alkali treatment on the bioconversion of cellulose and hemicellulose hydrolyzates employing *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia stipitis*, respectively, was also evaluated. The results showed that for all conditions of treatment studied occurred solubilization of acetate, phenolics and furans, but not sugars. The solubilizing capacity of these compounds increased with increasing concentration of sodium hydroxide employed until the time of 40 min, and the maximum concentration observed was 0.86 g / L 13.0 g / L and 0.58 g / L from 1%, 2% NaOH and 2%, respectively. For all conditions evaluated, alkali treatment of brewer's spent grain reduced the acetic acid concentration in hemicellulosic hydrolyzate. The lowest concentration (0.026 g / L) was obtained after 20 minutes with 2% NaOH. With respect to xylose concentration, the lower content of this pentose (8.3 g / L) was obtained after the treatment with 0.25% NaOH for 2 minutes and the highest (22.0 g / L) with 0.5 % NaOH for 60 minutes. To establish optimal conditions of temperature and NaOH concentration in the alkaline treatment aiming to decrease the concentration of acetic acid and, at the same time, increase the solubilization of xylose in the hemicellulose hydrolyzate and glucose in the cellulosic hydrolyzed, a statistical design was used. Under optimized conditions (NaOH concentration of 0.63%, a temperature of 67.6 °C and time of 20 min) alkaline treatment of the brewer's spent grain promoted a decrease of 90% in acetic acid concentration, concomitant to an increase of 4.5% and 15% on xylose concentration in the hemicellulose hydrolyzate and on glucose concentration in the cellulosic hydrolyzate, respectively. The results concerning the bioconversion of cellulosic fraction showed that for both configurations of the process evaluated (SHF and SSF) the treated material cellulignin (CLT) provided higher ethanol concentration, and this difference was more pronounced in SSF. In addition, in SSF, the total ethanol volumetric productivity, which considers time saccharification and fermentation process was increased by 2.2 times compared to SHF. In relation to the hemicellulose bioconversion, the results showed that for both hydrolyzate employed, i.e untreated (HHR) and previously treated with alkali (HHT), the maximum ethanol concentration was achieved after 89 hours of fermentation, however the ethanol production in HHT was about 3 times higher obtained in HHR (from 5.8 to 17.4 g/L). Based on these results, we conclude that the alkali treatment, probably induced structural changes in the fraction of cellulignin regarding glucose released in the hydrolyzate and still was able to remove substances inhibitory to microbial metabolism, especially acetic acid, favoring the fermentation of hemicellulose fraction.

Keywords: Brewer' spent grain. Alkaline treatment. Bioconversion

LISTA DE FIGURA

Figura 2.1. Esquema da organização dos principais componentes da biomassa lignocelulósica (RUBIN, 2008).....21

Figura 2.2. Esquema que retrata as etapas de processamento da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Wyman (2007) 23

Figura 2.3. Formação dos inibidores a partir da biomassa. Adaptado de Barakat et al. (2012) 39

Figura 2.4.: Fluxograma do processo genérico de produção de cerveja. (NEVES et al., 2011) 46

Figura 4.1. Representação esquemática do trabalho proposto para aproveitamento das frações do bagaço de malte para produção de etanol..... 51

Figura 4.2. Esquema das etapas do tratamento alcalino e hidrólise ácida, para obtenção do licor hemicelulósico e da celulignina. 53

Figura 4.3. Representação esquemática dos ensaios da sacarificação e fermentação (Adaptado de CASTRO, 2012). 60

Figura 5.1. Perfil de liberação acetato (A) compostos fenólicos (B) e furanos (C) no licor após tratamento alcalina com solução de NaOH em diferentes concentrações (▲ 0,25%; ● 0,5%; ■ 1%; ◆ 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento. 70

Figura 5.2. Licor alcalino obtido após diferentes tempos de tratamento alcalino realizado com 2% NaOH. 72

Figura 5.3. Caracterização parcial das frações de açúcares do bagaço de malte (A) e do bagaço de malte tratado (B). (Celulose; Hemicelulose; Outros).74

Figura 5.4. Cromatograma do licor alcalino (diluído duas vezes) obtido da extração alcalina com 0,5%NaOH, a 60 °C por 20 minutos 74

Figura 5.5. Perfil de liberação ácido acético no hidrolisado hemicelulósico após tratamento alcalino com solução de NaOH em diferentes concentrações (▲

0,25%; 0,5%; 1%; 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento. 76

Figura 5.6: Concentração de acetato no licor alcalino (■) e de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico (■) após 20 minutos de tratamento alcalino em diferentes concentrações de NaOH. 76

Figura 5.7. Perfil de liberação de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico após tratamento alcalino com solução de NaOH em diferentes concentrações (0,25%; 0,5%; 1%; 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento. 78

Figura 5.8: Concentração de compostos fenólicos no licor alcalino (■) e de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico (■) após 20 minutos de tratamento alcalino em diferentes concentrações de NaOH. 78

Figura 5.9: Perfil de liberação ácido glicose (A), arabinose (B) e xilose (C) hidrolisado hemicelulósico após tratamento alcalino com solução de NaOH em diferentes concentrações (0,25%; 0,5%; 1%; 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento. 80

Figura 5.10. Proporção entre a concentração de xilose e ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, após 20 minutos de tratamento alcalino com diferentes concentrações de NaOH. 81

Figura 5.11. Curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) descritas pelo modelo y_1 que representa a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte submetido a diferentes condições de tratamento alcalino. 89

Figura 5.12. Curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) descritas pelo modelo y_1 que representa a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte submetido a diferentes condições de tratamento alcalino. 90

Figura 5.13: Curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) descritas pelo modelo y1 que representa a concentração de glicose após 12 horas de sacarificação

enzimática da celulignina obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte submetido a diferentes condições de tratamento alcalino. 91

Figura 5.14. Ensaios de SHF da celulignina do bagaço de malte sem tratamento alcalino: etanol---○---, e glicose---□---, e tratado com 0,63% de NaOH a 67,6 °C: etanol—●— e glicose—■—, empregando a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25 FPU/g e 25 UI/g, respectivamente, sob 45 °C e 100 rpm 94

Figure 5.15. Ensaios (SSF) da celulignina do bagaço de malte sem tratamento alcalino: etanol---○---, e glicose---□---. E tratado com 0,63% de NaOH a 67,6 °C: etanol—●— e glicose—■—, empregando a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25FPU/g e 25UI/g, respectivamente, sob 45 °C e 100rpm 96

Figura 16. Perfil fermentativo de *P. stipitis* empregando: (A) hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte referência e (B) hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de malte tratado com 0,63% NaOH, 66,5 °C por 20 minutos. glicose (—■—); xilose, (—●—), etanol (—▲—) e biomassa (—◆—). 99

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1. Característica da celulose e hemicelulose 20

Tabela 2.2. Variação da composição do bagaço de malte. 48

Tabela 4.1. Matriz do planejamento 2^2 completo, com triplicata no ponto central, para avaliação do efeito do tratamento alcalino na concentração de ácido acético e xilose no hidrolisado hemicelulósico, e liberação de glicose na sacarificação da celulignina. 55

Tabela 4.2. Níveis e valores dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central.....55

Tabela 4.3. Valores de t_{tab}, nível de probabilidade e notação utilizada para cada nível de significância, no planejamento efetuado. 56

Tabela 4.4. Composição do meio em tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8..... 61

Tabela 4.5. Composição do meio de crescimento das leveduras *Pichia stipitis* e Kluveromyces marxianus. 65

Tabela 5.1: Composição do química do bagaço de malte referência (BM^R) e bagaço de malte tratado com 0,5% NaOH por 20 minutos (BM^T), e rendimento de recuperação de xilose por hidrólise com ácido diluído. 81

Tabela 5.2: Valores obtidos para a concentração de ácido acético e xilose no hidrolisado hemicelulósico, e glicose no hidrolisado enzimático da celulignina, no planejamento em estrela. 83

Tabela 5.3. Estimativa dos efeitos, erro padrão e teste t de Student para a resposta concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico, concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e concentração de glicose no hidrolisado celulósico. 86

Tabela 5.4 Análise de variância do modelo representativo da concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, na região do estudo. 87

Tabela 5.5. Análise de variância do modelo representativo a resposta concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico, na região do estudo.....87

Tabela 5.6. Análise de variância do modelo representativo da concentração no hidrolisado celulósico, na região do estudo.....88

Tabela 5.7. Parâmetros fermentativos dos ensaios de SHF e SSF da celulignina de bagaço de malte referência (CL^R) e tratado (CL^T), por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em temperatura de 45 °C e agitação de 100rpm.....97

Tabela 5.8. Parâmetros do processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte tratado com hidróxido de sódio a 0,63% NaOH, 66,5 °C por 20 minutos (HH^T), e do hidrolisado hemicelulósico referência obtido do bagaço de malte não tratado (HH^R).....100

Sumário

1.Introdução 17
2. Revisão Bibliográfica 19
2.1. Materiais lignocelulósicos e seu processamento para produção de etanol 19
2.2 Pré-tratamento 25
2.2. Fermentação da fração hemicelulósica 33
2.3 Fermentação da fração celulósica 34
2.4 Formação de compostos inibidores e seu mecanismo de inibição 38
2.5 Bagaço de Malte 45
3. Objetivos 50
3.1 Objetivos Específicos 50
4. Materiais e métodos 51
4.1 Obtenção da matéria prima 52
4.2 Efeito do tratamento alcalino na composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte 52
4.3. Otimização das condições do tratamento alcalino sobre a composição dos hidrolisadoshemicelulósico e celulósico do bagaço de malte 54
4.7 Efeito do tratamento alcalino sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte 58
4.8 Efeito do tratamento alcalino sobre a sacarificação e fermentação da celulignina do bagaço de malte 59
4.9 Determinação dos parâmetros fermentativos e enzimáticos 62
4.10 Métodos analíticos 64
4.10.1 Determinação do teor de umidade do material lignocelulósico 64
4.10.2 Determinação da concentração celular das leveduras *Pichia stipitis* e Kluveromyces marxianus 64
4.10.3 Determinação dos teores dos açúcares, ácido acético e etanol 65
4.10.4 Determinação dos compostos fenólicos 65
4.10.6 Determinação da atividade enzimática 66
4.10.7 Caracterização química do Bagaço de Malte 67
5. Resultados e discussão 69
5.1. Efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a liberação de acetato, compostos fenólicos e furanos no licor. 69

5.2. Efeito do tratamento alcalino sobre a composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte....75

5.2. Otimização das condições do tratamento alcalino sobre a composição dos hidrolisados hemicelulósico e celulósico do bagaço de malte 82

5.2.1. Análise estatística....85

5.8. Efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a sacarificação e fermentação da celulignina 93

5.7. Efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico 97

6. Conclusão....102

Referências....104

1. Introdução

O esgotamento progressivo dos combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa tem motivado a busca por fontes de energia de caráter renovável, sustentável, de baixo custo e que diminuíssem a emissão desses gases. Nesse contexto, o etanol tem sido apontado com alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, e existe um grande interesse nas pesquisas visando sua obtenção a partir de diferentes matérias primas renováveis, como materiais lignocelulósicos. Estas biomassas são de um material renovável; geograficamente bem distribuído, a despeito da variedade climática; é favorável ao meio ambiente, já que é uma forma de fixar o CO_2; não competem com a agricultura voltada para alimentação humana; e especialmente, é encontrado em abundancia e a baixo custo.

A aplicação de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol exige etapas de processamento que visam permitir a solubilização dos monossacarídeos a serem fermentados. A primeira etapa do processamento é o pré-tratamento da biomassa, que visa diminuir sua recalcitrância e favorecer a liberação dos açúcares fermentáveis. Após a etapa de pré-tratamento são obtidas duas frações, uma fração sólida constituída de celulose e lignina (celulignina) e outra líquida constituída de hemicelulose. A segunda etapa é a bioconversão, que baseia-se na fermentação dos monômeros de açúcar que compõe a biomassa (xilose e glicose).

A fermentação da fração hemicelulósica solúvel obtida no pré-tratamento com ácido diluído, pode ser diretamente fermentada por micro-organismos fermentadores pentoses, especialmente a xilose que se apresenta em maior concentração, como por exemplo a levedura *Pichia stipitis*. Por outro lado a fermentação da porção celulósica necessita de uma etapa de sacarificação enzimática, para liberação dos monômeros de glicose, que serão por sua vez fermentados por micro-organismos fermentadores de hexoses, como a levedura *Kluyveromyces marxianus*. A execução das etapas de sacarificação e fermentação pode ser feitas de diferentes formas, entre as mais estudadas estão a sacarificação e fermentação em separado (SHF) e a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

O processo de pré-tratamento da biomassa pode acarretar na liberação de substancias com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano, podendo desta forma afetar a eficiência e produtividade do processo fermentativo. A natureza dos compostos inibidores e sua concentração nos hidrolisados dependem da matéria prima e do método de pré-tratamento empregado.

Os produtos de degradação da lignina, de açúcares ou da hidrólise da hemicelulose, respectivamente, fenólicos, furanos e ácido acético, tem a capacidade de afetar o metabolismo celular das leveduras fermentadoras, inibir o crescimento celular e assim afetar a eficiência e produtividade da fermentação. Cada grupo age de uma forma diferente na estrutura celular e apresenta uma concentração tóxica, que depende das condições de fermentação e do micro-organismo em questão.

Neste contexto, o presente trabalho se propõe a avaliar o efeito de uma etapa de tratamento alcalino, antecedendo o pré-tratamento ácido, visando solubilizar os produtos de degradação da lignina e ácido acético, de forma a diminuir a concentração destes compostos no hidrolisado hemicelulósico. E ainda tem o objetivo de estudar o efeito do tratamento alcalino na acessibilidade das enzimas celulases a fração celulósica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Materiais lignocelulósicos e seu processamento para produção de etanol

Os materiais lignocelulósicos são apontados como uma alternativa ao material açucarados hoje utilizados para produção de etanol (mosto açucarado da cana) pois são uma fonte de energia renovável, favorável ao meio ambiente; não competem com a agricultura voltada para alimentação humana e animal; e especialmente, é encontrado em abundancia e a baixo custo (RUBIN, 2008).

O material lignocelulósico é composto principalmente por polímeros de carboidratos, homopolissacarídeo denominado celulose, e heteropolissacarídeos denominado hemicelulose. Além de estrutura aromática denominada lignina, como demonstrado na Figura 2.1 (RUBIN, 2008).

A **celulose** é um polímero linear de unidades de β-D-glicopiranose, unidas por ligação glicosídica β-1→4, e grau de polimerização variado. Pode representar até 50% da composição total da biomassa. Este polímero se encontra na forma de fibras compostas por microfibrilas, ordenadas paralelamente e ligadas por ligação de hidrogênio, que conferem rigidez a estrutura, e são responsáveis por organizar as fibrilas, estruturas altamente ordenadas que formam as fibras de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

Uma propriedade que define as fibrilas de celulose é o grau de cristalinidade, que determina quão firmemente as cadeias de glicanas estão ligadas umas as outras. Regiões com alto ordenamento são conhecidas como região cristalina e a fibra nessa região tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação. Regiões com menor grau de ordenamento são chamadas regiões amorfas, nas quais a fibra possui maior flexibilidade (VÁSQUEZ et al., 2007). O grau de polimerização da celulose é definido com base no número médio de seus monômeros e o peso médio do polímero, uma propriedade que representa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas disponíveis para ação das celulases.

A **hemicelulose** é um complexo heteropolissacarídeo que representa até 35% da biomassa vegetal. Consiste em cadeias ramificadas de açúcares, hexoses como β-D-glicose, β-D-manose e α-D-galactose, e pentoses como β-D-xilose e α-L-arabinose ligadas por ligações glicosídicas de diferentes tipos. Esta

macromolécula pode conter ainda ácidos urônicos, como α-D-glucurônico, α-D-4-O-metilgalacturônico e α-D- galacturônico, outros açúcares como α-L-ramnose, e α-L-fucose, e seus açúcares podem estar parcialmente substituídos por grupos acetil. Pode ser classificada em função dos diferentes tipos de açúcares que as compõe, como xilanas, mananas e galactanas por exemplo (FENGEL; WEGENER, 1989).

Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molar (100-200 unidades glicosídicas) e não contem regiões cristalinas, sendo, portanto mais susceptível a hidrólise química sob condições mais brandas (SUN; CHENG, 2005).

O entendimento das diferenças entre as estruturas da celulose e hemicelulose é crucial para definir estratégias de aproveitamento dessas frações na utilização de biomassa lignocelulósica. As diferentes características das frações são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Característica da celulose e hemicelulose

Características	Celulose	Hemicelulose
Unidade básica	Hexose (glicose)	Pentose (xilose)
Grau de polimerização	Alto (1000 a 1500)	Baixo (60 a 300)
Arranjo	Fibroso	Não fibroso
Estrutura	Amorfa e cristalina	Apenas Amorfa
Hidrólise ácida	Lenta	Rápida

Adaptado de Pereira Jr et al., 2008

A **lignina** tem estrutura formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligação tipo éter, que estabelecem ligações cruzadas entre si. É composta por três diferentes precursores de monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que dão origem as unidades classificadas respectivamente p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (FENGEL;WEGENER, 1989).

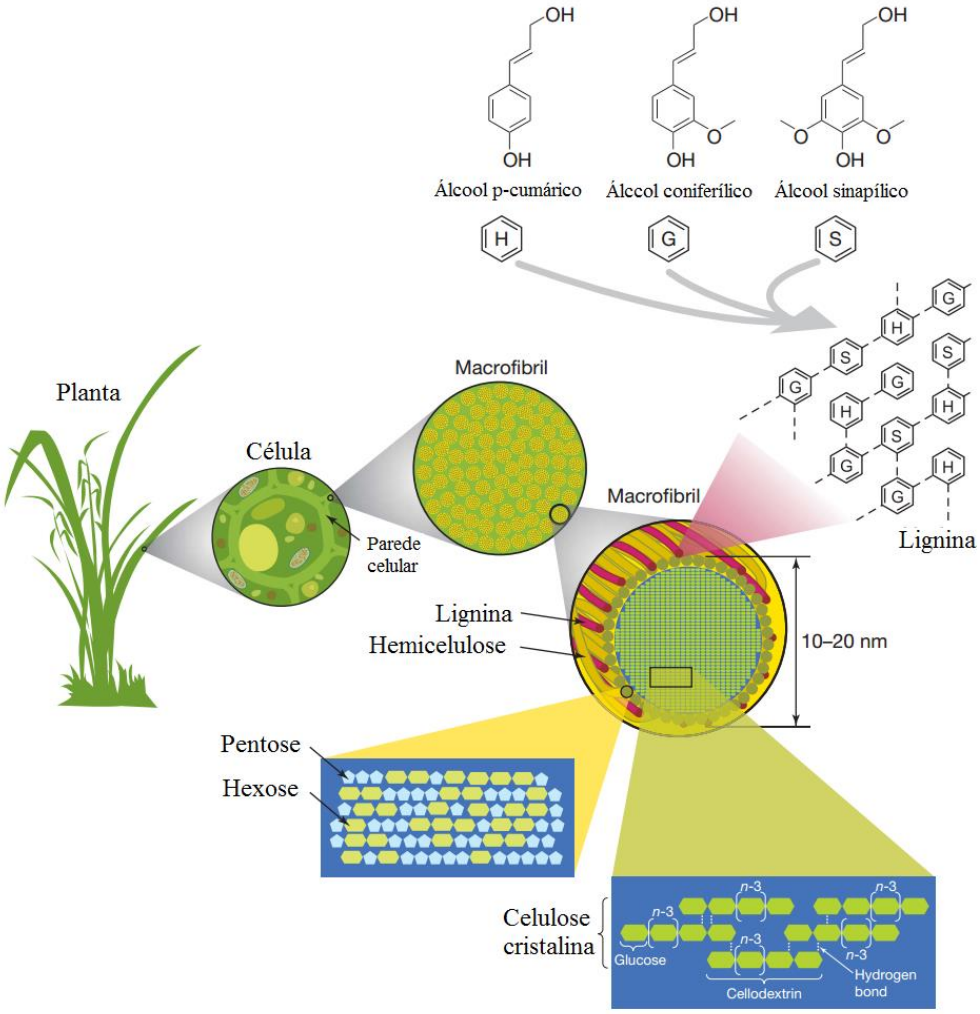


Figura 2.1. Esquema da organização dos principais componentes da biomassa lignocelulósica (RUBIN, 2008).

Evolutivamente a estrutura do material lignocelulósico foi desenvolvida para proteger suas frações da degradação de micro-organismos e animais. Portanto na estrutura, existem vários mecanismos de resistência à quebra das ligações químicas, o que dá a esse material a característica de recalcitrância (ZHAO et al., 2012). A fração de lignina atua como barreira física que restringe o acesso das enzimas hidrolíticas às frações de açúcares, celulose e hemicelulose, além de se ligar a essas proteínas, acarretando em adsorções improdutivas e diminuindo a degradação. O grupamento acetil presente na estrutura da hemicelulose interfere no reconhecimento do sítio catalítico da enzima durante a hidrólise, e por isso também diminui a degradação das porções de açúcares. No âmbito de resistência física a degradação, a área superficial do material lignocelulósico e a cristalinidade da porção de celulose são os principais fatores que impedem a

degradação eficiente do material. As enzimas de degradação acessam as frações a serem hidrolisadas pela sua superfície, então quanto maior a área superficial, como o tamanho da partícula e o tamanho dos poros que compõe o material, maior é a taxa de degradação. E quanto à cristalinidade da celulose, o aumento dessa porção diminui drasticamente a degradabilidade da fração, por se tratar de um material finamente associado e ausente de água de solvatação necessária a hidrólise (ZHAO et al., 2012).

Nesse contexto a primeira etapa do processamento da biomassa é o pré-tratamento que visa diminuir sua recalcitrância, aumentando a acessibilidade das enzimas na estrutura da celulose e a recuperação dos monômeros de glicose que a compõe, para posterior fermentação. O pré-tratamento também pode ser visto como uma etapa de fracionamento da biomassa, quando a celulose é separada da fração hemicelulósica, para que ambas possam ser fermentadas separadamente. Segundo Kumar et al. (2011) a utilização de ambas as frações, celulose e hemicelulose, são de crucial importância para tornar o processo viável economicamente.

Após a etapa de pré-tratamento ácido são obtidas duas frações, uma fração sólida constituída de celulose e lignina (celulignina) e outra líquida constituída de açúcares da hemicelulose.

Para a fermentação da porção celulósica é necessário a etapa de hidrólise enzimática, também chamada de sacarificação enzimática, que tem a função de liberar os monômeros de glicose, que por sua vez serão fermentados, por micro-organismos fermentadores de hexoses como Saccharomyces cerevisae e *Kluyveromyces marxianus*. A execução das etapas de sacarificação e fermentação pode ser feitas de diferentes formas, entre as mais estudadas estão a sacarificação e fermentação em separado (SHF) e a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A primeira envolve duas etapas separadamente, e tem a vantagem de serem otimizadas individualmente, o que é importante já que a temperatura ótima das enzimas celulases é por volta de 50 °C, enquanto as leveduras fermentadoras crescem em torno de 35 °C. A segunda forma de execução, envolve apenas uma etapa na qual a sacarificação e fermentação são executas num só reator simultaneamente, e tem a vantagem de não se observar inibição das enzimas da sacarificação pelo produto, glicose ou celobiose, já que a levedura consome esses açúcares tão logo são liberados.

A fermentação da porção hemicelulósica solúvel necessita de micro-organismos capazes de fermentar pentoses, especialmente a xilose que se apresenta em maior concentração. A bioconversão de xilose em etanol é consolidada pelo uso de leveduras, como por exemplo levedura Pichia stipitis. Entretanto o rendimento e produtividade podem ser influenciados por fatores como temperatura, pH, oxigenação, adição de nutrientes e concentração inicial de substrato e inoculo. O estabelecimento das condições ótimas do meio de cultura é uma importante maneira de melhorar a eficiência do bioprocesso (GARCIA, 2012).

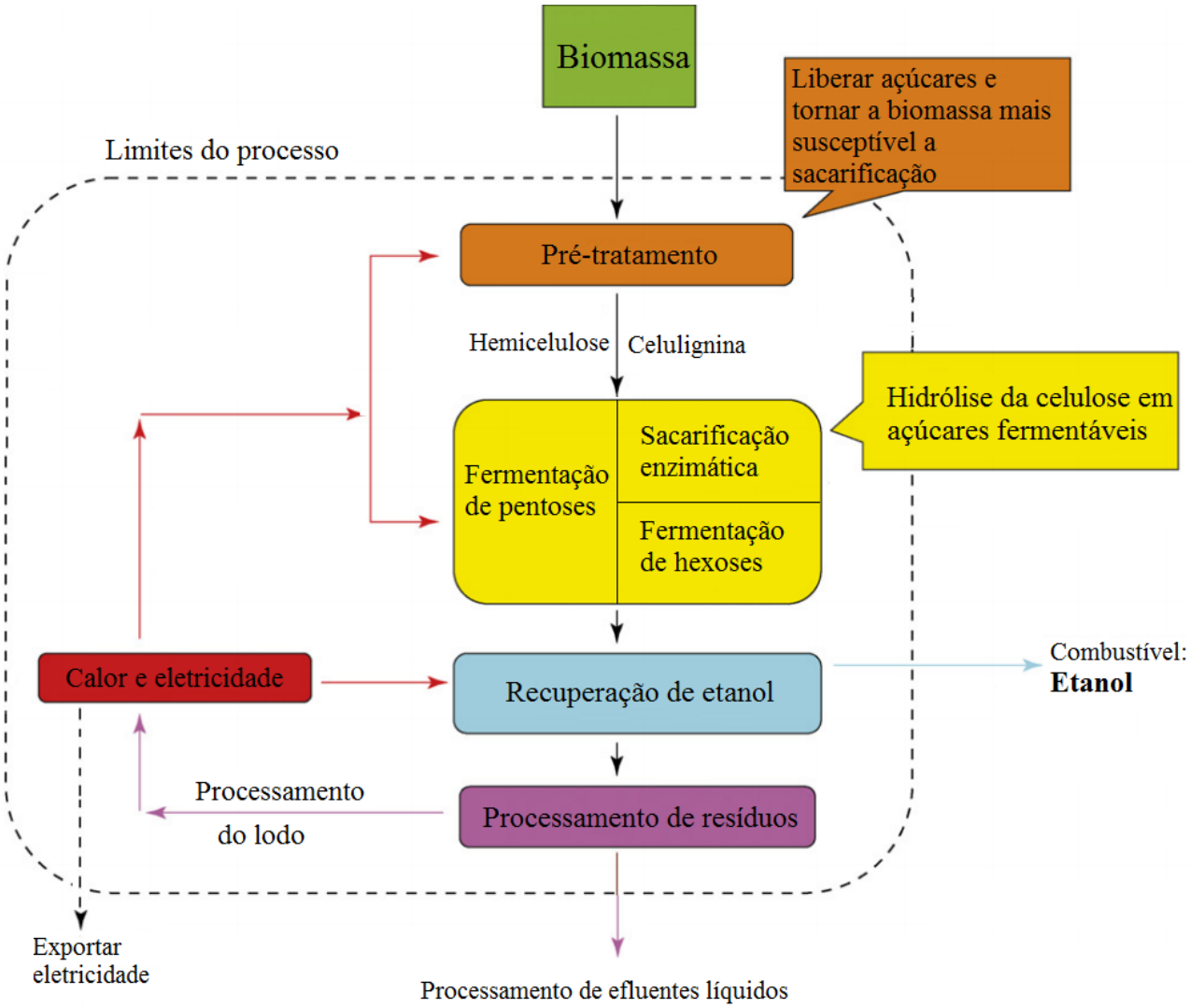


Figura 2.2. Esquema que retrata as etapas de processamento da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Wyman (2007)

Seguida a etapa de fermentação é realizada a recuperação do etanol que envolve o processo de destilação. A primeira coluna de destilação separa o vapor enriquecido com etanol, do efluente que contém grande parte da lignina, proteínas insolúveis e compostos não fermentados. O vapor rico em etanol passa por uma coluna de retificação que separa a mistura azeotrópica de água e álcool. Essa mistura passa por peneira molecular da qual se obtém etanol anidro (KUMAR et al., 2011).

O efluente da primeira coluna de destilação é separado em uma fração sólida rica em lignina, e uma líquida rica em água e sólidos solúveis. A fração rica em lignina pode conter até 50% de umidade, como é o caso do pré-tratamento ácido, e é queimada para geração de vapor (KUMAR et al., 2011).

Parte da fração líquida é evaporada, condensada, e retorna para o processo, sendo reciclada. Outra parte é tratada na estação de tratamento de água da planta, num digestor anaeróbio produzindo biogás que é queimado com a fração sólida rica em lignina, juntamente com o lodo proveniente da fração evaporada. O vapor obtido da queima da fração rica em lignina é maior que o necessário no processo. Assim o excesso pode ser transformado em eletricidade, e ainda o excesso de eletricidade pode ser vendido, como mostra o esquema da Figura 2.3.

O tipo de biomassa, o pré-tratamento empregado, o custo das enzimas, o rendimento da hidrólise enzimática, e a estratégia do bioprocesso (SSF, SHF, SSCoF), são fatores que influenciam diretamente no custo final do etanol produzido, e por isso devem ser muito bem compreendidos e otimizados (KUMAR et al., 2011). A escolha da biomassa influencia na eficiência do pré-tratamento, que por sua vez altera a biomassa de forma a facilitar ou dificultar a sacarificação enzimática, o que tem efeito direto na produtividade e rendimento da etapa de fermentação, tanto pela concentração de açúcar disponível quanto na presença ou ausência de inibidores.

O impacto das etapas de processamento da biomassa no valor final do etanol, em uma planta proposta com capacidade de processar 2,5 10^8 toneladas por ano de biomassa seca foi analisado por Kumar et al. (2011). De acordo com o modelo adotado pelo autor o custo da biomassa pode impactar fortemente o preço do etanol. Considerando $50,0 por 10^3 toneladas de biomassa pré-tratada por hidrólise ácida, o custo do etanol atingirá $0,79 por galão de etanol, porém

reduzindo pela metade o preço da biomassa, processo sofrerá um decréscimo de 12,6% no seu custo.

Outro fator determinante para que o etanol produzido tenha menor custo de produção é o aproveitamento total dos açúcares disponíveis na biomassa. É essencial que, além das hexoses oriundas da fração lignocelulósica, as pentoses que compõe a hemicelulose também sejam fermentadas a etanol. Para comprovar essa necessidade o autor supôs uma variação nos valores da eficiência de fermentação de pentoses e concluiu que o custo do etanol decresce de $1,20/L para $0,76/L quando a eficiência de fermentação aumenta de 10 para 90%.

2.2 Pré-tratamento

Os componentes da biomassa encontram-se interligados em polissacarídeos (hemicelulose e celulose), e necessitam ser hidrolisados em seus monômeros fermentáveis, por meio de processos de pré-tratamentos variados. O pré-tratamento tem influência direta no arranjo dos componentes da estrutura do material lignocelulósico, e baseia-se em técnicas como tratamentos térmicos, químicos, físicos, biológicos e/ou combinação deles.

O rendimento de açúcar recuperado, tanto da celulose insolúvel quanto da hemicelulose solúvel, e formação de inibidores por degradação de açúcares são alguns dos parâmetros usados para avaliar o pré-tratamento (SUN; CHENG, 2002). A eficiência dos processos de pré-tratamentos na recuperação das frações é influenciada por variáveis como: tipo de catalisador, concentração do catalisador, temperatura, relação sólido:líquido e tamanho da partícula da biomassa.

Dentre os métodos de pré-tratamento, os mais empregados estão: a hidrólise ácida diluída, a hidrólise alcalina, a explosão a vapor e a autohidrólise. A Tabela 2.3 apresenta as condições normalmente empregadas nos diferentes pré-tratamentos.

O pré-tratamento **ácido** é uma técnica muito difundida para solubilização dos açúcares da biomassa lignocelulósica e baseia-se na adição de ácido mineral ao material, e a mistura é submetida a diferentes condições de temperatura e tempo.

A recuperação dos açúcares no pré-tratamento com ácido diluído é baseada na hidrólise das ligações glicosídicas entre os açúcares que compõe principalmente a hemicelulose. Segundo Fengel e Wegener (1989) existe uma relação entre a taxa de hidrólise e o tipo de açúcar que compõe o polissacarídeo. Os açúcares β-D-glicose : β-D-manose : β-D-galactose : β-D-xilose são liberados na proporção de 1: 3 : 4-5: 5-6. Essa característica de cada açúcar está relacionada à sua conformação da cadeia polissacarídica, anéis de cinco carbonos (furanos) são hidrolisados mais rapidamente quando comparados com anéis de seis carbonos (piranos), pois apresentam maior tensão angular para manutenção do anel. Entre os açúcares formados por cinco carbonos (furanos) também há particularidades quanto à taxa de hidrólise. Mussatto e Roberto (2006) observaram que na hidrólise ácida de bagaço de malte o tratamento foi capaz de solubilizar 97,8% da arabinose, entretanto apenas 67% da xilose, totalizando 76,2% da hemicelulose da biomassa.

A escolha das condições (concentração do ácido, temperatura, tempo, relação sólido:líquido) a serem utilizadas no pré-tratamento ácido dependem do material a ser utilizado. Por exemplo, a hidrólise da grama costeira (Cynodondactylon L.) foi realizada por Redding et al. (2011). A maior recuperação de xilose foi de 83%, empregando 1,2% de ácido sulfúrico, a 140 °C por 30 minutos. Esse tratamento se mostrou estatisticamente similar em relação à liberação de xilose àqueles com 0,9% de H_2SO_4 a 160 °C a 15 minutos ou 140 °C a 60 minutos, ou ainda com 1,2% de H_2SO_4 a 160 °C por 5 minutos.

A biomassa palha de arroz foi pré-tratada com ácido diluído por Hsu et al. (2010). A recuperação dos açúcares da fração hemicelulósica no hidrolisado foi de 89% com tratamento a temperatura de 180 °C, solução de ácido na concentração de 1% H_2SO_4 (m/m) e 1 minuto. A mesma recuperação de xilose foi obtida no tratamento a 160 °C, 1% H_2SO_4 (m/m) por 5 minutos.

Mussatto e Roberto (2005) estudaram por meio de planejamento fatorial, as variáveis que influenciam no pré-tratamento do bagaço de malte a fim de otimizar a recuperação da fração hemicelulósica no hidrolisado. A maior recuperação da fração hemicelulósica foi de 96,5% obtida com relação sólido:líquido de 1:12 g/g, concentração de ácido de 140mg H_2SO_4 por grama de matéria seca e tempo de reação de 37 minutos. Nessas condições foi recuperado 94,2% de xilana e 100% de arabinana. A menor recuperação de hemicelulose foi de 88,7% nas condições

de 1:10 relação sólido:líquido, concentração de H_2SO_4 de 120 mg/g e 27 minutos de reação.

De acordo com Hendriks e Zeeman (2009) a vantagem do pré-tratamento com ácido diluído é tornar a celulose mais acessível para as enzimas na etapa de sacarificação enzimática, além de permitir o aproveitamento da fração hemicelulósica separadamente.

Mussatto e Roberto (2008) analisaram o efeito da hidrólise ácida na celulignina de bagaço de malte. A hidrólise ácida com 1,25% de H_2SO_4 por 17 minutos a 120 °C removeu 86,5% da hemicelulose, 14% da lignina e apenas 1,8% da celulose. O estudo morfológico da estrutura da biomassa mostrou que o material não tratado apresentou fibras rígidas e altamente ordenadas. A remoção da hemicelulose modificou pouco o material, aumentando o volume de seus poros mantendo a estrutura rígida inicial. Os autores também analisaram o efeito da hidrólise ácida sobre a sacarificação enzimática, e concluíram que a remoção da hemicelulose durante o pré-tratamento favorece o ataque das enzimas celulolíticas, e consequentemente a liberação dos monômeros de glicose. A conversão de celulose na etapa de sacarificação aumentou 3,5 vezes em relação ao controle não pré-tratado.

Cai et al. (2012) avaliaram, por superfície de resposta, as condições do pré-tratamento ácido do sabugo de milho para recuperação de xilose no hidrolisado e recuperação de glicose após hidrólise enzimática. Foram avaliados os parâmetros: concentração de ácido (0,16-1,84%), tempo de reação (0,16-1,74horas) e temperatura (105-130 °C). A variável resposta foi o rendimento de xilose recuperada no hidrolisado hemicelulósico, em relação à fração de hemicelulose presente no material anteriormente ao tratamento. Utilizando delineamento experimental uma equação polinomial de segunda ordem foi obtida, em função dos parâmetros estudados como temperatura, tempo e concentração de ácido. O modelo sugere que os parâmetros avaliados tem efeito significativo sobre o rendimento de xilose no hidrolisado, entretanto a combinação de temperatura e concentração de ácido, e tempo e concentração de ácido sofrem interação. Segundo os autores, essa interação sugere que o aumento do rendimento de xilose não aumenta apenas com maiores concentrações de ácido e temperatura, porque a interação de ambos afeta negativamente o rendimento de xilose. Por exemplo, o rendimento de xilose é com tratamento a 125 °C, 1,5h e

1,5%H2SO4 é menor do que após o tratamento a 125 °C, 1,5h 0,5%, pois mais furfural e 5-hidroximetilfurfural são produzidos, sugerindo reações de degradação por desidratação. A avaliação da melhor condição de hidrólise tem que levar em conta altos rendimentos de xilose e baixas taxas de degradação de açúcares.

O **pré-tratamento alcalino** é um método que visa principalmente à remoção da fração da lignina do material. Dependendo das condições de processo, a utilização do álcali pode ainda alterar a estrutura da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Este pré-tratamento baseia-se na utilização de compostos álcalis como agente catalisador. Em altas temperaturas este tipo de pré-tratamento causa uma série de reações de clivagem das ligações tipo éter entre as unidades de fenilpropano que compõe a lignina, promovendo a sua dissolução. Além disso a reação alcalina contribui para aumentar a área superficial da celulose e diminuir o seu grau de polimerização e cristalinidade, tornando-a mais acessível às enzimas na etapa de sacarificação.

Chen et al. (2012) estudaram o efeito do pré-tratamento alcalino sobre a recuperação das frações de celulose e hemicelulose empregando diferentes biomassas, incluindo: silvergrass, capim elefante e palha de arroz. O tratamento foi realizado por 8 semanas a 25 °C, utilizando de hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) e hidróxido de amônio (NH_4OH), nas concentrações de 0,1g/g e 0,03g/g de biomassa respectivamente. Segundo os autores a recuperação da celulose foi maior que 90% em ambos pré-tratamentos avaliados, porém a remoção de hemicelulose e lignina variou fortemente. Para todas as biomassas estudadas, o tratamento com hidróxido de cálcio removeu aproximadamente 70% da hemicelulose, enquanto que o tratamento com hidróxido de amônio removeu apenas 45% da hemicelulose. A maior remoção de lignina (42%) foi obtida no tratamento com hidróxido de cálcio empregando palha de arroz, seguida da silvergrass (22,7%) e capim elefante (12,9%). Segundo os autores a composição e o tipo de ligação presente na lignina foram determinantes para sua remoção em cada biomassa.

Cao et al. (2012) avaliaram o efeito do pré-tratamento alcalino sobre a recuperação das frações do bagaço de sorgo sacarino. O tratamento foi baseado em autoclavagem (121 °C) da biomassa embebida em solução de hidróxido de sódio 2%, por 60 minutos seguido de imersão em peróxido de hidrogênio 5% (v/v), a temperatura ambiente por 24 horas. Nestas condições, foi obtida uma

recuperação de 82% da celulose, acompanhado da remoção de 91% da lignina e 90,5% da hemicelulose, o que correspondeu a uma perda de massa de 46,1% de matéria seca. De acordo com os autores este pré-tratamento mostrou um efeito positivo sobre a recuperação de açúcares da celulose após sacarificação enzimática. A glicose liberada ao final da sacarificação (~19,0g/L), foi 9,8 vezes maior na biomassa pré-tratada quando comparada ao controle sem pré-tratamento.

O efeito da concentração de hidróxido de sódio sobre a concentração de glicose liberada após a etapa de sacarificação enzimática do bagaço de colza foi avaliado por Mathew et al. (2011). A reação foi realizada a 130 °C por 30 minutos e os resultados revelaram que o rendimento de glicose na sacarificação aumentou de 67,7% para 119,6% com o aumento da concentração de hidróxido de sódio de 0,13 para 0,75mol/L, o que corresponde a 0,52% e 3% respectivamente. O rendimento superior a 100% foi atribuído à liberação da glicose a partir do amido presente no bagaço de colza.

A explosão a vapor tem o objetivo de desorganizar a estrutura lignocelulósica, favorecendo a atuação das enzimas na etapa de sacarificação enzimática, e consequentemene aumentando a recuperação de açúcares da biomassa. Neste método a biomassa é tratada com vapor pressurizado, com adição ou ausencia de ácido mineral diluido (BALLESTEROS et al., 2000). A alta temperatura do vapor acarreta em liberação de grupos acetil ligados aos componentes da biomassa. Estes grupos na forma de ácido acético catalisam a hidrólise da ligação glicosídica que une os açúcares que compõe a hemicelulose, o que resulta na sua solubilização aquosa (ZIMBARDI et al., 2007)

O pré-tratamento por explosão a vapor tem como vantagem o baixo impacto ambiental, devido ao uso de baixas concentrações de compostos químicos, comparado aos processos de hidrólise ácida e alcalina (RUIZ et al., 2008). Segundo os autores, o processo apresenta a desvantagem de liberar altas concentrações de produtos de degradação da lignina e de açúcares, que são inibidores da etapa de fermentação dos açúcares (SÖDERSTRÖM et al., 2002).

O efeito da temperatura no tratamento de caule de girassol por explosão a vapor, sobre a recuperação dos açúcares da hemicelulose foram avaliados por Ruiz et al. (2008). Neste trabalho foram avaliadas as temperaturas de 180 e 230 °C, por tempo de 5 minutos. Como esperado a massa recuperada ao final do

processo diminuiu de 65 a 35% quando a temperatura foi aumentada de 180 para 230 °C. Essa variação foi atribuída a parcial solubilização de açúcares da hemicelulose na fração líquida, já que a fração de hemicelulose na fibra insolúvel diminuiu de 69 para 5% com o aumento da temperatura. De acordo com os autores, a arabinana foi removida completamente na menor temperatura estudada e a solubilização da xilana, manana e galactana aumentou com o aumento da temperatura. Os autores constataram que nas condições avaliadas, aproximadamente 90% dos açúcares da hemicelulose foram recuperados na forma oligomérica, e apenas na mais alta temperatura estudada (230 °C) foram detectados monômeros. Nestas condições a recuperação da fração hemicelulose decresceu, o que foi atribuído ao processo de degradação dos açúcares.

Ballesteros et al. (2000) estudou o efeito do tamanho das partículas da biomassa Pinus pinaster na recuperação da hemicelulose após pré-tratamento por explosão a vapor a 210 °C por 8 minutos. De acordo com os autores, a utilização de partículas de 2 a 5 mm permite a recuperação de menos 20% da hemicelulose enquanto que partículas de 5 a 8 mm e de 8 a 12 mm, a recuperação da hemicelulose aumentou para 49% e 56% respectivamente.

Cara et al. (2008) avaliou o efeito da impregnação de água e solução ácida na biomassa proveniente da poda de oliveiras no pré-tratamento por explosão a vapor. Segundo os autores a impregnação de água na biomassa antes do pré-tratamento por explosão a vapor aumentou a taxa de transferência de massa pelo material, favorecendo a hidrólise das ligações glicosídicas, o que foi ainda mais favorecido com a impregnação com solução ácida, que age como catalisador da reação. A recuperação em massa do material variou de 66 a 96%, sendo menor quando a impregnação foi realizada com 2% de ácido sulfúrico na temperatura de 210 °C, e maior quando a biomassa foi impregnada com água e pré-tratada a 200 °C.

Ruiz et al. (2008) observou que a sacarificação enzimática de talos de girassol pré-tratados por explosão a vapor a 220 °C foi capaz de recuperar 50% da glicose potencial da celulignina. Entretanto, no material pré-tratado a 210 °C foram recuperadas apenas 40,7% da glicose potencial. De acordo com os autores, o aumento da temperatura no tratamento de explosão a vapor aumenta a proporção de celulignina na fração insolúvel, e prepara a fibra para melhor ataque

das enzimas celulolíticas que hidrolisam essa fração da etapa de sacarificação enzimática.

A **autohidrólise,** assim como o tratamento por explosão a vapor, tem como objetivo a desorganização da estrutura lignocelulósica da biomassa e consequentemente favorecer a liberação dos açúcares na sacarificação enzimática (LI et al., 2007). Este pré-tratamento envolve água no estado vapor e alta pressão, porém não requer rápida descompressão do reator e nem adição de agentes químicos. A reação de hidrólise é catalisada por ácidos orgânicos liberados durante o contato com o vapor a altas temperaturas (160 a 240 °C). A concentração dos ácidos solubilizados da hemicelulose é refletida no perfil de pH do hidrolisado obtido após o pré-tratamento, e, portanto indica sua severidade. Simultaneamente há solubilização de extrativos, parcial dissolução da lignina e cinzas e solubilização de proteínas (LEE et al., 2009).

De acordo com Monsier et al. (2005) a autohidrólise promove uma menor formação de inibidores quando comparado ao tratamento por explosão a vapor. Neste tratamento, os açúcares da hemicelulose são solubilizados na forma de oligossacarídeos, minimizando a formação de produtos de degradação. Essa característica exige que ambas as frações (celulose e hemicelulose) obtidas da autohidrólise da biomassa sejam novamente hidrolisadas aos monômeros de açúcares fermentáveis. (LEE et al., 2009)

Kumar et al. (2011) estudou o efeito da autohidrólise sobre a recuperação das frações celulose, hemicelulose e lignina na biomassa switchgrass. Os autores constataram que o aumento da temperatura foi responsável por aumentar a solubilização da hemicelulose de 30% para 70% quando a temperatura aumentou de 150 °C para 190 °C, durante o pré-tratamento por 20 minutos. Foi ainda observado uma solubilização de 40% da fração de lignina, independente da temperatura empregada. Segundo os autores, a porção de celulose na fração insolúvel aumentou para 51% no material pré-tratado a temperatura de 150 °C, e aumentou para 58% a 190 °C, em comparação com a switchgrass nativa (38,9%). O rendimento de recuperação de glicose na sacarificação também aumentou de 25% para 82% com o respectivo aumento de temperatura.

Mosier et al. (2005) estudou as condições (tempo e temperatura) que permitissem maior recuperação de açúcares das frações de celulose e hemicelulose no pré-tratamento autohidrólise de palha de milho. Os autores

observaram que com 15 minutos de pré-tratamento a 190 °C foram recuperados 32,5 g/L de glicose e 18 g/L de xilose após sacarificação enzimática do material, o que correspondeu à recuperação de 90% dos açúcares da biomassa.

Lee et al. (2009) estudou o efeito da temperatura e tempo de residência do pré-tratamento autohidrólise de grama costeira, sobre a recuperação da hemicelulose. Os autores observaram que na temperatura de 150 °C, o aumento do tempo de residência de 30 para 60 minutos acarretou aumento na solubilização da fração de hemicelulose de 21,5% para 32,76% respectivamente. Dentre condições avaliadas, a maior solubilização de hemicelulose (66%), foi obtida no pré-tratamento a 170 °C por 60 minutos, e nestas condições 89,4% dos açúcares desta fração estavam na forma de monossacarídeos. Segundo os autores, a autohidrólise também afetou o rendimento da sacarificação enzimática da fração sólida obtida após o pré-tratamento. O maior rendimento de hidrólise (85%) foi observado no material pré-tratado a 170 °C por 60 minutos, enquanto que o material não pré-tratado apresentou rendimento de hidrólise de 22%.

Recentemente Kumar et al. (2011) avaliou a influencia de diferentes pré-tratamentos na capacidade e custo de produção de etanol. Segundo os autores, a capacidade de uma planta que utiliza o pré-tratamento com ácido diluído pode chegar a 59 milhões de litros por ano, enquanto que para o pré-tratamento por explosão a vapor a capacidade da planta decresce para 53 milhões de litros por ano. Esse decréscimo da capacidade foi atribuído à baixa eficiência de hidrólise na etapa de sacarificação enzimática no pré-tratamento por explosão a vapor. Com relação ao custo do litro do etanol os autores constatam uma variação de aproximadamente 9% entre os pré-tratamentos avaliados. Em ordem crescente, o custo variou de $ 0,81,$ 0,84, $ 0,86 e $ 0,89 para os pré-tratamentos autohidrólise, hidrólise ácida diluída, explosão a vapor e hidrólise alcalina respectivamente. O maior custo do etanol observado na hidrólise alcalina foi atribuído ao alto valor do hidróxido de sódio quando comparado ao ácido sulfúrico da hidrólise ácida.

2.2. Fermentação da fração hemicelulósica

A hidrólise da hemicelulose fornece principalmente unidades monoméricas de xilose, e de uma forma geral os maiores rendimentos e produtividades da bioconversão desse açúcar em etanol são obtidos por leveduras. A levedura Pichia stipitis é relatada como a mais promissora para conversão de xilose em etanol, uma vez que possui capacidade de fermentar uma ampla variedade de açúcares, não necessita de adição de vitaminas ao meio de fermentação e apresenta altos rendimentos de etanol a partir de xilose (NIGAN et al., 2001).

O estabelecimento das condições ótimas do meio de cultura é uma importante maneira de aumentar a produtividade e melhorar a eficiência do bioprocesso. A bioconversão de açúcares em etanol pode ser influenciada por fatores como temperatura, pH, oxigenação, adição de nutrientes e concentração inicial de substrato, inóculo e presença de inibidores, entre outros fatores (SILVA et al., 2010).

A bioconversão da fração hemicelulósica solubilizada durante o pré-tratamento da biomassa pode ser realizada em separado ou conjuntamente com a fração celulósica, utilizando micro-organismos fermentadores de pentoses. Na fermentação em separado a biomassa necessita ser fracionada para obtenção do hidrolisado hemicelulósico. O método mais empregado para esse fracionamento é o pré-tratamento com ácido diluído e vários trabalhos na literatura tem avaliado o processo de produção de etanol a partir destes hidrolisados.

Okur et al. (2006) realizou a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de casca de semente de girassol para produção de etanol utilizando a levedura P. stipitis. A biomassa foi submetida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (0,7 mol/L), relação sólido:líquido de 1:5, temperatura de 90 °C, e tempo de reação de 3,5horas. O hidrolisado foi recuperado por filtração e apresentou 37g/L de xilose. Segundo os autores após 24 horas de fermentação a levedura produziu 9,66 g/L de etanol, com um fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S)}$ de 0,41 e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) de 0,18g/L.h.

A produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz pela levedura Pichia stipitis foi avaliada por Silva et al. (2010). A biomassa foi pré-tratada com ácido sulfúrico na concentração de 100 mg/g de massa seca, por 30 minutos a 120 °C, obtendo-se um hidrolisado de 19g/L de xilose. Segundo

os autores os melhores resultados foram obtidos com uma concentração de xilose de 50g/L no hidrolisado, agitação de 200 rpm e aeração de 2,5 (relação V_{fraco}/V_{meio}). Nestas condições o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi de 0,37 g/g e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foi de 0,39g/L.h.

2.3 Fermentação da fração celulósica

A bioconversão da fração celulósica em etanol ocorre em dois passos. Primeiramente a cadeia de celulose é hidrolisada enzimáticamente, gerando unidades monoméricas (glicose), que na segunda etapa serão fermentadas em etanol (CASTRO, 2012).

A hidrólise enzimática, também chamada de sacarificação enzimática é determinante para alcançar o custo benefício necessário para produção de etanol e é responsável por grande impacto no custo total do processo. Baixa carga de enzimas gera baixos rendimentos e taxas de reação, enquanto elevada carga de enzimas aumenta o custo do processo (HAMELINCK et al., 2005).

A etapa de sacarificação enzimática é baseada na ação do grupo de enzimas celulases, que são capazes de hidrolisar a celulose sinergisticamente. O grupo é composto principalmente por endoglucanase, exoglucanase e β-glicosidase. A endoglucanas, (EG) ou endo-1,4-D-glucanohydrolase, ataca regiões de baixa cristalinidade da fibra da celulose hidrolisando as ligações glicosídicas intercadeia. A exoglucanase ou celobiohidrolase, 1,4-b-D-glucan celobiohidrolase age nas extremidades da fibra de celulose, e removendo unidade de celobiose. Já a enzima β-glicosidase age na estrutura da celobiose, hidrolisando-a a dois resíduos de glicose.

A sacarificação enzimática é afetada por fatores como: características do substrato, carga da enzima, condições de reação, e inibição causada pelo produto das reações (inibição por feedbach ou retroalimentação). Também influenciam na sacarificação as características da estrutura da celulose como a cristalinidade (recalcitrância), a área superficial, o grau de intumescimento, a polimerização da fibra da celulose e sua associação com outras frações da celulignina.

A hidrólise enzimática da celulose é um fenômeno de superfície no qual ocorre contato físico direto entre enzima e substrato. A principal barreira do processo, portanto é o acesso limitado das enzimas a grande parte do substrato, que se encontra em estrutura altamente ordenada (ARANTES; SADDLER, 2011).

Segundo Rollin et al. (2011) o aumento da acessibilidade da celulose é mais importante do que a deslignificação do material. Os autores demonstraram que a hidrólise alcalina com amônia da gramínea Panicum virgatum resulta na deslignificação da biomassa, porém não aumenta a eficiência da etapa de sacarificação enzimática. Tratando o mesmo material com solventes orgânicos e inorgânicos, 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.

A influência da associação da celulose com outras frações da celulignina (hemicelulose e lignina) foram estudadas por Mussatto et al. (2008). Os autores observaram que a remoção da hemicelulose e da lignina do bagaço de malte permitiu a rendimento de glicose de 85,6%, e taxa de conversão de celulose de 91,7%. Esses valores correspondem a aumento do rendimento e taxa de conversão de 14,5 e 17,4% quando comparado àquele obtido para a celulignina, e aumento de 280 e 310% quando comparado com a biomassa sem qualquer pré-tratamento, respectivamente.

Outro fator importante na etapa de sacarificação para aumentar o teor de glicose solubilizada no hidrolisado é a relação sólido:líquido. De acordo com Kristensen et al. (2009) o uso de altos teores de sólidos permite alcançar alta concentração de açúcar na etapa de sacarificação enzimática da biomassa., porém a utilização de sólidos acima de 10% (m/v) aumenta a viscosidade do meio limitando a transferência de massa, além de causar inibição da atividade enzimática pelo produto gerado.

O efeito do pré-tratamento ácido do sabugo de milho sobre a eficiência da sacarificação enzimática foi avaliado por Cai et al. (2012). As condições de pré-tratamento foram avaliadas por planejamento fatorial e os parâmetros estudados foram concentração de ácido (0,16-1,84%, tempo de reação (0,16-1,74horas) e temperatura (105-130 °C). A sacarificação enzimática foi realizada em 72 horas com carga enzimática de 30 FPU/g de celulose, e 8% de consistência. O rendimento de glicose recuperada variou de 26,5g/100g de biomassa até 33,4g/100g de biomassa, sendo observado acúmulo de celobiose durante a hidrólise enzimática. A resposta foi dada pela soma de glicose e celobiose, uma vez que, segundo os autores, a celolobiose é rapidamente metabolizada durante

a sacarificação e fermentação simultâneas. Os dados permitiram ajuste de um modelo, relacionando as variáveis de glicose + celobiose, em função da temperatura, tempo e concentração de ácido utilizados no pré-tratamento ácido diluído. O perfil da resposta sugere grande interação entre as variáveis independentes, e ainda revelou que o maior rendimento de glicose+celobiose foi obtido no pré-tratamento ácido a 125 °C, 0,5h e 0,5%H_2SO_4. De acordo com os autores, significante porção de xilose que não foi liberada no hidrolisado hemicelulósico durante o pré-tratamento ácido foi recuperada na sacarificação enzimática, entretanto a condição que permitiu máxima recuperação de xilose não foi a mesma que permitiu melhor recuperação de glicose e celobiose na sacarificação enzimática

Após a liberação de glicose, o processo fermentativo pode ser conduzido empregando duas configurações diferentes: hidrólise e fermentação em separado (SHS) e sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (GARCÍA-APARÍCIO et al. (2011).

A sacarificação e fermentação em separado (SHF) é caracterizada pela inoculação do micro-organismo fermentador após a etapa de sacarificação. Essa configuração tem a vantagem de realizar cada etapa em sua condição ideal: hidrólise enzimática a 45-50 °C e a fermentação a 30 °C. A principal desvantagem é a inibição sofrida pelas enzimas pelo acúmulo de glicose e celobiose, diminuindo o rendimento de hidrólise (OLOFSSON et al., 2008). Para minimizar o efeito da inibição da glicose e celobiose, e alcançar maiores rendimentos de hidrólise, é necessário utilizar menor carga de sólidos, ou maior carga enzimática. (BALAT et al., 2011) Porém, a menor carga de sólidos relaciona-se com menor concentração de glicose liberada, e consequentemente a menor quantidade de etanol obtida na etapa de fermentação. O aumento da carga enzimática por sua vez eleva o custo do processo (OHGREN et al., 2007) .

Segundo Drussen et al. (2009) uma alternativa para diminuir o efeito de inibição por retroalimentação é a remoção contínua da glicose. Isso pode ser feito utilizando as etapas de sacarificação e fermentação simultaneamente (SSF), uma vez que as leveduras consomem a glicose, retirando-a do meio e produzindo etanol. O maior desafio da SSF é encontrar condições compatíveis para atuação das enzimas da sacarificação e dos micro-organismos da fermentação. A condição de pH é a mesma para ambos, já que tanto as enzimas e as leveduras

atuam na faixa entre 4,5 e 5. Entretanto a temperatura das celulases é aproximadamente 50 °C, bem superior à das leveduras empregadas, de 30 a 37 °C. Para o sucesso da técnica é necessário o uso de leveduras termo tolerantes capazes de fermentar glicose a etanol em temperaturas acima de 40 °C. (DRUSSEN et al., 2009)

Wang et al. (2013) utilizou o método de superfície de resposta para otimizar os parâmetros da sacarificação e fermentação simultâneas no bagaço de sorgo sacarino pré-tratado com ácido diluído. Os parâmetros avaliados foram temperatura (35 a 45 °C), concentração de sólidos (4 a 10%), carga de celulase (10 a 35FPU/g de glicose) e concentração de inóculo (0,5 a 1,5g/L) de forma a maximizar os parâmetros fermentativos (eficiência, concentração de etanol, produtividade de etanol). Segundo os autores, a máxima eficiência em etanol (98,8%) foi obtida nas condições de 37 °C, 25FPU/g-glicose, 7% de sólidos, e 1,3g/L de inóculo inicial, enquanto que a concentração de etanol atingiu máxima de 39g/L quando o processo foi conduzido a 35 °C, com 29 FPU/g-glicose, com 10% de sólidos, e com 1,4 g/L de inóculo inicial. A maior produtividade de etanol foi de 6,42g/L.h e foi observada em diferentes condições das anteriores (45 °C, 30FPU/g-glicose, 4% de sólidos, e 1,5g/L de inóculo inicial).

Cai et al. (2012) estudou o efeito das condições de hidrólise ácida sobre a recuperação das frações celulósica e hemicelulósica de sabugo de milho. Segundo os autores as condições que permitiram maior recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico não foram as mesmas que permitiram maior recuperação de glicose após hidrólise enzimática da fração sólida de celulignina. A maior recuperação de xilose foi obtida com 1%H_2SO_4, por 1,5horas a 123 °C, o que correspondeu a 87,2% do total de xilana disponível. A máxima recuperação de glicose e celobiose (78,1%) na hidrólise enzimática foi obtida da fração sólida submetida ao pré-tratamento com 0,5%H_2SO_4, 30 minutos e 125 °C. A sacarificação e fermentação da fração sólida rica em celulose obtida nas duas diferentes condições de pré-tratamento ácido foi realizada, e segundo os autores na SSF com 14% de sólidos e material tratado com 0,5%H_2SO_4, 30 minutos e 125 °C, permitiu obtenção de máxima concentração de etanol (50,2g/L) o que corresponde a rendimento teórico de 70,4%, baseado na proporção de celulose no material, e não foi observado acumulo de celobiose.

2.4 Formação de compostos inibidores e seu mecanismo de inibição

O processo de pré-tratamento da biomassa pode acarretar na liberação de substâncias com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano, podendo desta forma afetar a eficiência e produtividade do processo fermentativo (BALLESTEROS et al., 2000). A natureza dos compostos inibidores e sua concentração nos hidrolisados dependem da matéria prima e do método de pré-tratamento empregado (DU et al., 2010). Tais compostos podem ser classificados de acordo com sua origem: 1) produtos de degradação da lignina, como compostos fenólicos e polifenólicos; 2) produtos de degradação de pentoses e hexoses, como furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente; 3) produtos hidrolisados da estrutura da hemicelulose, como ácido acético. A Figura 2.3 ilustra a origem dos inibidores na estrutura da biomassa. Eles podem influenciar fortemente o metabolismo microbiano e assim afetar a eficiência e produtividade do processo fermentativo. Tais inibidores agem de uma forma diferente na estrutura celular e a concentração tóxica de cada composto depende das condições de fermentação, do micro-organismo em questão, e do efeito sinergístico entre eles (KWON et al., 2011).

Os **compostos fenólicos** de baixa massa molar são geralmente derivados da fração de lignina da biomassa lignoclelulósica, que são solubilizados e degradados durante a hidrólise e fracionamento desse material. A vanilina, ácido vanílico, álcool vanilil são exemplos de inibidores provenientes das subunidades guaiacil da lignina. O siringaldeído, ácido siringil são provenientes da subunidade siringil, enquanto o p-hidroxibelzaldeído e ácido p-hidroxibenzóico são derivados das subunidades p-hidroxifenil da lignina (KLINKE et al., 2007).

O ácido ferúlico e p-cumárico tem função de efetuar ligações cruzadas entre a lignina e cadeias de xilana, e quando liberados na hidrólise ácida podem afetar negativamente o processo fermentativo (MATHEW; ABRAHAM, 2004).

Du et al. (2010) estudou o efeito de diferentes pré-tratamentos da palha de milho na liberação de compostos fenólicos, incluindo aldeídos e ácidos aromáticos. Segundo os autores o hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento ácido com 0,7% de H_2SO_4 continha vanilina (4 mg/L), siringaldeído (1,8 mg/L), ácido ferúlico (6,6 mg/L), e ácido vanílico (3,3 mg/L). Para o pré-tratamento alcalino com hidróxido de cálcio na concentração de 0,1g por grama de biomassa

o hidrolisado apresentou vanilina (3,6 mg/L), siringaldeído (1,0 mg/L), ácido ferúlico (6,6 mg/L), e ácido vanílico (3,3 mg/L). O pré-tratamento por autohidrólise por sua vez forneceu um hidrolisado com de vanilina (2,6 mg/L), siringaldeído (1,0 mg/L), ácido ferúlico (2,2 mg/L), e ácido vanílico (2,6 mg/L). Nas condições avaliadas o pré-tratamento de autohidrólise foi o que forneceu menor concentração de inibidores.

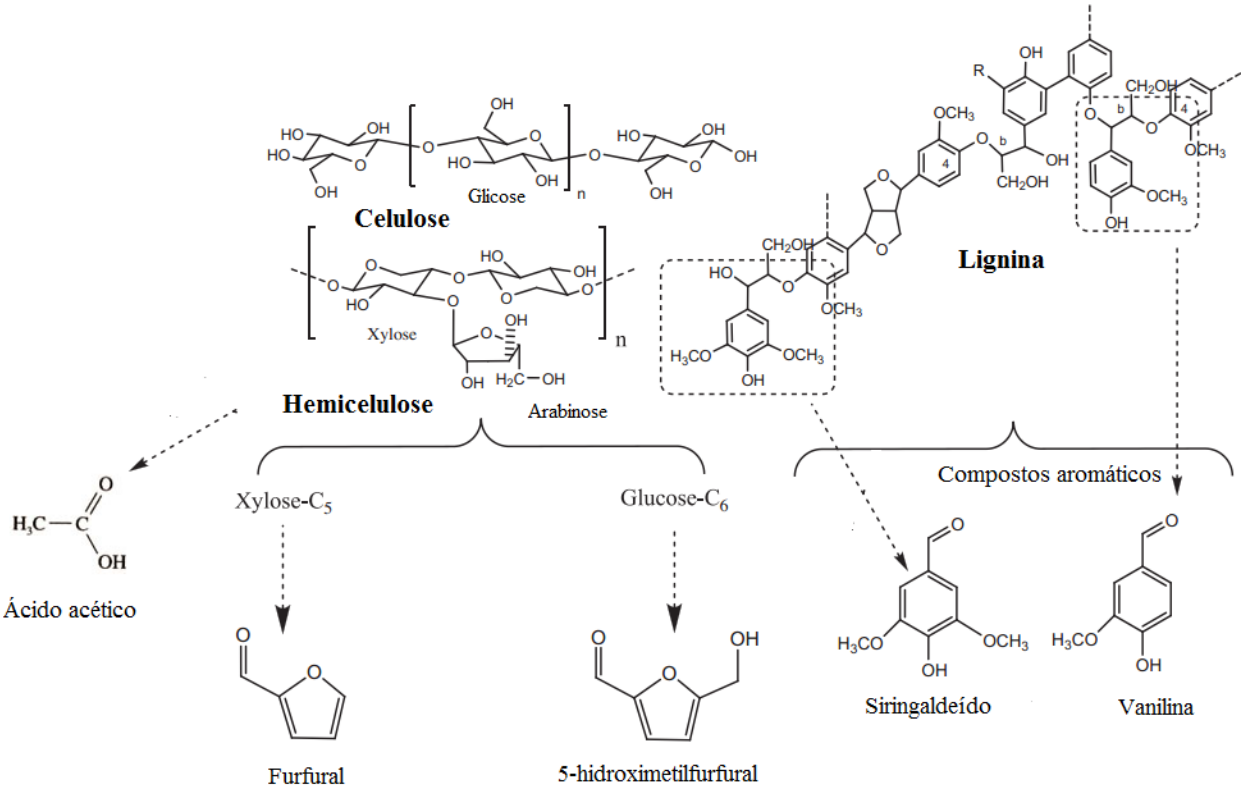


Figura 2.3. Formação dos inibidores a partir da biomassa. Adaptado de Barakat et al. (2012)

Os compostos fenólicos tem o efeito inibitório atribuído, em geral, ao seu caráter hidrofóbico. Essa propriedade permite que esses compostos tenham afinidade pela membrana plasmática dos organismos fermentadores, o que aumenta a fluidez da membrana, diminuindo sua seletividade (PALMQVIST et al., 2000) A toxicidade aumenta quando mais hidrofóbico for o composto e, quanto menor for sua massa molar (ZALDIVAR et al., 1999).

Tran e Chambers (1986) avaliaram o efeito de composto fenólico sobre a fermentação pela levedura Pichia stipitis CBS 5776. A presença de 0,091g/L de vanilina no meio de cultura promoveu uma queda de 54,3% na produção de

etanol em relação ao controle sem inibidor, enquanto que na presença de 0,22g/L de siringaldeído a produção de etanol foi reduzida em 72,2%.

Delgenes et al. (1996) estudou o efeito dos compostos fenólicos vanilina e siringaldeído na fermentação de xilose e glicose para fermentação de etanol por diferentes leveduras. Segundo os autores a presença de vanilina na concentração de 0,5 g/L promoveu decréscimo de 47% e 11% na produção de etanol das leveduras Candida shehatae e Pichia stipitis, respectivamente, em relação ao controle sem a presença do inibidor. Quando a concentração de vanilina foi aumentada para 1,0 g/L o rendimento em etanol decaiu para 6,3 e 0,7% para as leveduras respectivamente. Neste trabalho os autores também avaliaram o efeito dos inibidores sobre fermentação de glicose pelas leveduras Saccharomyces cerevisiae e Zimomonas mobilis, tendo observado um efeito menos pronunciado da vanilina na fermentação de glicose. A presença da vanilina na concentração de 0,5g/L acarretou redução da concentração do etanol produzido de 70% e 86% para as leveduras respectivamente, em relação ao controle sem inibidor. Quando a concentração de vanilina foi aumentada para 1 g/L, a concentração do etanol produzido foi reduzida de 11 e 20%, em relação ao controle respectivamente.

Os **compostos furanos** são representados principalmente por furfural (2-furaldeído) e hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldeído), que são produto da degradação de pentoses e hexose respectivamente (Figura 2.3).

A degradação dos açúcares acontece por desidratação sob altas temperaturas e especialmente na presença de ácido, como no processo de fracionamento com ácido diluído. (FENGEL; WEGENER, 1989) Os ácidos fórmicos e levulínico também podem se formar da degradação desses compostos aldeídos. (MILLS et al., 2009)

Segundo Du et al. (2010) a liberação de compostos furanos está relacionada com a acidez do pré-tratamento. A presença desses compostos é observada para várias biomassas quando em condições ácidas de pré-tratamento, entretanto, quando são utilizados tratamentos alcalinos a concentração de furanos é ínfima. Segundo o autor tratamentos ácidos são capazes de solubilizar açúcares da celulose e hemicelulose, o que os torna mais susceptíveis a degradação e formação de compostos furanos. Tratamentos alcalinos, entretanto não são igualmente eficientes na solubilização de açúcares, e por isso é menor a taxa de degradação.

O hidrolisado obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte não apresentou altas concentrações de hidroximetilfurfural (HMF), produto da degradação de hexoses, apenas 0,09g por litro de hidrolisado. A baixa concentração de HMF foi atribuída ao fato de que o tratamento em questão não foi capaz de hidrolisar a celulose. A concentração de furfural, entretanto foi bem mais pronunciada, variando de 0,28 a 1,02g/L de hidrolisado, nas condições de concentração de ácido de 100 mg/g, relação sólido:líquido 1:8, e tempo de reação de 17 e 37 minutos respectivamente. Segundo os autores a concentração de furfural e hidroximetilfurfural não foi influenciada pelas variáveis do pré-tratamento empregado, como baixa concentração de ácido (menor que 1,5) e temperatura (menor que 120 °C). (MUSSATTO; ROBERTO, 2005)

A ação inibitória dos compostos furanos baseia-se em diferentes princípios. Segundo Rahmam et al. (1991) os compostos furanos tem afinidade por sequências de DNA ricas nas bases nitrogenadas adenina e timina, e reagem primeiramente nessas regiões ocasionando a quebra da dupla fita DNA, o que acarreta em mutações. O autor tratou o DNA com furfural e observou 4,86 quebras por unidade de DNA, na sequência nativa, enquanto observou apenas 0,54 quebras quando usou uma sequência pobre nas bases AT. Quando tratou com hidroximetilfurfural observou 3,4 e 0,24 respectivamente.

A ação inibitória dos compostos furanos também pode ser atribuída a sua propriedade hidrofóbica, que é responsável por danos à membrana plasmática, e a sítios hidrofóbicos no interior da célula. Essa ação acarreta a diminuição do crescimento celular e diminuição da produção de etanol (JORDAN et al., 2011)

Segundo Bellido et al. (2011) a fermentação de xilose pela levedura Pichia stipitis foi inibida quando a concentração de furfural foi de 2g/L. O principal efeito causado pelo furfural foi retardar o consumo de açúcar e consequente diminuir da produtividade nas primeiras 24 horas de fermentação, proporcionalmente ao aumento da sua concentração. A produtividade volumétrica (Q_P) de etanol decresceu pela metade em relação ao controle, em 24 horas, quando a concentração de furfural foi 1g/L, e foi de 0,24 e 0,5 g/L quando o inibidor estava nas concentrações 2 e 0,5g/L respectivamente. Segundo o autor o crescimento celular foi afetado pela presença de furfural, entretanto o rendimento em etanol (0,39g de etanol/g de açúcar) se manteve constante. Ao final do experimento não foram detectadas concentrações de furfural ou hidroximetilfurfural, o que, segundo

o autor, representa a assimilação desses componentes pelo micro-organismo antes do crescimento e produção de etanol (BELLIDO et al., 2011).

O **ácido acético** é liberado durante o tratamento térmico ou químico da biomassa, quando o grupo funcional acetil é clivado da estrutura da hemicelulose. A concentração de ácido acético liberada depende do tratamento, e relaciona-se fortemente com a frequências que grupamento acetil presente no material. (FENGEL; WEGENER, 1989)

Mussatto e Roberto (2005) analisaram a concentração de ácido acético no hidrolisado obtido do pré-tratamento ácido diluído do bagaço de malte, que variou de 0,76 a 1,39g por litro de hidrolisado. A maior liberação de ácido acético foi obtida no tratamento com relação sólido:líquido de 8g/g , 140 mg H_2SO_4 por grama de matéria seca, e 37minutos de reação.

Panagiotopoulos et al. (2012) estudou a liberação de ácido acético após o pré-tratamento ácido e sacarificação enzimática da palha de cevada. Segundo os autores a concentração de ácido acético no hidrolisado foi influenciada pela temperatura do pré-tratamento, concentração de ácido sulfúrico e carga enzimática da sacarificação. Elevando a temperatura do pré-tratamento de 160 para 180 °C aumentou em 46% a concentração de ácido acético no hidrolisado. Os tratamentos com diferentes cargas enzimáticas foram influenciados diferentemente quando a concentração de ácido sulfúrico aumentou. Nos tratamentos com 5, 15, 30 e 45FPU/g o aumento da concentração de ácido (de 0 para 2%g/g) aumentou em 42%, 25%, 18% e 13% a concentração de ácido acético respectivamente.

Du et al. (2010) avaliou a liberação de ácido acético no hidrolisado obtido de diferentes pré-tratamentos da palha de milho, todos conduzidos a 180 °C por 8 minutos. O pré-tratamento com hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 0,7% forneceu hidrolisado com 170g/L de ácido acético. Quando a concentração de H_2SO_4 foi diminuída dez vezes (0,07%), a concentração de ácido acético diminui pra 83g/L. No pré-tratamento alcalino com hidróxido de amônio (0,1%) e hidróxido de cálcio (0,1g/g de biomassa), o hidrolisado apresentou 180g/L e 120g/L de ácido acético respectivamente. A autohidrólise foi o pré-tratamento que apresentou menor concentração de ácido acético no hidrolisado, apenas 34g/L

O ácido acético tem efeito inibitório mais pronunciado sobre o crescimento celular, do que nos parâmetros da fermentação (TAHERZADEH et al., 1997). O

mecanismo inibitório do ácido acético baseia-se na sua capacidade de atravessar a membrana plasmática em certas condições. Por exemplo, quando o pH do meio é inferior ao pK_a do ácido acético, que é 4,75, esse ácido orgânico na forma protonada se solubiliza nos lipídeos de membrana. Uma vez no interior da célula, que tem pH neutro maior que o pK_a do ácido acético, ele perde seu próton H^+, e é liberado na forma de ânion. Para manter constante a concentração de H^+ intracelular, e assim o pH, é necessário que os prótons sejam bombeados para fora da célula pela ação da ATPase trans-membrana. Esse mecanismo acarreta no aumento do consumo de ATP, ou seja, menos energia é utilizada para produção de biomassa (TAHERZADEH et al., 1997). A liberação do próton funciona como um mecanismo de desacoplamento do gradiente iônico que rompe com o potencial transmembrana da célula. Após a dissociação do ácido acético no interior celular, o ânion liberado também tem efeito inibitório no micro-organismo por seu acúmulo causa aumento na pressão de turgor.

Pampulha et al. (2000) utilizaram uma levedura mutante Sacharomyces cerevisiae, deficiente de respiração, com capacidade de metabolizar glicose apenas pela via fermentativa, o que permitiu mensurar a quantidade de ATP produzido pela produção de etanol e glicerol. Como esperado foi observado um aumento da fase lag da levedura, quando a concentração de ácido acético foi de 170 mM. O autor observou que o rendimento de ATP diminuiu de 14 para 4 mols de ATP por g de células, quando a concentração de ácido acético aumentou de 0 para 170mM, sendo ainda constatada uma relação linear entre a taxa de produção de ATP e a captação de ácido acético para o interior celular, o que sugere que aproximadamente 1 mol ATP é consumido para cada mol de ácido acético difundido pela membrana.

Assim um mecanismo para diminuir o efeito inibitório no microrganismo é manter o pH do meio acima do pK_a do ácido acético. Como o ácido é capaz de penetrar na membrana plasmática apenas na forma protonada, manter o pH acima de 4,75 permite que as moléculas em solução permaneçam principalmente se forma desprotonada, diminuindo a frequência com que entram na célula. Certamente deve ser levado em conta o pH no qual o microrganismo apresenta as maiores fatores de conversão e produtividade no processo fermentativo (LIGAM, 2001)

Bellido et al. (2011) observou que a presença de ácido acético na concentração de 3,5 g/L inibiu completamente o crescimento da levedura Pichia stiptis DSM 3651, e consequentemente a sua produção de etanol. Segundo os autores a presença de ácido acético nas concentrações analisadas afetou mais fortemente o consumo de xilose quando comparado ao consumo de glicose pela levedura. A concentração de etanol obtida nos experimentos com ácido acético nas concentrações 2.5, 1,5 e 0,5 g/L decresceu quando a concentração do ácido aumentou, sendo 10,4 g/L, 17,5 g/L e 18,0 g/L de etanol respectivamente, enquanto o controle sem adição de ácido apresentou concentração de etanol produzido de 22,8 g/L. A produtividade volumétrica (Q_P) também diminuiu na presença de ácido acético, sendo máxima no controle (0,61 g/L.h) após 24 horas de fermentação, e 0,15 g/L.h na presença do ácido na concentração de 1 g/L.

Delgenes et al. (1996) analisou o efeito da presença de ácido acético na fermentação de xilose pela leveduras Pichia stipitis e Candida shehatae. Segundo o autor o ácido acético na concentração de 15 g/L foi responsável por diminuir a produção de etanol da P stipitis e C. shehatae em 64% e25% respectivamente, em relação à cultura controle sem inibidores. A presença de ácido acético na concentração de 13 g/L foi capaz de inibir quase completamente a fermentação por P. stipitis.

Belido et al. (2011) estudou o efeito da concentração de ácido acético e ácido oxálico, no meio sintético que mimetiza composição do hidrolisado de palha de milho submetida à hidrólise ácida e a sacarificação enzimática (35g/L glicose e 20g/L xilose). As relações de 6,5/1,5 e 4,0/6,0 de ácido oxálico/ácido acético foram avaliadas. Segundo os autores, concentrações altas de ácido oxálico e ácido acético levam a uma forte inibição da levedura P. stipitis, acarretando na não fermentação de 90% dos açúcares presentes no hidrolisado e consequentemente baixa concentração de etanol. Quando a concentração dos inibidores baixou para a relação 4,0/6,0g/L ácido oxálico/ácido acético, o processo de inibição diminuiu permitindo a fermentação de etanol a rendimentos de etanol de 0,37g/g. Quando apenas o ácido oxálico (4g/L) foi adicionado ao meio de fermentação, o rendimento de etanol aumentou para 0,38g/g, o consumo de açúcar foi ligeiramente maior quando comparado ao tratamento que apresentou 6,0g/L de ácido acético na composição.

O efeito combinatório dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico é grande responsável por sua toxicidade. A interação dos compostos é muitas vezes mais nociva ao microrganismo do que a presença de um único composto tóxico (OLIVA et al., 2006). Segundo estes autores o rendimento de produção de etanol da levedura *Kluyveromyces marxiamnus* CECT 10875 foi mais afetado pelo efeito sinergético dos compostos ácido acético, furfural e catecol, quando comparado ao efeito de cada um separadamente. Na ausência dos compostos inibidores a taxa de crescimento específico foi de 0,37h^{-1}, o fator de substrato em etanol e em biomassa foi de 0,42g/g e de 0,115g/g respectivamente. Quando os compostos inibidores foram testados em sua maior concentração (furfural 1,6 g/L, ácido acético 8 g/L e catecol 0,8 g/L) os parâmetros fermentativos decresceram para 0,02h^{-1}, 0,03 g/g e 0,02 g/g respectivamente.

2.5 Bagaço de Malte

O bagaço de malte consiste basicamente da casca do grão de cevada obtida após o preparo do mosto cervejeiro, esquematizado na Figura 2.4. A cevada é um cereal empregado como matéria prima para a elaboração de cerveja, rico em amido e proteínas, composto basicamente por casca externa, endosperma amiláceo e germe. Para ser utilizada no processo cervejeiro a cevada colhida é armazenada por 4 a 6 semanas até atingir a plenitude do poder germinativo. Após esse período é submetida a processo de maltagem com o objetivo de aumentar o conteúdo enzimático dos grãos. (MUSSATTO et al., 2007)

A maltagem consiste na germinação e secagem dos grãos de cevada. Na malteação os grãos limpos são colocados em tanques de água, que é trocada a cada 6 a 8 horas. Após 2 dias a umidade do grão atinge 42 a 48%, o que ativa o metabolismo da semente, induzindo a germinação. O processo de germinação ocorre em compartimentos com controle de umidade e temperatura, e acarreta em mudança físico-química e estrutural no grão, que ativa as principais enzimas do malte (amilase, protease, glucanase, entre outras). Após 6 ou 7 dias o grão germinado (malte de cevada) é seco a temperatura de 40 a 60 °C até umidade de 4 a 5%, para evitar contaminação bacteriana e desenvolver sabor do malte, durante armazenamento em silos por 3 a 4 semanas (TCHOPE, 2001).

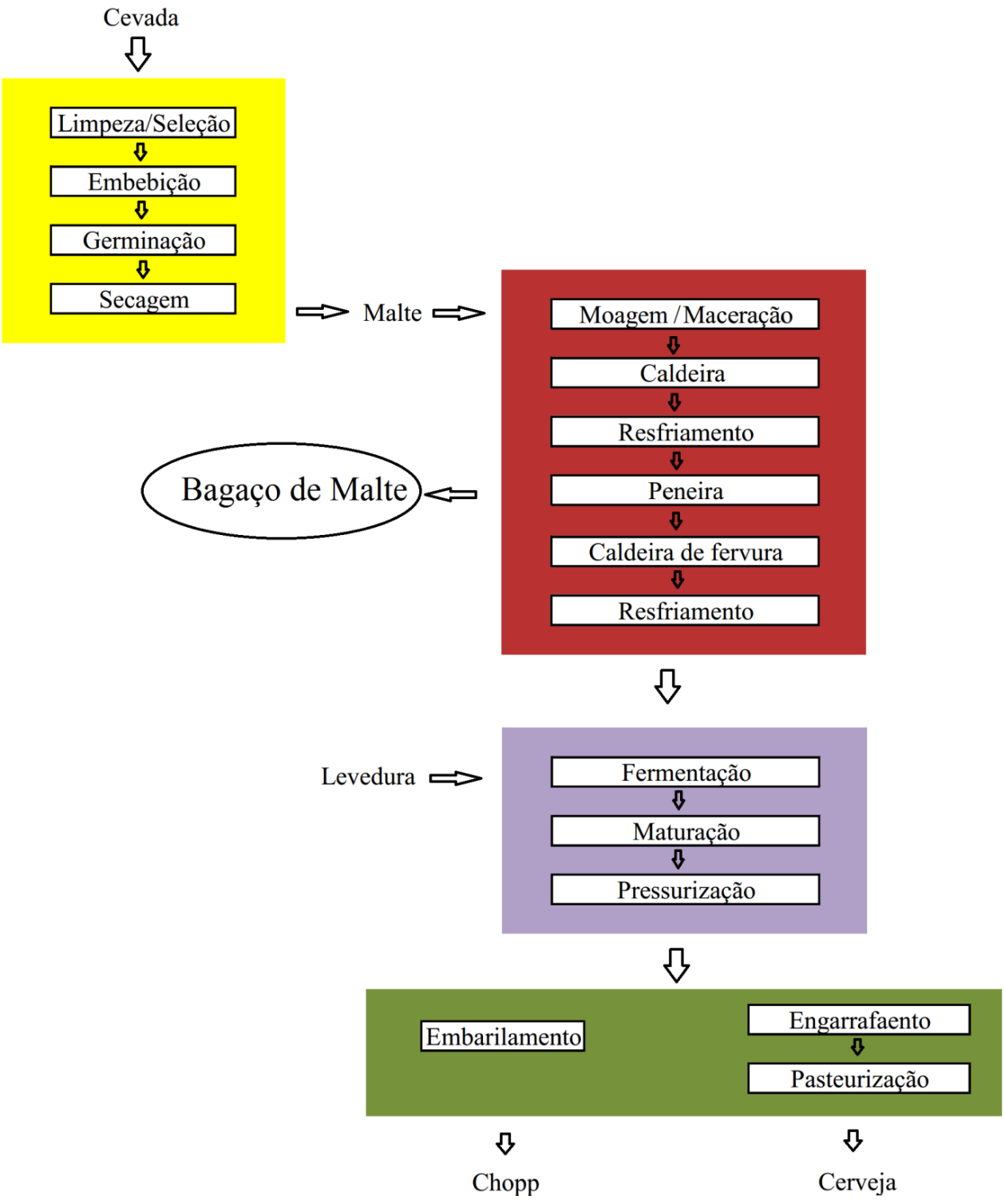


Figura 2.4.: Fluxograma do processo genérico de produção de cerveja. (NEVES et al., 2011)

Nas cervejarias o malte de cevada é moído e submetido à mosturação, ou seja, adição de água e aquecimento a vários níveis de temperatura (de 37 a 78 °C). Esse processo tem como objetivo promover a hidrólise enzimática principalmente do amido que compõe o malte, o qual é convertido em açúcar fermentável (maltose e maltotriose) e não fermentável (dextrinas). A fração líquida, denominada mosto, é separada por filtração para posterior utilização na produção da cerveja. A fração sólida é o bagaço de malte da cevada (TSCHOPE, 2001).

A composição química do bagaço de malte pode variar de acordo com o tipo de cevada utilizada, o tempo de colheita e as condições de malteação/mosturação a que foi submetida. A Tabela 2.2 mostra a variação na composição do bagaço de malte.

Segundo Reinold et al. (1997) o bagaço de malte representa aproximadamente 85% do total de subprodutos gerados pela indústria cervejeira, e sua geração é da ordem de 20kg/hL de cerveja produzida. A produção de cerveja no Brasil no ano de 2011 foi de 10,34 bilhões de litros, então é possível estimar que foram produzidas apenas no Brasil 2,07 milhões de toneladas de bagaço de malte nesse ano. Enquanto na China a produção de cerveja totalizou 35 bilhões de litros, correspondendo a 7 milhões toneladas de bagaço de malte produzidos em 1 ano. (NEVES, 2011).

A maior cervejaria do Brasil, AMBEV, reaproveita 98,2% dos subprodutos gerados no processo de fabricação de cerveja, o que em 2010, correspondeu à receita extra de R$80,3 milhões com venda do subproduto. O bagaço de malte gerado é destinado à alimentação do gado, por ser rico em proteínas e fibras, e reduzir o custo da ração. Essa aplicação exige monitoramento os níveis de umidade e proteína durante a armazenagem, além do controle microbiológicas do material.

Tabela 2.2. Variação da composição do bagaço de malte.

Componentes	Kanuauchi et al. (2001)	Santos et al. (2003)	Cavalheiro et al. (2004)	Mussatto e Roberto (2005)	Celus et al. (2006)	Xirus et al. (2008)	Jay et al. (2008)	Robertson et al. (2010)	
								Ale	Lager
Proteínas	24	31	24,6	15,2	26,7	14,2	15-17	10-18	20-24
20,24	10,6	3-6	n.d.	n.d.	n.d.	13	6-8	n.d.	n.d.
Amido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	2,7	10-12	7-13	2-8
Cinzas	2,4	4	1,2	4,6	3,3	3,3	n.d	n.d.	n.d.
Celulose	25,4	n.d	21,9	16,8	0,3	12	31-33	13-21	
Arabinoxilana	21,8	n.d.	29,6	28,4	22,5	40		21-27	22-29
Taxa A/X			0,44			0,5		0,45	0,5
Lignina	11,9	16	21,7	27,8	n.d.	11,5	20-22	12-16	13-17
Fenólicos	n.d.	1,7-2	n.d.	n.d.	n.d.	2	1-1,5	0,7-1	0,7-0,9

Adaptado de Xirus et al. (2012)
Valores expressos em gramas por 100 gramas de material seco (% g/g)
n.d. refere-se a valores não determinados

Segundo Aliyu et al. (2011) a umidade torna o bagaço de malte muito susceptível ao crescimento de micro-organismos, acarretando a degradação em curto período de tempo, 7 a 10 dias. Técnicas de processamento do bagaço de malte visando a diminuição da contaminação microbiológica são desenvolvidas para aplicação em ração animal, a exemplo da patente de número C10000814-1 (2001). O processo proposto envolve quatro etapas: a) hidrólise do bagaço de malte; b) pré secagem a vácuo do bagaço de malte hidrolisado na etapa anterior; c) secagem contínua do bagaço de malte hidrolisado pré-seco; e d) peletização. O produto após o processo de secagem (umidade de aproximadamente 10%) apresenta um índice de proteínas solúveis situado em até 80%, podendo por este motivo ser utilizado tanto na nutrição animal, como também como suplemento alimentar na nutrição humana.

De acordo com Vural e Burc (2008) a utilização do bagaço de malte na alimentação humana exige o processamento sob a forma de farinha devido a sua granulometria grosseira. Normalmente ele é adicionado a outras farinhas na máxima proporção de 15%. A limitação quanto à concentração na mistura deve-se a alteração de propriedades físicas do produto final, como textura, cor, sabor e aroma, e a liberação de coloração marrom clara quando utilizado em maiores proporções.

O bagaço de malte também tem sido utilizado em processos de bioconversão para obtenção de produtos de interesse econômico (MUSSATTO et al., 2007; MUSSATO; ROBERTO, 2005;GARCIA, 2012).

Segundo Mussato e Roberto (2005) o bagaço de malte tem grande potencial para aplicação biotecnológica, pois o hidrolisado hemicelulósico obtido é rico em açúcares fermentáveis, e apresenta características nutricionais favoráveis para fermentação. Os autores estudaram o uso de hidrolisado de bagaço de malte rico em xilose na produção de xilitol utilizando a levedura Candida guilliermondii. O bagaço de malte foi pré-tratado com ácido diluído, e nesta etapa 92,7% da hemicelulose foi solubilizada no hidrolisado, e foram obtidos bons parâmetros fermentativos, (fator de conversão de substrato em produto de 0,7 g/g), mesmo sem a suplementação nutricional do hidrolisado.

3. Objetivos

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte, antecedendo a hidrólise ácida, na solubilização de acetato e produtos de degradação da lignina, de forma a diminuir a concentração destes compostos no hidrolisado hemicelulósico. E ainda tem o objetivo de avaliar o efeito deste tratamento na bioconversão dos hidrolisados hemicelulósico e celulósico para produção de etanol.

3.1 Objetivos Específicos

Para atingir os objetivos gerais do projeto, as seguintes etapas deverão ser cumpridas:

- Tratar o bagaço de malte com solução diluída de hidróxido de sódio em diferentes concentrações.
- Otimizar as condições de temperatura e concentração de NaOH do tratamento alcalino do bagaço de malte, para obtenção de hidrolisado hemicelulósico com maior teor de xilose, menor teor de ácido acético, e hidrolisado celulósico com maior teor de glicose.
- Fermentar o hidrolisado hemicelulósico com a levedura *Pichia stipitis* para produção de etanol, visando avaliar o efeito do tratamento alcalino na fermentabilidade desta fração;
- Realizar ensaios de sacarificação e fermentação do hidrolisado celulósico empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* para produção de etanol, visando avaliar o efeito do tratamento alcalino na fermentabilidade desta fração;

4. Materiais e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, da Universidade de São Paulo. A Figura 4.1 é uma representação esquemática do trabalho proposto.

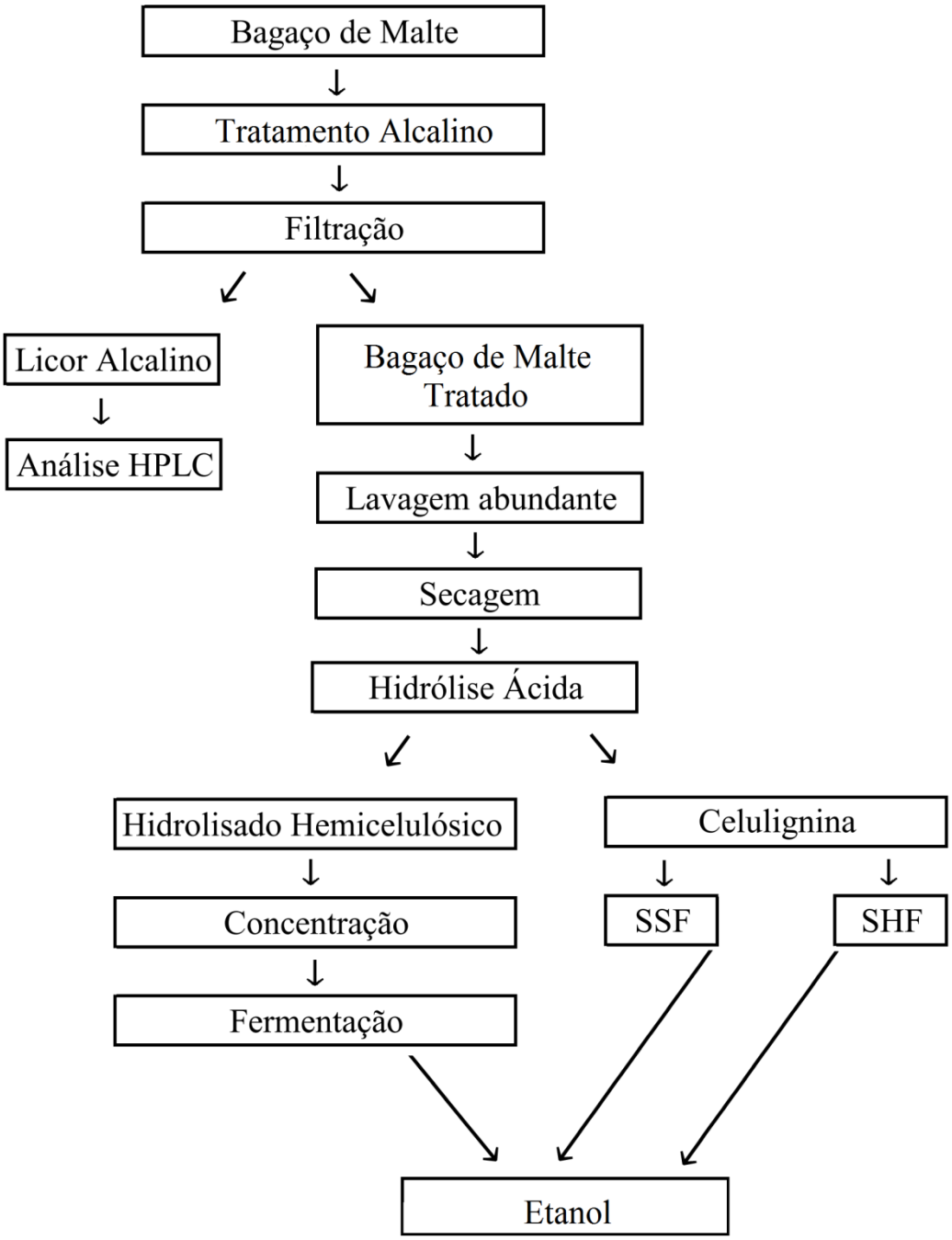


Figura 4.1. Representação esquemática do trabalho proposto para aproveitamento da frações do bagaço de malte para produção de etanol.

4.1 Obtenção da matéria prima

O bagaço de malte utilizado neste trabalho foi fornecido pela Microcervejaria do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena-USP. Tão logo terminada a mosturação e filtração o bagaço de malte foi lavado com água em abundância para remoção de resíduos do mosto, como açúcares. O bagaço de malte foi seco naturalmente ao sol até apresentar teor de umidade de aproximadamente 10%, e em seguida foi armazenado em temperatura ambiente livre de umidade.

4.2 Efeito do tratamento alcalino na composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte

O presente trabalho propôs um tratamento alcalino do bagaço de malte que fosse capaz de solubilizar compostos como acetato, fenólicos e furanos no licor alcalino e assim, diminuir a concentração destes do hidrolisado hemicelulósico. Para tanto foi realizada a etapa de estudo do efeito do tratamento alcalino na composição do licor alcalino, e consequentemente na composição do hidrolisado hemicelulósico obtido. O esquema da Figura 4.2 ilustra de forma geral o procedimento empregado para a realização do tratamento alcalino e pré-tratamento com ácido diluído, do bagaço de malte.

Para a realização do tratamento alcalino, o bagaço de malte com umidade de 10% foi tratado com hidróxido de sódio nas concentrações de 0,25%, 2%, 1% ou 0,5%. As soluções foram previamente ambientadas em banho-maria na temperatura do ensaio, 60 °C. Os ensaios foram realizados em fraco Erlenmeyer de 50 mL, com 1±0,001g de massa seca de bagaço de malte, 10 mL de solução de hidróxido de sódio em diferentes concentrações, e mantidos em banho-maria por diferentes intervalos de tempo (0, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos). Ao final da reação a fração sólida foi separada da fração líquida por filtração e em seguida lavados com água em abundancia, até que o pH do filtrado atinja a neutralidade, o licor alcalino obtido foi congelado e mantido a -20 °C para posterior análise de açúcares (glicose, xilose, arabinose) e ácido acético.

A fração sólida obtida do tratamento alcalino foi seca ao sol e ao atingir a umidade de 10% foi armazenada para posterior hidrólise com ácido diluído. A hidrólise ácida empregou ácido sulfúrico como agente químico, segundo as condições adaptadas de Mussatto e Roberto, (2007). A hidrólise foi realizada em

autoclave a 120 °C por 27 minutos, o ácido na concentração de 120 mg H_2SO_4/g de matéria seca de bagaço de malte. Os ensaios foram realizados em fraco Erlenmeyer de 50 mL, com 0,7±0,001g de massa seca de bagaço de malte, 7 mL de solução de ácido sulfúrico. O hidrolisado hemicelulósico obtido foi analisado quanto à composição de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, compostos fenólicos e compostos furanos.

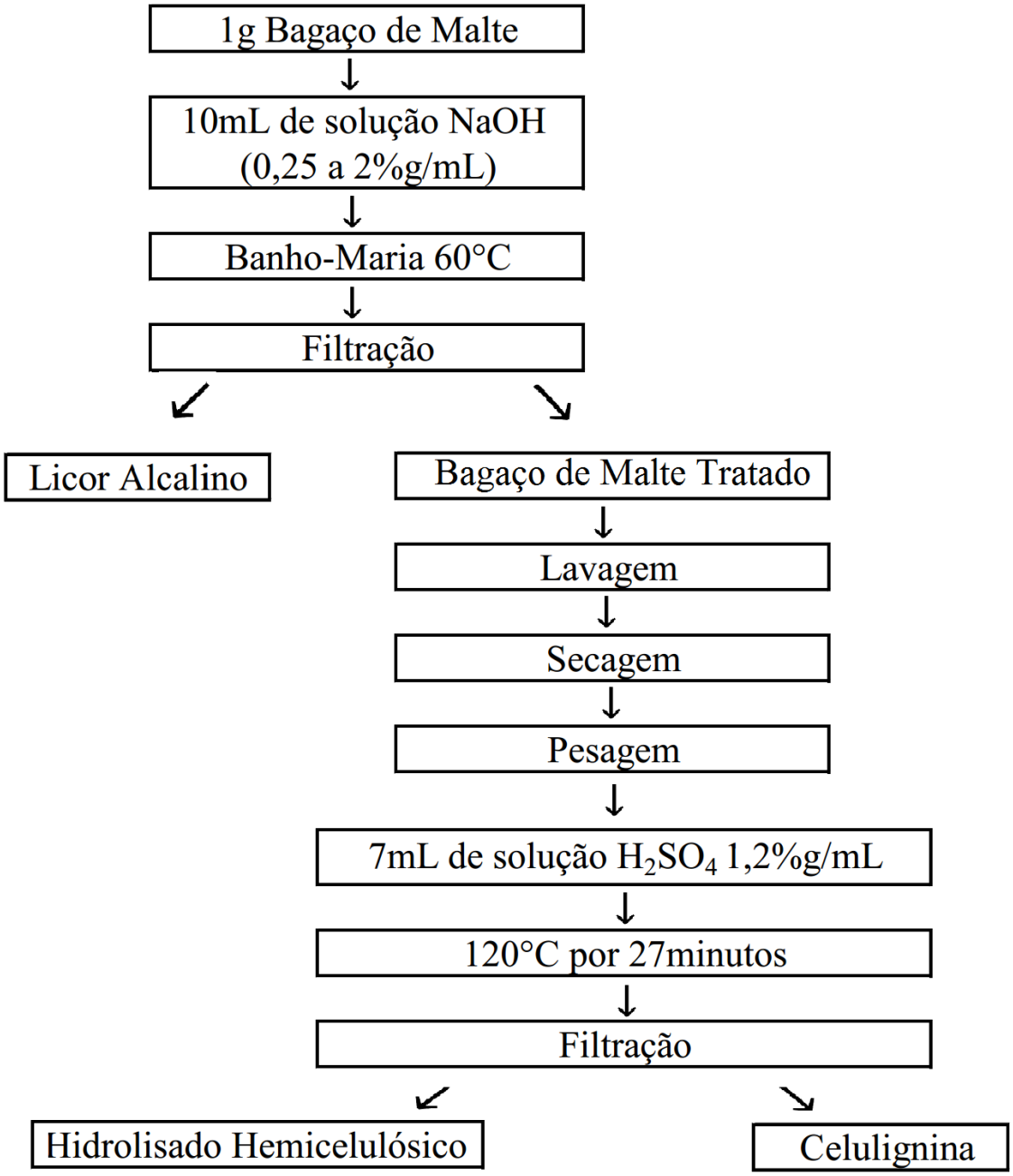


Figura 4.2. Esquema das etapas do tratamento alcalino e hidrólise ácida, para obtenção do licor hemicelulósico e da celulignina.

4.3. Otimização das condições do tratamento alcalino sobre a composição dos hidrolisados hemicelulósico e celulósico do bagaço de malte

Para estabelecer as condições de tratamento alcalino que permitam redução na concentração de ácido acético e que favoreça a solubilização de xilose no hidrolisado hemicelulósico e de glicose no hidrolisado celulósico, é necessário inicialmente identificar as variáveis de maior influência sobre tais respostas. Com este objetivo, os efeitos principais das variáveis temperatura e concentração de hidróxido de sódio, assim como seus efeitos quadráticos e de interação foram analisados através de ferramentas estatísticas.

Para tanto foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^2 em estrela com repetição do ponto central, conforme matriz apresentada na Tabela 4.1. Optou-se por um planejamento em estrela uma vez que esse tipo de planejamento é mais abrangente do que o de face centrada, podendo ser mais eficiente na procura da resposta ótima. Os níveis das variáveis utilizadas nos ensaios são também apresentados na mesma tabela, e as variáveis foram codificadas de acordo com a Equação 4.1.

$$V_C = \frac{(V_R - V_O)}{\Delta V_R} \qquad (4.1)$$

Onde: V_c é valor codificado da variável independente

V_R é valor real da variável independente

V_o é valor real da variável independente no ponto central

ΔV_R valor do passo, isto é $(V_{Rmáx}-V_{Rmin})/2$

Tabela 4.1. Matriz do planejamento 2^2 completo, com triplicata no ponto central, para avaliação do efeito do tratamento alcalino na concentração de ácido acético e xilose no hidrolisado hemicelulósico, e liberação de glicose na sacarificação da celulignina.

Ensaio	Nível das variáveis	
	Temperatura	Concentração de NaOH
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1,42	+1
5	+1,42	0
6	0	0
7	0	-1.42
8	0	+1.42
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 4.2. Níveis e valores dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central

Fatores	Níveis				
	-1,42	-1	0	+1	+1,42
Temp. (°C)	31,6	40	60	80	88,4
NaOH (%)	0,15	0,25	0,5	0,75	0,86

Para a realização do tratamento alcalino nos níveis avaliados, o bagaço de malte com umidade de 10% foi tratado nas condições de hidróxido de sódio e temperatura, descritas na Tabela 4.2. As soluções foram previamente ambientadas em banho-maria nas diferentes temperaturas (31,6 a 88,4°C). Os ensaios foram realizados em fraco Erlenmeyer de 50 mL, com 1±0,001g de massa seca de bagaço de malte, 10 mL de solução de hidróxido de sódio nas diferentes concentrações (0,15 a 0,86%), e mantidos em banho-maria por 20 minutos. Ao final da reação a fração sólida foi separada da fração líquida por filtração e em seguida lavados com água em abundancia, até que o pH do filtrado atinja a neutralidade, o licor alcalino obtido foi congelado e mantido a -20 °C para posterior análise de açúcares (glicose, xilose, arabinose) e ácido acético. A fração

sólida obtida do tratamento alcalino foi seca ao sol e ao atingir a umidade de 10% foi armazenada para posterior hidrólise com ácido diluído. A hidrólise ácida empregou ácido sulfúrico, segundo as condições adaptadas de Mussatto e Roberto, (2007), como descrito no item 4.2.

A sacarificação enzimática da fração de celulignina do bagaço de malte tratado foi realizada utilizando como fontes de enzimas as preparações comerciais Cellubrix (fonte de celulase) e Novozyme 188 (fonte de β-glicosidase), ambas da empresa Novozymes Corporation (Dinamarca). O ensaio de hidrólise enzimática foi realizado em frasco Erlenmeyer de 25 mL contendo 6,25 mL de mistura enzima-tampão (citrato de sódio 50mM pH 4,8), onde foram adicionados 0,5g de celulignina (peso seco). Para cada grama de celulignina foram adicionados 25FPU de Cellubrix e 25UI de Novozyme 188. Após a adição das enzimas previamente diluídas em tampão os frascos foram fechados com papel filme e incubados em agitador rotatório (Tcnal TE-420) a 100 rpm, 45 °C, por 12 horas. O hidrolisado celulósico obtido foi analisado quanto à composição de glicose.

Para análise de regressão dos dados obtidos foi utilizado o programa “Design-expert” (versão 5.0, Stat-Ease Inc., Minneapoli, USA) e/ou STATISTICA (versão 5.0). A significância dos coeficientes de regressão foi testada pelo teste t de Student. Os níveis de significância, a notação utilizada para denotar cada nível, bem como os valores de t_{tab} para os graus de liberdade do estudo (5 graus de liberdade), encontram-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Valores de t_{tab}, nível de probabilidade e notação utilizada para cada nível de significância, no planejamento efetuado.

Nível de significância	Valor de t tab	P	Notação
90%	2,015	p<0,10	*
95%	2,571	p<0,05	**
99%	4,032	p<0,01	***

Os dados obtidos experimentalmente foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem, expresso pela Equação 4.2 :

$$y_i = b_o + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 \quad (4.2)$$

Onde: y_i representa a variável resposta

b_o o coeficiente de intercessão

b_1 e b_2 os coeficientes lineares

b_{11} e b_{22} os coeficientes quadráticos

e x_1 e x_2 representam as variáveis estudadas

A qualidade do ajuste da equação polinomial do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2, e a sua significância estatística foi determinada pelo teste t de Fisher. O valor de F experimental foi comparado ao valor F tabelado, $F_{(\alpha,\ p-1,\ n-p)}$ onde α é o risco escolhido, definido neste estudo como 0,05; n é o número total de ensaios e p é o número de termos do modelo. Este teste, utilizado para determinar a adequação do modelo aos dados é feito pela comparação de duas variáveis: a variância do erro puro (S_{ep}^2) e a falta de ajuste (S_{fa}^2). Se o valor F calculado ($F=S_{ep}^2/S_{fa}^2$) for superior ao F tabelado, então a falta de ajuste indica que o modelo proposto não é adequado para descrever a resposta.

As superfícies de resposta foram plotadas utilizando-se o programa STATISTICA versão 5.0 e/ou “Design-expert” versão 5.0. As concentrações ótimas das variáveis foram obtidas pela análise dos gráficos de curva de nível das respostas e pela otimização através do método numérico do programa “Design-expert”, baseado no critério de conveniência descrito por Myers e Monthomery, conforme consta do manual do programa.

Para obtenção de maior volume de hidrolisado hemicelulósico e celulignina, o bagaço de malte foi tratado nas condições otimizadas. Para tanto, 1L de solução de hidróxido de sódio (0,63% g/mL), previamente ambientadas na temperatura do ensaio (67,5 °C), foi acondicionado a fracos Erlenmeyer de 2L com 100±0,01g de massa seca (umidade de 10%). Os frascos foram mantidos em banho-maria por 20 minutos e ao final da reação a fração sólida foi separada da fração líquida por filtração e submetido à lavagem em abundancia com água, até

que o pH do filtrado atinja a neutralidade. A fração sólida foi seca ao sol e ao atingir a umidade de 10% e armazenada para posterior hidrólise com ácido diluído.

A hidrólise com ácido diluído foi realizada empregando ácido sulfúrico como agente químico, segundo as condições adaptadas de Mussatto e Roberto, (2007). Para tanto, frascos Erlenmeyer de 2L com 100±0,01g de massa seca de bagaço de malte obtido do tratamento alcalino (umidade de 10%) e 1L de solução de ácido sulfúrico 1,2% foram submetidos a 120 °C por 50 minutos. A fração líquida de hidrolisado hemicelulósico foi recuperado por filtração e a fração sólida de celulignina foi lavada com água em abundancia até o pH do filtrado ser neutro.

O hidrolisado hemicelulósico controle foi obtido com procedimento semelhante de hidrólise ácida descrita, utilizando o bagaço de malte não submetido a tratamento alcalino.

Posteriormente, o hidrolisado hemicelulósico foi submetido ao processo de concentração à vácuo a 70 °C± 5 °C, visando aumentar o teor de xilose. Este processo foi realizado em concentrador (Precision Scientific – USA) com 5 litros de capacidade nominal operado de forma descontínua.

4.7 Efeito do tratamento alcalino sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte

A presente etapa visou avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de malte tratado com hidróxido de sódio nas condições otimizadas no item 4.6, ou seja, tratamento alcalino a 67,5 °C e 0,63% NaOH.

A levedura *Pichia stipitis* Y-7124 foi fornecida pela USDA, Peoria, Illlinois. A cultura foi mantida repicada em ágar YMDP, composto de extrato de malte (3 g/L), extrato de levedura (3 g/L), peptona (5 g/L), glicose (10 g/L), ágar (20 g/L), e foi conservada por transferências periódicas e mantida em geladeira a 4 °C.

O meio a base de hidrolisado hemicelulósico foi preparado utilizando o hidrolisado concentrado conforme descrito no item 4.4. O hidrolisado teve seu pH elevado para 5,5 com NaOH (10N) e em seguida centrifugado a 1200 x g por 20 minutos para remoção dos sólidos. Para obter a concentração de 30 g/L e 70 g/L de xilose, o hidrolisado hemicelulósico foi diluído com água destilada esterilizada, e em seguida suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura. (GARCIA, 2012)

Para o preparo do inóculo alçadas de *Pichia stipitis* recém repicada em meio (YMPD) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Após a homogeneização da suspensão, alíquotas de 1 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio à base do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, com 30 g/L de xilose. Os frascos Erlenmeyer foram inoculados e incubados em agitador rotatório à 30 °C, 200 rpm por um período de 24 horas. Decorrido este tempo, as células foram separadas por centrifugação a 1100xg por 25 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em água destilada esterilizada a fim de fazer uma lavagem das mesmas. A suspensão foi novamente centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água destilada esterilizada de forma que se obtenha uma suspensão celular densa. Com base na concentração celular desta suspensão, foi calculado o volume necessário para fornecer uma concentração celular inicial de 1 g/L no meio de fermentação.

Os ensaios de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte foram conduzidos sob as condições descritas por Garcia (2012). Foi utilizado como meio de fermentação o hidrolisado hemicelulósico contendo aproximadamente 70 g/L de xilose, com pH ajustado para 5,5 com NaOH (10N), e concentração inicial de inóculo de 1 g/L e 3 g/L. Os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Tecnal TE-420), à temperatura de 30 °C, sob agitação de 200 rpm. Nos ensaios fermentativos foram retiradas amostras periodicamente para acompanhamento do crescimento celular, consumo de açúcares e ácido acético e produção de etanol. Os ensaios foram realizados em triplicata, e o valor médio foi utilizado para calcular os parâmetros do processo.

4.8 Efeito do tratamento alcalino sobre a sacarificação e fermentação da celulignina do bagaço de malte

A presente etapa visou avaliar o efeito do tratamento alcalino na sacarificação e fermentação na fração de celulignina obtida do bagaço de malte tratado com hidróxido de sódio nas condições otimizadas no item 4.6, ou seja, tratamento alcalino a 67,5 °C e 0,63%NaOH.

Foram realizados experimentos de sacarificação e fermentação da celulignina sob duas estratégias: sacarificação e fermentação em separado (SHF) e sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF), segundo Castro (2012). A Figura 4.3 mostra a representação esquemática das estratégias utilizadas.

Na etapa de sacarificação enzimática foram utilizadas como fontes de enzimas as preparações comerciais Cellubrix (fonte de celulase) e Novozyme 188 (fonte de β-glicosidase), ambas da empresa Novozymes Corporation (Dinamarca). O ensaio de hidrólise enzimática foi realizado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de mistura enzima-tampão (citrato de sódio 50mM pH 4,8), onde foram adicionados 4g de celulignina (peso seco). Para cada grama de celulignina foram adicionados 25FPU de Cellubrix e 25UI de Novozyme 188. Após a adição das enzimas previamente diluídas em tampão os frascos foram fechados com papel filme e incubados em agitador rotatório (Tcnal TE-420) a 100 rpm, 45 °C por 12 horas.

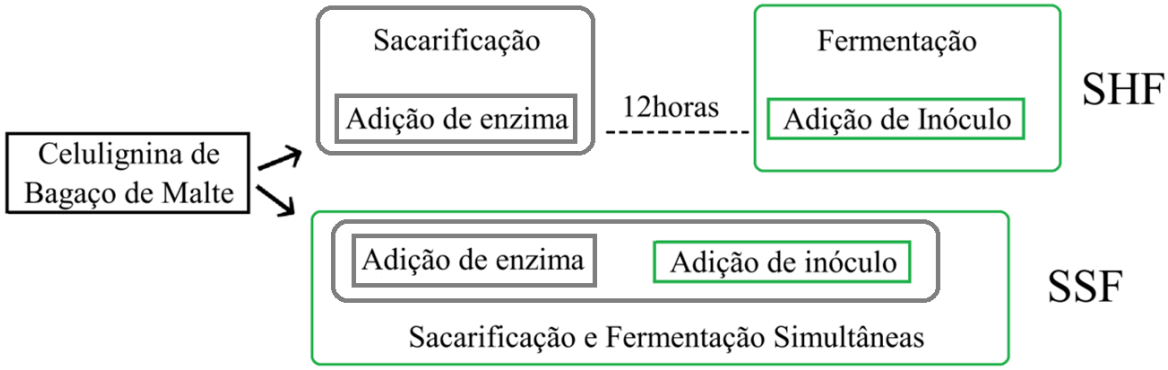


Figura 4.3. Representação esquemática dos ensaios da sacarificação e fermentação (Adaptado de CASTRO, 2012).

Para realização da etapa de fermentação do hidrolisado da celulignina foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6068, obtida da coleção de culturas ARS/USDA, Peoria, IL, Estados Unidos. A cultura foi mantida em tubo de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e conservada em geladeira a 4 °C. O meio utilizado para crescimento do inóculo está descrito na Tabela 4.4 (CASTRO 2012). Soluções concentradas de cada componente foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121 °C por 20 minutos, exceto a solução de glicose que foi autoclavada a 112 °C por 15 minutos. As soluções foram

misturadas assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito (Tabela 4.4). Os frascos foram incubados à 42 °C em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 200 rpm por 16 horas. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação a 4000 × g por 25 minutos e ressuspendidas diretamente no meio de fermentação.

Tabela 4.4. Composição do meio em tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	30
$(NH_4)_2SO_4$	2,0
KH_2PO_4	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,3
Extrato de levedura	5,0

Os ensaios de fermentação da fração celulignina nas diferentes configurações, SSF e SHF, foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de volume de reação em agitação rotatória de 100 rpm e temperatura de 45 °C, contendo 8% (m/v) de substrato. O meio de fermentação foi composto por 4g de celulignina (massa seca), 2,5 mL de tampão citrato de sódio 1M (concentração final 50 mM, pH 4,8), solução concentrada de sais (KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4.7H_20$ e extrato de levedura) a fim de se obter a concentração destes nutrientes descrita na Tabela 4.4, e o volume foi completado para um total de 50 mL.

Para realização da sacarificação e fermentação em separado (SHF), o coquetel enzimático foi adicionado a massa seca de celulignina de bagaço de malte, de acordo com a carga de enzima determinada anteriormente. Passadas 12 horas da sacarificação, a levedura K. marxianus foi adicionada ao meio na concentração inicial do inóculo de 1 g/L. No momento da adição do inóculo, a solução concentrada de sais também foi adicionada ao meio de fermentação.

Durante o processo fermentativo foram retiradas amostras para determinação da concentração de glicose e etanol.

Para realização da sacarificação e fermentação simultâneas, o coquetel enzimático na carga determinada anteriormente foi adicionado juntamente com a solução concentrada de sais e o inóculo (também na concentração inicial de 1g/L). Durante o processo foram retiradas amostras para determinação da concentração de glicose e etanol.

4.9 Determinação dos parâmetros fermentativos e enzimáticos

Para o processo fermentativo foram avaliados os parâmetros:

- O fator de conversão de substrato em células, $Y_{X/S}$ (g/g), foi calculado pelo coeficiente angular da equação linear $\Delta X = a + Y_{X/S}\ x(-\Delta S)$, quando três ou mais pontos experimentais forem obtidos, ou pela razão $\Delta P/\Delta S$ quando apenas os pontos iniciais e finais forem conhecido, em que X corresponde à concentração celular e S a concentração de glicose/xilose, ambos em g/L.
- O fator de conversão de substrato em etanol, $Y_{P/S}$ (g/g), foi calculado pelo coeficiente angular da equação linear $\Delta P = a + Y_{P/S}\ x(-\Delta S)$, quando três ou mais pontos experimentais forem obtidos, ou pela razão $\Delta P/\Delta S$ quando apenas os pontos iniciais e finais forem conhecido, em que P é a concentração de etanol e S a concentração de glicose/xilose, ambos em g/L.
- O fator de conversão de célula em etanol, $Y_{P/X}$ (g/g), foi estimado pelo quociente entre $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$.
- A eficiência de conversão de etanol a partir de açúcar η (%), foi calculada pela relação entre os valores obtidos de $Y_{P/S}$ e o valor máximo teórico para esse parâmetro (0,51 g/g)
- A produtividade volumétrica de etanol (Q_P, g/L.h) foi calculada pela equação 4.3. Para os experimentos de sacarificação e fermentação da celulignina, além do cálculo de Q_P, relativo apenas ao tempo de fermentação, também foi realizado o cálculo da produtividade volumétrica total em etanol (Q_{PT}, g/L.h) em que foi considerado o tempo de sacarificação e o tempo de fermentação, dados pela equação 4.4.

$$Q_P = \frac{\Delta P}{t} \quad (4.3)$$

$$Q_{PT} = \frac{\Delta P}{t_{total}} \quad (4.4)$$

Onde: ΔP é a variação da concentração de etanol (g/L), t é tempo (h); e t total é o tempo total do processo, dado pela soma de sacarificação e de fermentação (h)

A concentração de glicose potencial que poderia ser alcançada no meio de fermentação contendo celulignina foi estimada pela equação 4.5, considerando toda a glicose presente na celulignina. O rendimento de hidrólise enzimática ($R_{Hidrólise}$, %) foi calculado pela relação entre a concentração de glicose obtida e a concentração potencial de glicose. (equação 4.6).

$$C_{GliPotencial} = \frac{(C_{Celulignina} \times \text{teor de celulose} \times 0{,}1)}{F_c} \quad (4.5)$$

$$R_{Hidrólise}\,(\%) = \left(\frac{C_{Gli}}{C_{GliPotencial}}\right) \times 100 \quad (4.6)$$

Onde: $C_{GliPotencial}$ =Concentração de glicose potencial (g/L); $C_{celulignina}$ = Consistência da celulignina (% m/v); teor de celulose (g/g); F_c = fator de conversão de celulose em glicose (0,9); C_{gli} = concentração de glicose obtida (g/L)

Para os experimentos de sacarificação e fermentação, também foram definidos outros parâmetros. O fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{P/S}$) foi calculado pela equação 4.7, considerando a glicose potencial presente na celulignina. A eficiência de fermentação (η') foi estimada pela relação entre $Y'_{P/S}$ e o fator teórico de conversão de glicose em etanol (0,51), calculada pela equação 4.8.

$$Y'_{P/S} = \frac{C_{Etanol}}{C_{GliPotencial}} \quad (4.7)$$

$$\eta' = \frac{Y'_{P/S}}{0{,}51} \times 100 \quad (4.8)$$

Onde: C_{Etanol} = Concentração de etanol obtida (g/L); $C_{GliPotencial}$ = Concentração de glicose potencial (g/L)

4.10 Métodos analíticos

4.10.1 Determinação do teor de umidade do material lignocelulósico

O teor de umidade do bagaço de malte e da celulignina foram determinados em balança analítica provida de aquecimento por infravermelho (IV2000-GEHAKA). Aproximadamente 1 g da amostra foi colocada na balança, a qual foi aquecida pela ação dos raios infravermelhos até obter peso constante. A umidade do material foi então determinada pela diferença entre a massa obtida antes e após o aquecimento, de acordo com a Equação 4.9

$$\text{Umidade } (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \qquad (4.9)$$

onde: m_i = massa inicial; m_f =massa final após aquecimento

4.10.2 Determinação da concentração celular das leveduras *Pichia stipitis* e Kluveromyces marxianus

A concentração celular das leveduras foi determinada pela medida da densidade óptica a 600 nm (turbidimetria) em espectrofotômetro (Hitachi U-1800) utilizando água como branco. Para isso, as leveduras *Pichia stipitis* e Kluveromyces marxianus foram cultivada em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos respectivos meios descritos na Tabela 4.2 a 200 rpm e temperatura de 35 e 42 °C respectivamente, até atingir fase estacionária de desenvolvimento. Todo o volume do meio contendo as células foi centrifugado a 4000×g por 10 minutos, para recuperação da massa celular que, posteriormente, foi lavada 2 vezes com água destilada. As células foram ressuspendidas em 15 mL de água destilada, formando uma suspensão celular densa. Alíquotas de 3 mL desta suspensão celular foram colocadas em cadinhos previamente tarados e incubados em estufa a 105 °C até peso constante. Alíquotas da mesma suspensão celular foram diluídas adequadamente para que uma faixa de leitura entre 0,1 a 0,8 unidades de DO_{600} ser alcançada. A concentração celular foi determinada utilizando uma equação obtida por regressão linear dos dados entre peso seco e absorbância a 600 nm.

Tabela 4.5. Composição do meio de crescimento das leveduras *Pichia stipitis* e Kluveromyces marxianus.

Pichia stipitis		**Kluveromyces marxianus**	
Componente	Concentração (g/L)	Componente	Concentração (g/L)
Xilose	50	Glicose	50
KH_2PO_4	19,0	$(NH_4)_2SO_4$	2,0
$(NH_4)_2HPO_4$	3,0	KH_2PO_4	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	1,0	$MgSO_4.7H_2O$	0,3
Extrato de levedura	3,0	Extrato de levedura	5,0

4.10.3 Determinação dos teores dos açúcares, ácido acético e etanol

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um equipamento AGUILENT TECHNOLOGIES 1260 INFINITY nas seguintes condições: detector de índice de refração, coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura de 45ºC, ácido sulfúrico 0,01 N como eluente em um fluxo de 0,6 mL/min e volume de amostra a ser injetada foi de 20µl. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as mostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em filtros Sep Pak C18 (Millipore). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas com soluções padrão de cada composto.

4.10.4 Determinação dos compostos fenólicos

A concentração total dos compostos fenólicos totais foi quantificada colorimetricamente adaptada do método de Folin-Ciocalteau (SINGLETON et al.,1999) usando ácido gálico como padrão de calibração. As amostras foram centrifugadas a 3000×g por 10 minutos para remover os sólidos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45µm e diluído com água deionizada. Foram adicionados 3,0 mL da amostra e 0,2 mL do reagente de Folin em tubos de ensaio e, após agitação em vórtice, a mistura foi mantida em repouso por 5 minutos. Após este tempo, foi adicionado 0,8 mL de uma solução de $(Na)_2CO_3$ na concentração de 150 g/L. Após agitação em vórtice, a mistura foi mantida em

repouso na ausência de luz em temperatura ambiente por 30 minutos. O branco foi 3,0 mL de água deionizada em substituição à amostra, o qual foi submetido às mesmas etapas da amostra. A leitura da absorvância da amostra foi feita a 760 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-1800).

4.10.6 Determinação da atividade enzimática

A atividade da Cellubrix foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Ghrose (1987) e expressa em unidades de papel de filtro (FPU). Nesta análise, 1,5 mL da solução de enzima diluída em tampão citrato de sódio 0,05M (pH 4,8) é adicionado em tubo de ensaio contendo uma tira de 50mg de papel de filtro Whatman n°1. Esta mistura foi incubada a 45 °C durante 1horas. Os açúcares redutores liberados do papel de filtro pela ação do extrato celulolítico foram estimados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) segundo Miller (1959). À solução incubada foram adicionados 3 mL de DNS e esta foi mantida durante 5 minutos em banho maria a 100 °C. Após o resfriamento foi feita a leitura da absorbância a 540nm em especrofotômetro (Hitachi U-1800). Os açúcares redutores foram expressos em µmoles de glicose liberados, com base em uma curva de calibração feita entre absorbância e concentração de glicose. Uma unidade de papel de filtro é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose a partir de papel de filtro Whatman n°1, em 1 minuto, na temperatura de hidrólise.

Para a determinação da atividade de β-glicosidase foi utilizada a metodologia proposta por Wood Bath (1988), na qual se utiliza uma solução de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (5mM) como substrato. Tubos de ensaio com 1 mL de substrato e 1,8 mL de tampão citrato de sódio 50mM (pH 4,8) foram pré-incubados à 45 °C. Após esse tempo foram adicionados 0,2 mL de diferentes diluições enzimáticas. Para obter a cinética enzimática, a produção de p-nitrofenol foi monitorada nos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Nessas mesmas condições experimentais também foram conduzidos os brancos das diluições enzimáticas e do substrato. As reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 4 mL de tampão glicina (0,4M, pH 10,8) e a leitura das absorbâncias foram feitas em espectrofotômero à 430nm. A concentração de p-nitrofenol liberada no meio reacional foi determinada contra uma curva padrão precisamente construída. Uma

unidade de atividade enzimática é definida como 1µmol de p-nitrofenol formado por minutos (UI).

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a soro albumina bovina como padrão.

4.10.7 Caracterização química do Bagaço de Malte

O bagaço de malte foi caracterizado para determinação dos teores de celulose, hemicelulose, com base na metodologia descrita por Browning (1967) e Rocha (2000). Aproximadamente 2 g de do material foi transferido para um béquer de 50 mL contendo 10 mL de ácido sulfúrico (72% p/p). A reação foi mantida em banho termostatizado, a 45 °C durante 7 min., sob agitação constante com bastão de vidro. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada. Em seguida foi feita a transferência quantitativa do conteúdo do béquer para um Erlenmeyer de 500 mL, no qual o volume total de água foi completado para 275 mL. O frasco foi fechado com papel alumínio e autoclavado à 1atm, 121 °C durante 45 min., para promover a completa hidrólise dos oligômeros restantes.

Após a autoclavagem, o frasco foi resfriado à temperatura ambiente para a separação das frações sólida e líquida por meio de filtração em papel de filtro previamente tarado. O hidrolisado foi recolhido e transferido para balão volumétrico de 500 mL, juntamente com toda a água destilada utilizada para lavagem do sólido retido no papel de filtro. A fração líquida obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência para determinar as concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético os quais foram utilizadas os cálculos das porcentagens de celulose, hemicelulose e grupos acetil. O teor de celulose foi calculado por meio da equação 4.10, o de hemicelulose, por meio da equação 4.11 e o de grupo acetil, pela equação 4.12.

$$\%\text{Celulose} = \frac{M_G}{M_{PA}} \times F_C \times F_{PH} \times 100 \quad (4.10)$$

$$\%\text{Hemicelulose} = \frac{(M_X + M_A)}{M_{PA}} \times F_C \times F_{PH} \times 100 \quad (4.11)$$

$$\%\text{Grupos Acetil} = \frac{M_{HAc}}{M_{PA}} \times F_C \times 100 \quad (4.12)$$

Onde:

M_{PA} = Massa seca de bagaço de malte

M_G = Concentração de glicose (g/L) x 0,5L

M_X = Concentração de xilose (g/L) x 0,5L

M_A = Concentração de arabinose (g/L) x 0,5L

M_{HAc} = Concentração de ácido acético (g/L) x 0,5L

F_{PH} = Fator de perda de hidrólise: 1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose

F_C = Fator de conversão: 0,90 para celulose, 0,88 para hemicelulose e 0,72 para grupos acetil

,

5. Resultados e discussão

5.1. Efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a liberação de acetato, compostos fenólicos e furanos no licor.

No presente trabalho o bagaço de malte foi submetido a um tratamento com diferentes concentrações de NaOH na temperatura de 60 °C, com o objetivo de avaliar o perfil de solubilização dos grupos acetil, compostos fenólicos e compostos furanos no licor alcalino em função do tempo. Os resultados referentes a solubilização desses compostos estão mostrados na Figura 5.1(A.B e C).

Quanto à liberação de acetato no licor alcalino (Figura 5.1A) nota-se que apenas o contato da solução de hidróxido de sódio com o bagaço de malte por 2 minutos já foi capaz de solubilizar acetato e que essa capacidade tende a aumentar com o aumento da concentração de NaOH. Para este tempo de reação, a máxima concentração de acetato liberada no licor foi de 0,43 g/L empregando NaOH na concentração de 1%, o que correspondeu a um aumento de 7,6 vezes em relação a menor concentração de acetato solubilizada a qual foi obtida com 0,25% de NaOH.

Ainda na Figura 5.1A, nota-se que, com exceção do tratamento realizado na concentração de 0,25% de NaOH, a solubilização do acetato praticamente atingiu o valor máximo (~0,7 g/L) após 20 minutos de reação, permanecendo constante após este período. Observa-se também que no tratamento com 0,25% NaOH, os maiores tempos de reação permitiram obtenção de licor alcalino com maior concentração de acetato, ao contrário dos tratamentos que utilizaram maiores concentrações de NaOH (0,5% a 2%), nos quais o tempo não teve efeito sobre o aumento da solubilização de acetato a partir dos primeiros 20 minutos de reação. Esses dados sugerem que quanto menor a concentração de NaOH utilizada no tratamento, maior é o efeito do tempo na solubilização de acetato.

Dentre as condições avaliadas, a máxima concentração de acetato liberada no licor alcalino (em torno de 0,86 g/L) foi observada após 40 minutos empregando 1% NaOH.

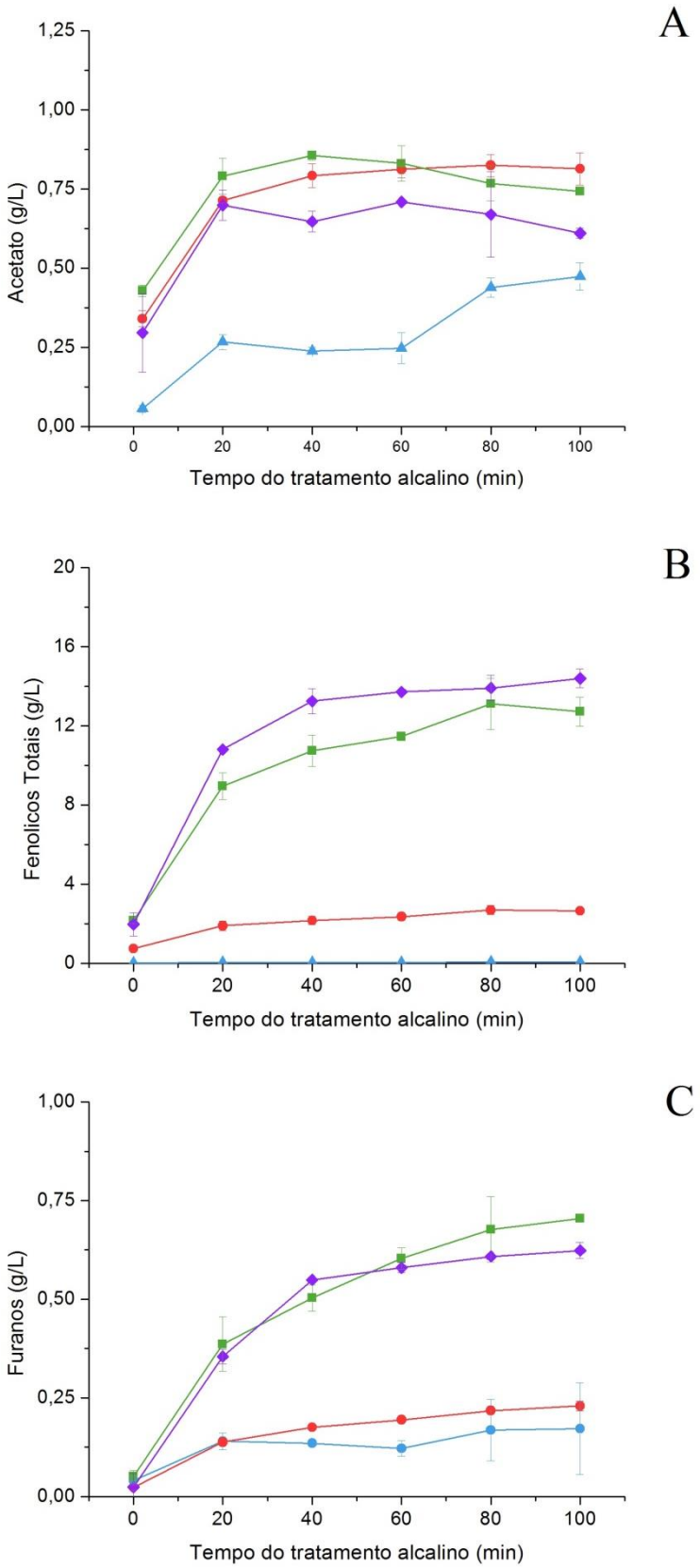


Figura 5.1. Perfil de liberação acetato (A) compostos fenólicos (B) e furanos (C) no licor após tratamento alcalina com solução de NaOH em diferentes concentrações (▲ 0,25%; ● 0,5%; ■ 1%; ◆ 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento.

A liberação de acetato por tratamento alcalino de palha de arroz foi estudada por Del et al (2010). Neste trabalho, o licor alcalino obtido apresentou 0,12 g/L de acetato após o tratamento da biomassa realizado com hidróxido de cálcio na concentração de 0,1% a 180 °C, por 8 minutos e relação sólido líquido de 1:10. Nestas mesmas condições empregando solução de amônia a 0,1%, a concentração de acetato no licor foi aumentada para 0,18 g/L, demonstrando que a concentração de acetato liberada durante o tratamento alcalino é dependente do tipo de álcali empregado.

Chen et al. (2012) avaliando o tratamento de quatro variedades de palha de milho empregando 0,4% de NaOH a 70 °C, constataram que a solubilização de acetato foi dependente da variedade da biomassa empregada. Segundo os autores, o tratamento alcalino da palha de milho 33A14 permitiu a solubilização de 55% do grupamento acetil, enquanto que para a variedade INL este valor foi aumentado para 67,7%.

O perfil de liberação de compostos fenólicos no licor obtido após o tratamento alcalino do bagaço de malte está mostrado na Figura 5.1B. Nota-se que a utilização de 0,25% de NaOH não foi capaz de solubilizar os compostos fenólicos nos tempos avaliados. Por outro lado, a capacidade de solubilização destes compostos aumentou com o aumento da concentração de hidróxido de sódio empregada, sendo a máxima (cerca de 13 g/L) obtida com 2% de NaOH após 40 minutos de reação.

Nota-se ainda na Figura 5.1B que nas menores concentrações (0,25 e 0,5%), a solubilização de compostos fenólicos foi bastante inferior (cerca de 5 vezes) em comparação com as maiores concentrações de NaOH empregadas (1 e 2%), e que para todas as concentrações avaliadas, a solubilização destes compostos não foi favorecida após 40 min de reação. De acordo com os referidos perfis, observa-se que nos primeiros 20 minutos de reação ocorreu a maior solubilização de compostos fenólicos e que neste período, a taxa de solubilização destes compostos, ou seja, a concentração de fenólicos liberada por tempo de tratamento foi de 0,34 g/L.min empregando 1% de NaOH e de 0,44 g/L.min com 2% de NaOH. Essas taxas representam aumento de 76 e 81% na concentração de compostos fenólicos em relação ao observado após 2 minutos de tratamento. Verifica-se ainda que a taxa de liberação de compostos fenólicos decresceu para 0,08 g/L.min e 0,12 g/L.min entre os tempos de 20 e 40 minutos. Estes resultados

demonstram que no inicio da reação, quando a taxa de liberação é alta, a liberação dos compostos fenólicos é favorecida, entretanto quando a taxa decresce, o aumento do tempo de reação não é capaz de aumentar a concentração dos compostos fenólicos no licor alcalino.

O efeito da solubilização de compostos fenólicos pode também ser observado na coloração do licor alcalino (Figura 5.2). Observa-se que quanto maior o tempo de tratamento, mais escuro se torna o licor. Segundo Fengel e Wegener (1989) a cor escura é devido aos grupos funcionais cromóforos presentes nos compostos fenólicos decorrente da degradação da lignina.

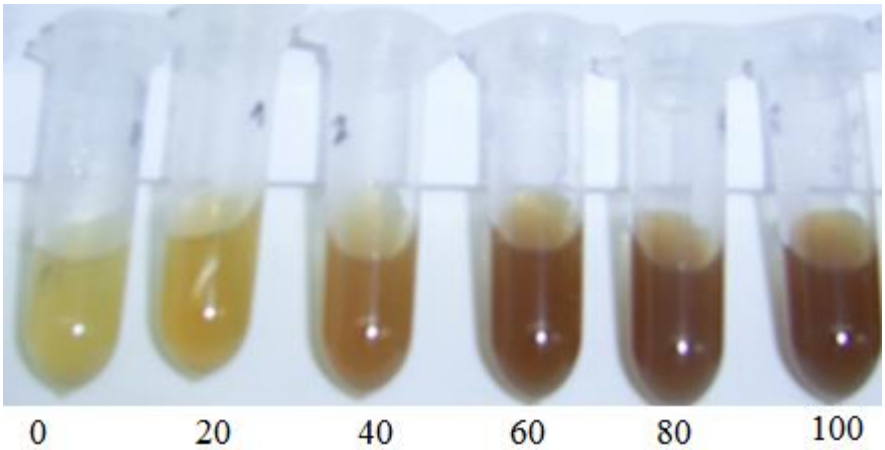


Figura 5.2. Licor alcalino obtido após diferentes tempos de tratamento alcalino realizado com 2% NaOH.

A solubilização da lignina após o tratamento alcalino de diferentes tipos de palha de milho foi estudada por Chen et al. (2012). Neste trabalho, os autores utilizaram uma solução de NaOH a 0,4% e temperatura de 70 °C. Os resultados demonstraram que na variedade 33A14 o tratamento alcalino removeu 13,8% da lignina inicial do material, enquanto que na variedade 34M95 apenas 2% da lignina foi solubilizada.

A Figura 5.1C mostra o perfil de liberação de compostos furanos no licor alcalino após o tratamento do bagaço de malte. Nota-se que o comportamento de liberação desses compostos foi semelhante para os ensaios realizados com 1 e 2% de NaOH, sendo obtidos valores máximos de 0,71 g/L e 0,61 g/L, respectivamente, após 100 minutos de reação. Estes valores decresceram para 0,23 g/L e 0,17 g/L quando os tratamentos foram conduzidos com 0,25 e 0,5% de NaOH, respectivamente, após o mesmos tempo de reação. Estes resultados

revelam que o aumento da concentração de hidróxido de sódio de 0,25 para 0,5% e de 1 e 2% não favorece a liberação destes compostos, enquanto que o aumento da concentração de NaOH de 0,5 e 1,0 %, influenciou fortemente a liberação dos furanos, triplicando sua concentração no licor alcalino.

Assim como no perfil de liberação de compostos fenólicos, a maior taxa de liberação de compostos furanos (aproximadamente 0,17 g/L.min) foi observada nos primeiros 20 minutos de reação empregando 1 e 2% de NaOH. Para os tratamentos com 0,25 e 0,5% de NaOH, estes valores decresceram para 0,06 g/L.min, após o mesmo tempo de reação. Dentre as condições avaliadas, a máxima concentração de furanos liberada no licor alcalino (em torno de 0,60 g/L) foi observada após 60 minutos empregando 1% ou 2% de NaOH.

De uma forma geral, os resultados mostraram que os níveis de acetato, fenólicos e furanos presentes no licor alcalino têm um perfil característico para cada condição de tratamento avaliada, como discutido anteriormente. Em todos os perfis analisados, a taxa de liberação destes compostos foi maior nos primeiros 20 minutos de reação, com uma significativa liberação destes compostos no licor alcalino. Especialmente em relação ao acetato, o aumento da concentração de hidróxido de sódio de 0,25 para 0,5% favoreceu significativamente a sua liberação no licor, não sendo observado um incremento substancial deste composto em concentrações mais elevadas de NaOH. Ainda é necessário considerar que a utilização de soluções concentradas do catalisador (NaOH) e/ou tempos longos de tratamento podem aumentar os custos de processo. Dessa forma o tratamento alcalino empregando 0,5% de NaOH com um tempo de 20 minutos foi selecionado para análise mais detalhada da composição do bagaço de malte tratado.

Para avaliar a nova composição do bagaço de malte após o tratamento nas condições selecionadas (0,5% de NaOH, 20 min, 60°C), foi realizada a caracterização química das frações açucaradas, segundo descrito no item 4.10.7, e a composição está mostrada na Figura 5.3.

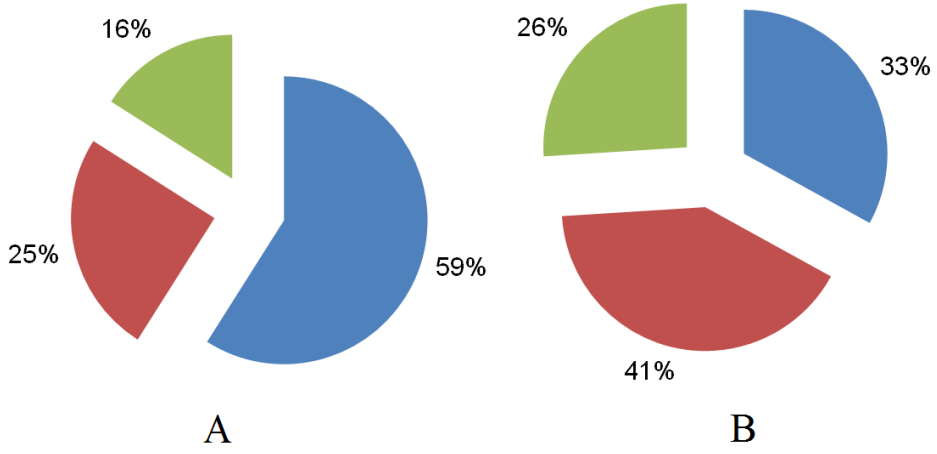


Figura 5.3. Caracterização parcial das frações de açúcares do bagaço de malte (A) e do bagaço de malte tratado (B). (Outros; Hemicelulose; Celulose).

Nota-se um aumento significativo das porções de celulose e hemicelulose comparado com o bagaço de malte de referência (sem tratamento alcalino). A fração de celulose aumentou de 16% para 26%, enquanto a fração de hemicelulose aumentou de 25% para 41% da massa total do bagaço de malte. Este aumento pode ser atribuído a solubilização dos grupamentos acetil e de componentes da lignina, uma vez que tanto o acetato quanto compostos fenólicos estavam presentes no licor e que nenhuma solubilização de monossacarídeos foi observada, conforme mostrado na Figura 5.4. Vale destacar que o aumento do teor das frações açucaradas no material é desejável às etapas seguintes, tais como hidrólise com ácido diluído e sacarificação enzimática, pois poderiam aumentar a concentração final de xilose e glicose nos hidrolisados, respectivamente, mesmo mantendo o rendimento da hidrólise de referência.

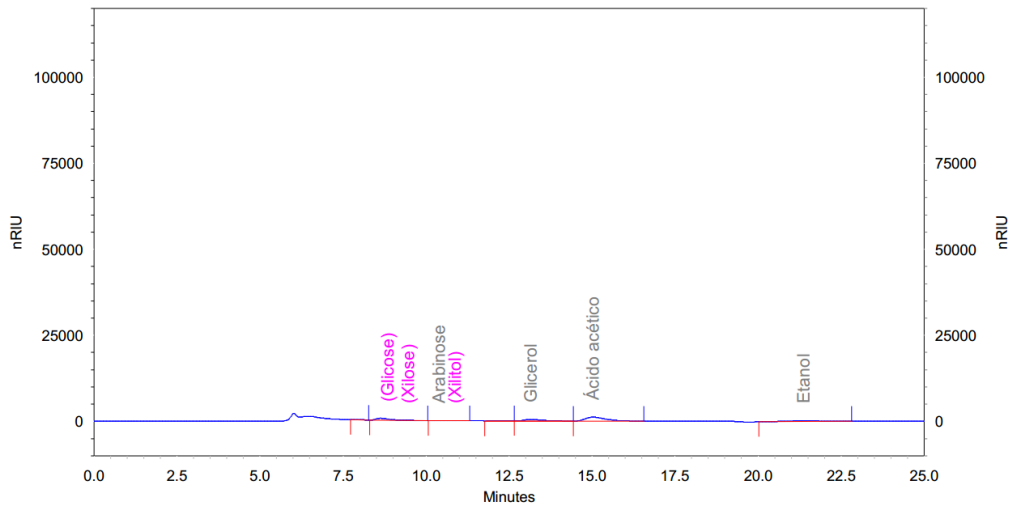


Figura 5.4. Cromatograma do licor alcalino (diluído duas vezes) obtido da extração alcalina com 0,5%NaOH, a 60 °C por 20 minutos.

5.2. Efeito do tratamento alcalino sobre a composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte

A presente etapa visou avaliar o efeito das diferentes condições de tratamento alcalino sobre a composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte. Para tanto, a fração sólida obtida após cada tempo de tratamento alcalino foi submetido ao processo de hidrólise com ácido diluído, nas condições descritas no item 4.2, de materiais e métodos. A composição do hidrolisado hemicelulósico foi analisada e o perfil de liberação de ácido acético, compostos fenólicos, xilose, glicose, arabinose estão mostrados nas Figuras 5.5 a 5.9. Como forma de avaliar o efeito do tratamento, foi utilizado como referência a composição do hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida do bagaço de malte sem tratamento alcalino.

O perfil de liberação de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte está mostrado na Figura 5.5. Nota-se que o aumento da concentração de NaOH de 1 para 2% no tratamento alcalino não afetou concentração de ácido acético no hidrolisado, sendo que a concentração deste ácido permaneceu aproximadamente constante (0,025 g/L) a partir de 20 minutos de reação. Esses dados demonstram também que o tempo não teve efeito significativo na solubilização de ácido acético, com exceção para os tempos de 0 e 20 minutos, nos quais o tratamento com 2% de NaOH permitiu obtenção de hidrolisado hemicelulósico com metade da concentração de ácido acético (0,11 e 0,026 g/L) observada após tratamento a 1% de NaOH (0,21 e 0,063 g/L).

Dentre as condições de tratamento avaliadas, aquela que empregou 0,25% de NaOH foi a que solubilizou a maior concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico (~0,45 g/L), o que correspondeu a uma redução de 50% na concentração deste ácido quando comparado com o hidrolisado referência. Nestas condições de tratamento, e similar ao observado no tratamento com 0,5%, o tempo também influenciou na solubilização de ácido acético no hidrolisado, uma vez que após 100 minutos de reação a concentração deste composto foi reduzida.

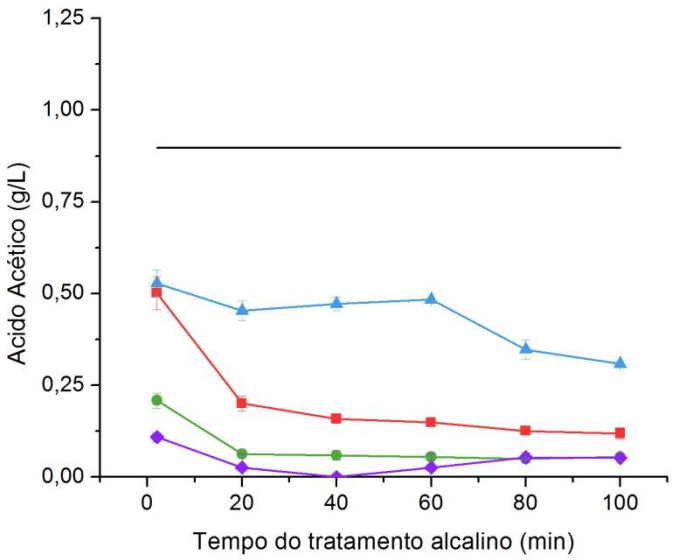


Figura 5.5. Perfil de liberação ácido acético no hidrolisado hemicelulósico após tratamento alcalino com solução de NaOH em diferentes concentrações (▲ 0,25%; ● 0,5%; ■ 1%; ◆ 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento.

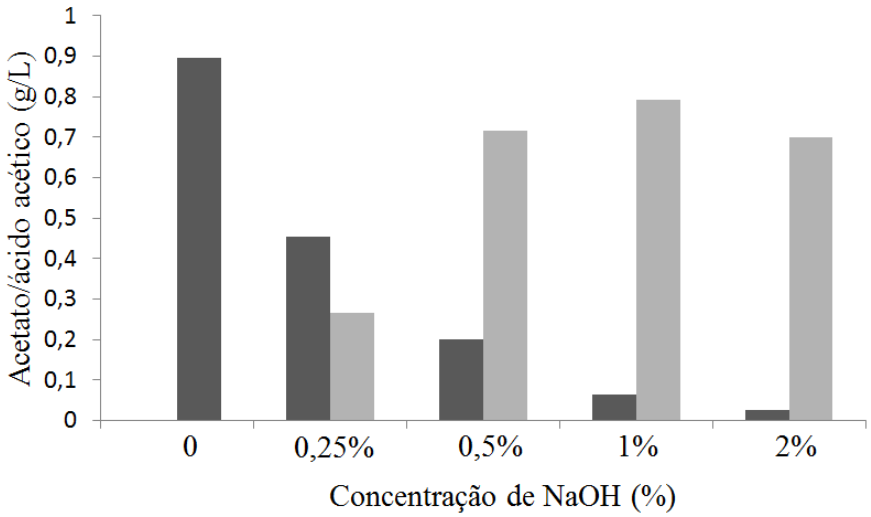


Figura 5.6: Concentração de acetato no licor alcalino (■) e de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico(■) após 20 minutos de tratamento alcalino em diferente concentrações de NaOH.

A Figura 5.6 ilustra a comparação entre a concentração de acetato solubilizada no licor alcalino e a concentração de ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte, sob diferentes concentrações de NaOH, após 20 minutos de tratamento. Nota-se que, a concentração do ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico foi inversamente proporcional ao

nível de acetato solubilizado no licor alcalino. A concentração de acetato no licor alcalino atingiu o valor máximo de 0,70 g/L com 2% de NaOH e nestas condições a concentração de ácido acético no hidrolisado foi de 0,03 g/L. Este resultado, quando comparado aos níveis de ácido acético obtidos no hidrolisado hemicelulósico referência (0,90 g/L), mostra uma redução acentuada deste ácido no hidrolisado hemicelulósico, sugerindo que o tratamento alcalino nestas condições foi capaz de remover quase que totalmente os grupamentos acetil presentes no bagaço de malte.

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que, todas as condições de tratamento alcalino avaliadas promoveram a solubilização parcial dos grupamentos acetil presentes no bagaço de malte, e, portanto reduziram a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico. Considerando que o ácido acético é um dos principais inibidores do metabolismo microbiano em processos de bioconversão do hidrolisado, esta etapa poderá ser utilizada como estratégia para redução da concentração deste composto visando melhorar a fermentabilidade dos hidrolisados de biomassa.

O perfil de liberação de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte submetido ao tratamento alcalino está mostrado na Figura 5.7. Nota-se que para todos os tempos avaliados, o tratamento menos severo (0,25 % de NaOH) permitiu a obtenção de um hidrolisado com baixos níveis de compostos fenólicos (~0,08 g/L), o qual foi semelhante ao observado no hidrolisado hemicelulósico referência. Por outro lado, nas demais condições de tratamento, a solubilização destes compostos foi bastante aumentada (em torno de 12 a 25 vezes) atingindo os maiores valores de concentração (cerca de 2,0 g/L) nos instantes iniciais da reação.

A Figura 5.8 ilustra a comparação entre a concentração de compostos fenólicos solubilizada no licor alcalino e no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte, sob diferentes concentrações de NaOH, após 20 minutos de tratamento. Nota-se que, a concentração de fenólicos solubilizados no licor alcalino aumentou com a severidade do tratamento, entretanto a liberação destes compostos no hidrolisado hemicelulósico foi independente do da concentração de NaOH empregada no tratamento.

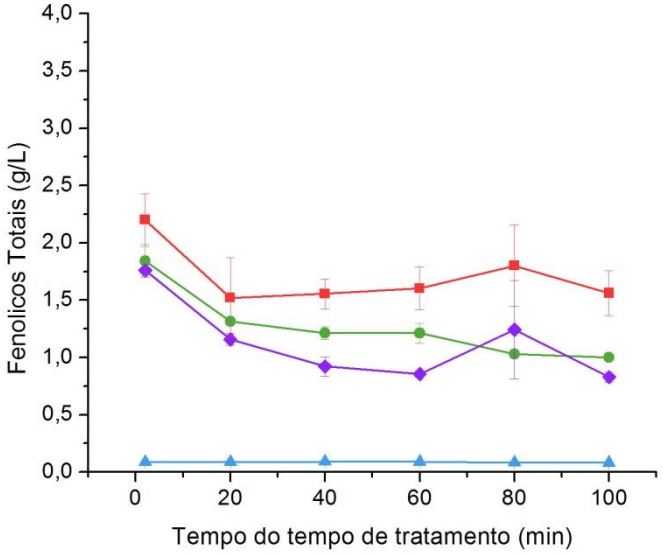


Figura 5.7. Perfil de liberação de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico após tratamento alcalino com solução de NaOH em diferentes concentrações (▲ 0,25%; ● 0,5%; ■ 1%; ◆ 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento.

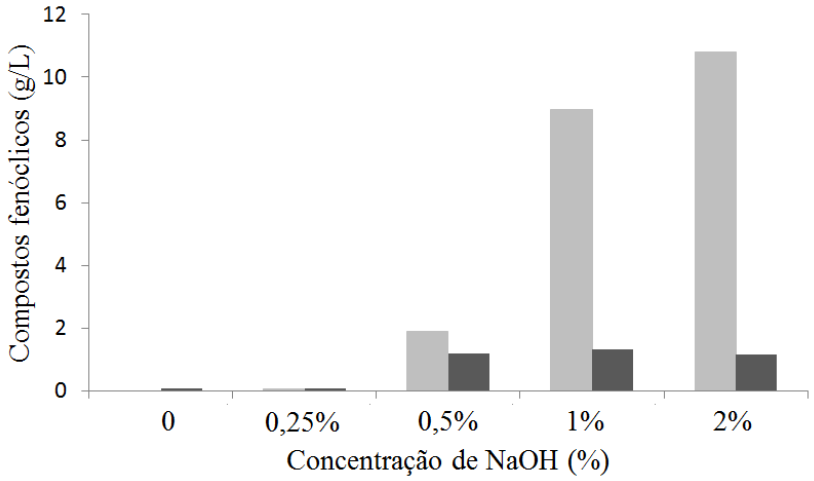


Figura 5.8. Concentração de compostos fenólicos no licor alcalino (■) e de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico(■) após 20 minutos de tratamento alcalino em diferente concentrações de NaOH.

Com base nos resultados obtidos, ficou demonstrado que a solubilização de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico, os quais são produtos de degradação de lignina, é fortemente dependente da concentração de NaOH e em menor grau do tempo de reação.

A Figura 5.9 A mostra o perfil de liberação de glicose no hidrolisado hemicelulósico após o tratamento alcalino do bagaço de malte. Nota-se que para todas as concentrações de NaOH avaliadas, o tempo mostrou pouca influência sobre a solubilização de glicose no hidrolisado. Verifica-se ainda que os níveis de

glicose foram inferiores a 1,0 g/L, e que esta concentração foi menor do que aquela obtida no hidrolisado hemicelulósico referência (2,44 g/L). Estes resultados podem ser atribuídos a um menor rendimento de hidrólise devido as mudanças estruturais no bagaço de malte após tratamento alcalino.

O perfil de liberação de arabinose no hidrolisado hemicelulósico após diferentes condições de tratamento alcalino do bagaço de malte está mostrado na Figura 5.9 B. Verifica-se que para todas as condições avaliadas, o tratamento alcalino favoreceu a liberação de arabinose no hidrolisado quando comparado com a referência. A máxima concentração de arabinose (~12,9 g/L) obtida com o bagaço de malte tratado com 0,5 ou 1 % de NaOH por 60 minutos foi cerca de 50% superior aquela observada no hidrolisado referência (8,7g/L). No que se refere à liberação de xilose (Figura 5.9C) nota-se que a concentração desta pentose no hidrolisado variou substancialmente com as condições de tratamento alcalino empregadas. O menor teor de xilose (8,3 g/L) foi obtido após o tratamento do bagaço com 0,25 % de NaOH por 2 minutos e o maior (22,0 g/L) com 0,5% de NaOH por 60 minutos.

Nota-se ainda na Figura 5.9 C que não há uma relação direta entre a concentração de xilose solubilizada com a concentração de NaOH utilizada no tratamento, porém independente da concentração de NaOH utilizada a liberação de xilose aumentou com o tempo de tratamento, atingindo o máximo com 60 min. Vale ainda destacar que apenas o tratamento com 0,5% de NaOH foi capaz de favorecer a liberação de xilose no hidrolisado tratado em relação ao hidrolisado referência. Nestas condições, o aumento percentual na concentração de xilose foi cerca de 33%. Este aumento na concentração de xilose foi devido ao aumento da fração hemicelulósica do bagaço de malte obtida após o tratamento alcalino, como mostrado na Tabela 5.1. Nota-se ainda nesta Tabela que o rendimento da hidrólise ácida decresceu de 81 para 65% quando do bagaço de malte foi submetido ao tratamento alcalino.

Provavelmente, o tratamento alcalino promoveu alterações estruturais no bagaço de malte sendo necessário a otimização das condições de hidrólise ácida em termos de concentração de ácido sulfúrico, temperatura e tempo de reação, para a nova composição do material.

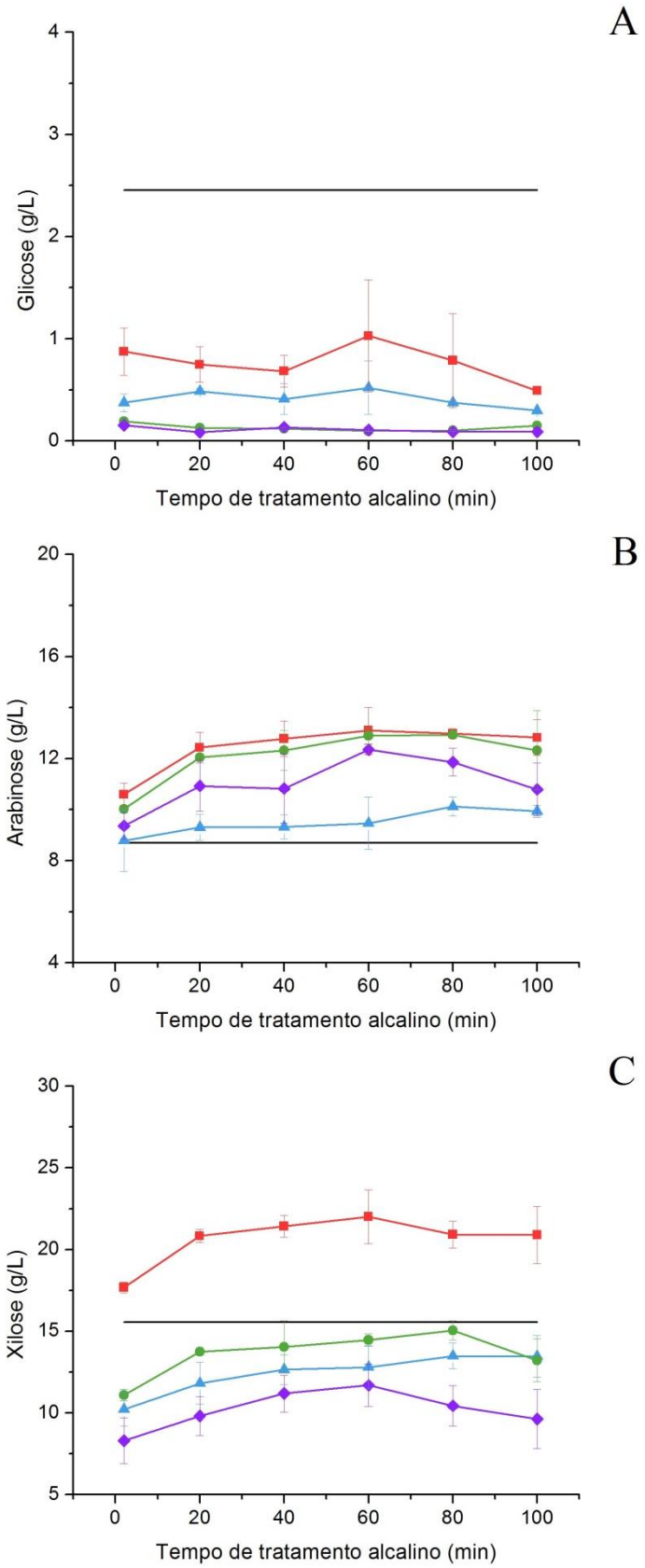


Figura 5.9: Perfil de liberação ácido glicose (A), arabinose (B) e xilose (C) hidrolisado hemicelulósico após tratamento alcalino com solução de NaOH em diferentes concentrações (▲ 0,25%; ● 0,5%; ■ 1%; ◆ 2%), 60 °C, em função do tempo de tratamento.

Tabela 5.1: Composição do química do bagaço de malte referência (BM^R) e bagaço de malte tratado com 0,5% NaOH por 20 minutos (BM^T), e rendimento de recuperação de xilose por hidrólise com ácido diluído.

Biomassa	Composição (%)		Xilose (g/L)		Rendimento de hidrólise (%)
	Hemicelulose*	Xilana	Potencial	Obtida	
BM^R	24,5	17,0	19,27	15,56	81
BM^T	41,5	28,5	32,33	20,83	65

*Hemicelulose = arabinana e xilana

Como discutido anteriormente, é desejável que o hidrolisado hemicelulósico tenha alta concentração de xilose e baixa concentração de compostos inibidores do metabolismo microbiano, principalmente o ácido acético. Cada um destes componentes do hidrolisado apresentaram um perfil diferente para cada condição de tratamento alcalino, e não foi encontrada uma relação direta entre o aumento da concentração de hidróxido de sódio utilizada no tratamento alcalino e a concentração de xilose e ácido acético solubilizado. Desta forma, os dados foram analisados com base na proporção entre concentração de xilose e de ácido acético ($C_{xilose}/C_{ácido\ acético}$) no hidrolisado hemicelulósico conforme ilustrado na Figura 5.10.

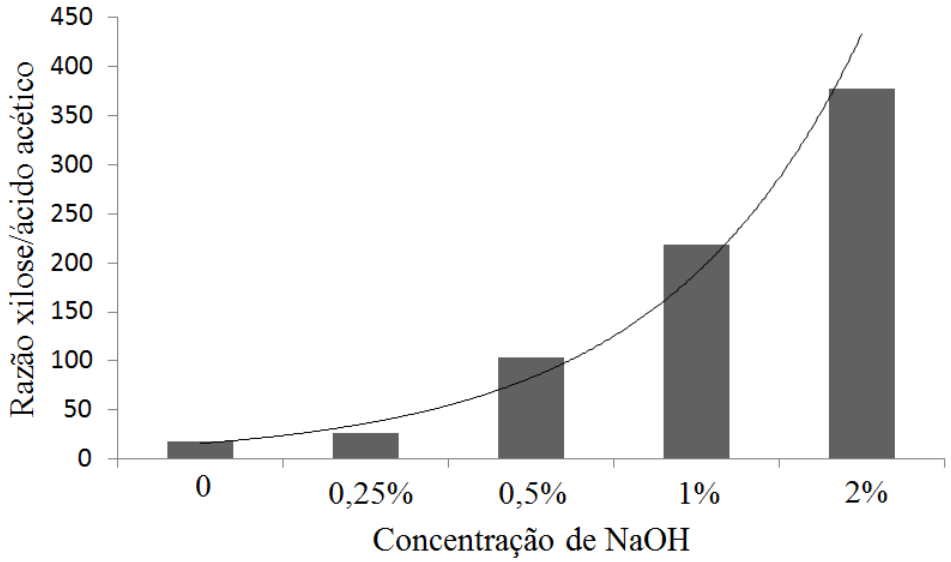


Figura 5.10. Proporção entre a concentração de xilose e ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, após 20 minutos de tratamento alcalino com diferentes concentrações de NaOH.

Nota-se uma tendência de aumento exponencial da proporção $C_{xilose}/C_{ácido\ acético}$ com o aumento da concentração de NaOH empregada no tratamento do bagaço de malte. Embora a maior proporção ($C_{xilose}/C_{ácido\ acético}$ = 378) tenha sido obtida empregando 2% de NaOH, nestas condições a concentração de xilose foi aproximadamente 10 g/L, o que correspondeu a metade da concentração máxima obtida quando foi empregado 0.5 % de NaOH. Esta alta proporção foi majoritariamente devido as baixos níveis de ácido acético nestas condições. Desta forma, mesmo não apresentando a maior $C_{xilose}/C_{ácido\ acético}$, o tratamento com 0,5 % de NaOH, o qual permitiu a liberação máxima de xilose concomitante a baixos níveis de ácido acético (0,2 g/L) pode ser considerada como a mais adequada.

5.2. Otimização das condições do tratamento alcalino sobre a composição dos hidrolisados hemicelulósico e celulósico do bagaço de malte

Esta etapa teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura e da concentração de hidróxido de sódio sobre o tratamento alcalino do bagaço de malte visando melhorar a composição de seus hidrolisados. Para esta finalidade, o bagaço de malte foi submetido a tratamentos alcalinos combinando diferentes condições de temperatura (31,6 a 88,4 ºC) e concentração de hidróxido de sódio (0,14 a 0,86%). Estes ensaios foram realizados de acordo com a metodologia de planejamento experimental, utilizando-se uma matriz de 2^2 com giro em estrela e com repetição do ponto central. Foi utilizado como resposta do experimento a concentração de ácido acético e de xilose no hidrolisado hemicelulósico e a concentração de glicose no hidrolisado celulósico, sendo ambos obtidos a partir de bagaço de malte tratado. As condições utilizadas nos tratamentos, assim como as respostas avaliadas são mostradas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores obtidos para a concentração de ácido acético e xilose no hidrolisado hemicelulósico, e glicose no hidrolisado enzimático da celulignina, no planejamento em estrela.

Ensaio	Variável codificada (Valores reais)		Resposta (g/L)		
			Hidrolisado Hemicelulósico		Hidrolisado Celulósico
	Temperatura(°C)	NaOH (%)	Ác. acético	Xilose	Glicose
1	-1 (40)	-1 (0,25)	0,52	11,1	17,1
2	1 (80)	-1 (0,25)	0,44	13,0	14,7
3	-1 (40)	1 (0,75)	0,12	10,4	16,6
4	1 (80)	1 (0,75)	0,00	14,0	20,3
5	-1,41 (31,6)	0 (0,50)	0,26	12,8	17,4
6	1,41 (88,4)	0 (0,50)	0,09	13,0	19,2
7	0 (60)	-1,41 (0,15)	0,60	11,3	16,0
8	0 (60)	1,41 (0,86)	0,00	11,3	20,7
9	0 (60)	0 (0,50)	0,22	21,1	19,5
10	0 (60)	0 (0,50)	0,20	21,0	19,4
11	0 (60)	0 (0,50)	0,18	20,4	19,6

Nota-se na Tabela 5.2 que a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte tratado variou de 0 a 0,60 g/L, demonstrando que todas as condições de tratamento avaliadas proporcionaram reduções na concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico, quando comparada com a concentração do hidrolisado referência (0,90 g/L de ácido acético). Nota-se ainda que tanto o aumento da temperatura quanto o aumento de concentração de hidróxido de sódio favoreceram a redução da concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico. Por exemplo, comparando os ensaios 7 e 8, ambos realizados a 60 ºC, verifica-se que na menor concentração de hidróxido de sódio (0,15 % no ensaio 7) resultou em uma concentração de 0,60 g/L de ácido acético no hidrolisado, enquanto que no ensaio realizado com a maior concentração de álcali (0,86% no ensaio 8) o ácido acético não foi detectado no hidrolisado hemicelulósico. De maneira análoga, o aumento da temperatura favoreceu a redução da concentração de ácido acético no hidrolisado, por exemplo, comparando os ensaios 5 e 6, ambos realizados com 0,50% de hidróxido de

sódio, o ensaio realizado em menor temperatura (31,6 ºC no ensaio 5) resultou em uma concentração de ácido no hidrolisado acético cinco vezes maior que a encontrada quando o bagaço de malte foi tratado com temperatura mais elevada (88,4 ºC no ensaio 6).

Os maiores níveis de xilose ocorreram no ponto central, o que demonstra um provável efeito quadrático, da temperatura e concentração de NaOH sobre esta resposta dentro da região avaliada.

O tratamento alcalino do bagaço de malte também mostrou forte influência sobre a concentração de xilose solubilizada no hidrolisado hemicelulósico, tendo tal concentração variado de 11 a 21 g/L, de acordo com as condições empregadas. De um modo geral, as maiores concentrações de xilose no hidrolisado hemicelulósico, cerca de 20 g/L, foram obtidas nos ensaio do ponto central (ensaios 9, 10 e 11), enquanto que nos demais ensaios do planejamento experimental (ensaios de 1 a 8), a concentração de xilose variou entre 11 e 14 g/L. Estes resultados indicam um possível comportamento quadrático de ambas as variáveis independentes estudadas. Quando comparada a concentração de xilose solubilizada no hidrolisado hemicelulósico do bagaço malte, o tratamento nas condições do ponto central proporcionou um aumento de 32,5% na concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico em relação ao hidrolisado de referência (sem tratamento alcalino). Estes resultados podem ser atribuídos ao aumento da proporção de hemicelulose no bagaço de malte após o tratamento alcalino como consequência da remoção preferencial de outras frações solubilizadas.

Com relação ao hidrolisado celulósico obtido após sacarificação enzimática da celulignina, a concentração de glicose variou entre 14,7 e 20,7 g/L, nos diferentes tratamentos avaliados. De um modo geral, sob condições mais severas de tratamento, que combinem maiores temperaturas e concentrações de hidróxido de sódio, parecem favorecer a hidrolise celulose. Por exemplo, as maiores concentrações de glicose observadas, cerca de 20 g/L, ocorreram nos ensaios do ponto central (9, 10 e 11) e nos ensaios 4, 6 e 8, sendo todos estes realizados com concentrações de hidróxido de sódio e temperatura iguais ou superiores a 0,50% e 60 ºC, respectivamente. Entretanto, não foi notada nenhuma clara correlação das variáveis estudadas no planejamento sobre concentração de

glicose no hidrolisado celulósico, sendo, portanto mais adequada uma interpretação por meio de análise estatística.

5.2.1. Análise estatística

Para estabelecer as condições de tratamento alcalino que permitam redução na concentração de ácido acético e que concomitantemente favoreça a solubilização de xilose no hidrolisado hemicelulósico e de glicose no hidrolisado celulósico, é necessário inicialmente identificar as variáveis de maior influência sobre tais respostas. Com este objetivo, os efeitos principais das variáveis temperatura e concentração de hidróxido de sódio, assim como seus efeitos quadráticos e de interação foram analisados através de ferramentas estatísticas. A significância estatística dos efeitos principais, quadráticos e de interação para cada resposta foi determinada pelo teste **t** de Student e os resultados estão apresentados na Tabela 5.3.

Em relação a resposta concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico, verificou-se que apenas a variável concentração de hidróxido de sódio e seu termo quadrático tiveram efeitos significativos, com nível de 99% de significância. No que se refere a resposta concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico, foram estatisticamente significativos a um nível de 99% de confiança os efeitos principais e quadráticos de ambas as variáveis, temperatura e concentração de hidróxido de sódio. Para a resposta concentração de glicose no hidrolisado celulósico, apresentaram significância estatística apenas os termos quadráticos de ambos as variáveis, temperatura e concentração de hidróxido de sódio, em níveis de 95% e 90% de significância, juntamente com o termo de interação AB, a um nível de 95% se significância.

Tabela 5.3. Estimativa dos efeitos, erro padrão e teste t de Student para a resposta concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico, concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e concentração de glicose no hidrolisado celulósico.

Variável resposta	Efeito	Coeficiente	t_{calc}
Concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico	Média	0,92	-
	x_1-Temperatura	-2,83E-4	-0,086
	x_2-NaOH	-1,67	-7,58***
	x_1^2	-1,22E-5	-0,48
	x_2^2	0,95	5,85***
	x_1x_2	-2,00E-3	-0,83
Concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico	Média	-33,50	
	x_1-Temperatura	1,18	9,99***
	x_2-NaOH	71,24	9,03***
	x_1^2	-9,86E-3	-10,91***
	x_2^2	-75,81	-13,10***
	x_1x_2	0,085	0,98
Concentração de glicose no hidrolisado celulósico	Média	12,92	
	x_1-Temperatura	0,13	1,23
	x_2-NaOH	1,40	0,19
	x_1^2	-2,18E-3	-2,61**
	x_2^2	-13,76	-2,57*
	x_1x_2	0,30	3,81**

*significativos a 90% de confiança; ** significativo a 95% de confiança; ***significativo a 99% de confiança.

Baseado nos termos significativos, foram propostos modelos matemáticos para descrever o efeito da temperatura e concentração de NaOH sobre a concentração de ácido acético (equação 5.1), xilose (equação 5.2) e glicose (equação 5.3) nos hidrolisados obtidos.

$$y_1 = 0{,}86 - 1{,}82\ x_2 + 0{,}97\ x_2x_2 \quad (5.1)$$

$$y_2 = -36{,}05 + 1{,}22\ x_1 + 76{,}34\ x_2 - 9{,}86\ 10^{-3}x_1x_1 - 75{,}81x_2x_2 \quad (5.2)$$

$$y_1 = 17{,}03 - 1{,}17\ 10^{-3}x_1x_1 - 13{,}40x_2x_2 + 0{,}32\ x_1x_2 \quad (5.3)$$

Onde: y_1, y_2 e y_3 representam a resposta estimada em g/L, para a concentração de ácido acético, xilose e glicose, respectivamente.

x_1 e x_2 representam as variáveis temperatura (^oC) e concentração de hidróxido de sódio (%), respectivamente.]

A análise de variância das regressões obtidas para os modelos que descrevem a concentração de ácido acético e de xilose no hidrolisado hemicelulósico, assim como a concentração de glicose no hidrolisado celulósico são apresentadas nas Tabelas 5.4, 5.5 e 5.6, respectivamente. Verifica-se nestas Tabelas, que os modelos obtidos apresentam significância estatística a um nível de 99% de confiança, e os coeficientes de correlação foram superior a 0,88, demonstrando assim que os modelos são adequados para descrever o comportamento de tais respostas em função das variáveis estudadas.

Para uma melhor interpretação do comportamento das respostas avaliadas em função das variáveis temperatura e concentração de hidróxido de sódio, empregados no tratamento alcalino, os modelos foram representados por superfícies de resposta conforme mostrado nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13.

Tabela 5.4 Análise de variância do modelo representativo da concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, na região do estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	0,38	2	0,19	54,61	< 0,0001
Residual	0,028	8	3,46E-4		
Falta de ajuste	0,027	6	4,48E-4	11,21	0,0841
Erro puro	8,00E-4	2	4,00E-4		
Total	0,41	10			
R^2=0,93					

SQ=soma quadrática; GL=graus de liberdade; MQ=média quadrática

Tabela 5.5. Análise de variância do modelo representativo a resposta concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico, na região do estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	172,65	4	43,16	58,10	<0,0001
Residual	4,46	6	0,74		
Falta de ajuste	4,17	4	1,04	7,27	0,1245
Erro puro	0,29	2	0,14		
Total	177,11	10			
R^2=0,97					

SQ=soma quadrática; GL=graus de liberdade; MQ=média quadrática

Tabela 5.6. Análise de variância do modelo representativo da concentração no hidrolisado celulósico, na região do estudo

Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
Modelo	33,98	3	11,33	18,61	0,001
Residual	4,26	7	0,61		
Falta de ajuste	4,24	5	0,85	84,83	0,0117
Erro puro	0,020	2	0,010		
Total	38.24	10			
R^2=0,88					

SQ=soma quadrática; GL=graus de liberdade; MQ=média quadrática

A Figura 5.11 mostra as curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) estimadas para o modelo que relaciona a temperatura e a concentração de hidróxido de sódio com a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico. Verifica-se que as menores concentrações de ácido acético no hidrolisado ocorrem nas condições alcalinas mais severas dentre as avaliadas no presente trabalho. Em temperaturas próximas de 100 °C e concentração de NaOH em torno de 0,9%, a concentração de ácido acético no hidrolisado, segundo o modelo, atingiria 0 g/L. Quando as condições de tratamento alcalino são mais brandas, ou seja, com temperaturas variando de 20 a 30 °C empregando 0,1% de NaOH, a concentração de ácido acético no hidrolisado supera 0,6 g/L, segundo o modelo. As previsões do modelo confirmam o que foi observado nos experimentos preliminares do presente trabalho.

As curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) estimadas para o modelo que descreve a concentração de xilose em função da temperatura e da concentração de hidróxido de sódio estão mostradas na Figura 5.12. Segundo o modelo, o tratamento alcalino realizado em altas temperaturas combinada com elevada concentração de NaOH permite pequena concentração de xilose, assim como altas temperaturas e baixa concentração de NaOH e vice-versa. Ou seja, as condições extremas de tratamento na região avaliada não possibilitaram a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico com alta concentração de xilose. O tratamento realizado entre 55 e 65 °C e entre 0,4 e 0,6% de NaOH permite a obtenção de concentração máxima de xilose no hidrolisado hemicelulósico.

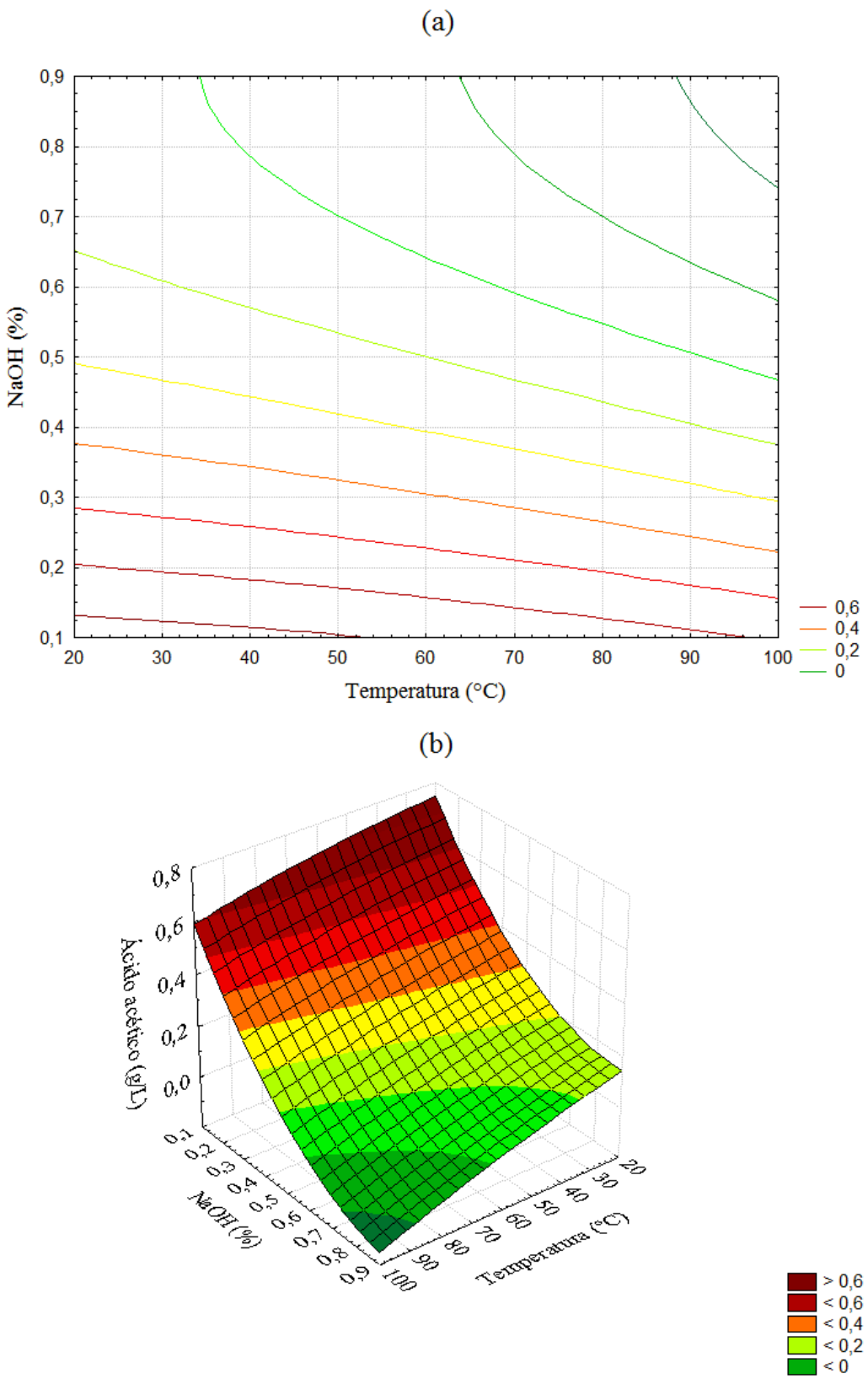
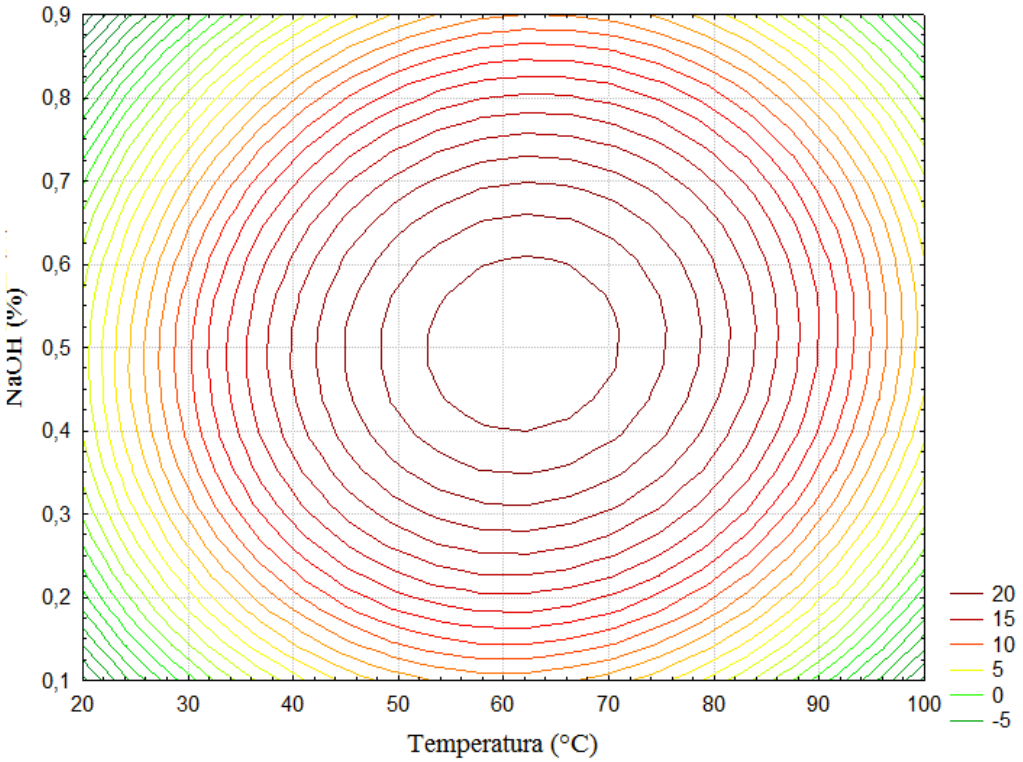


Figura 5.11. Curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) descritas pelo modelo y_1 que representa a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte submetido a diferentes condições de tratamento alcalino.

(a)



(b)

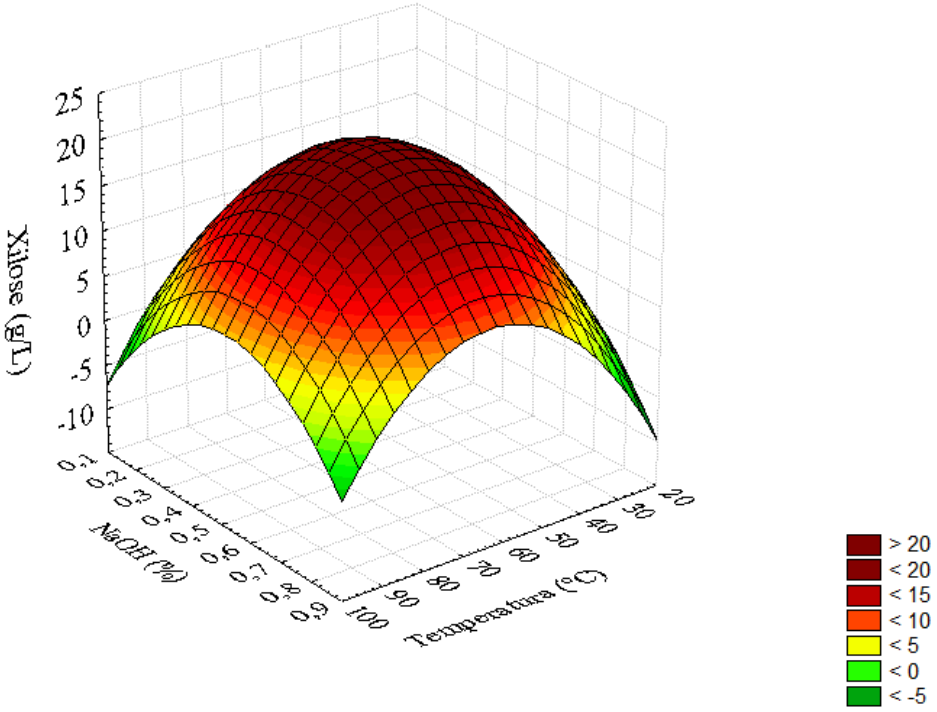


Figura 5.12. Curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) descritas pelo modelo y_1 que representa a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte submetido a diferentes condições de tratamento alcalino.

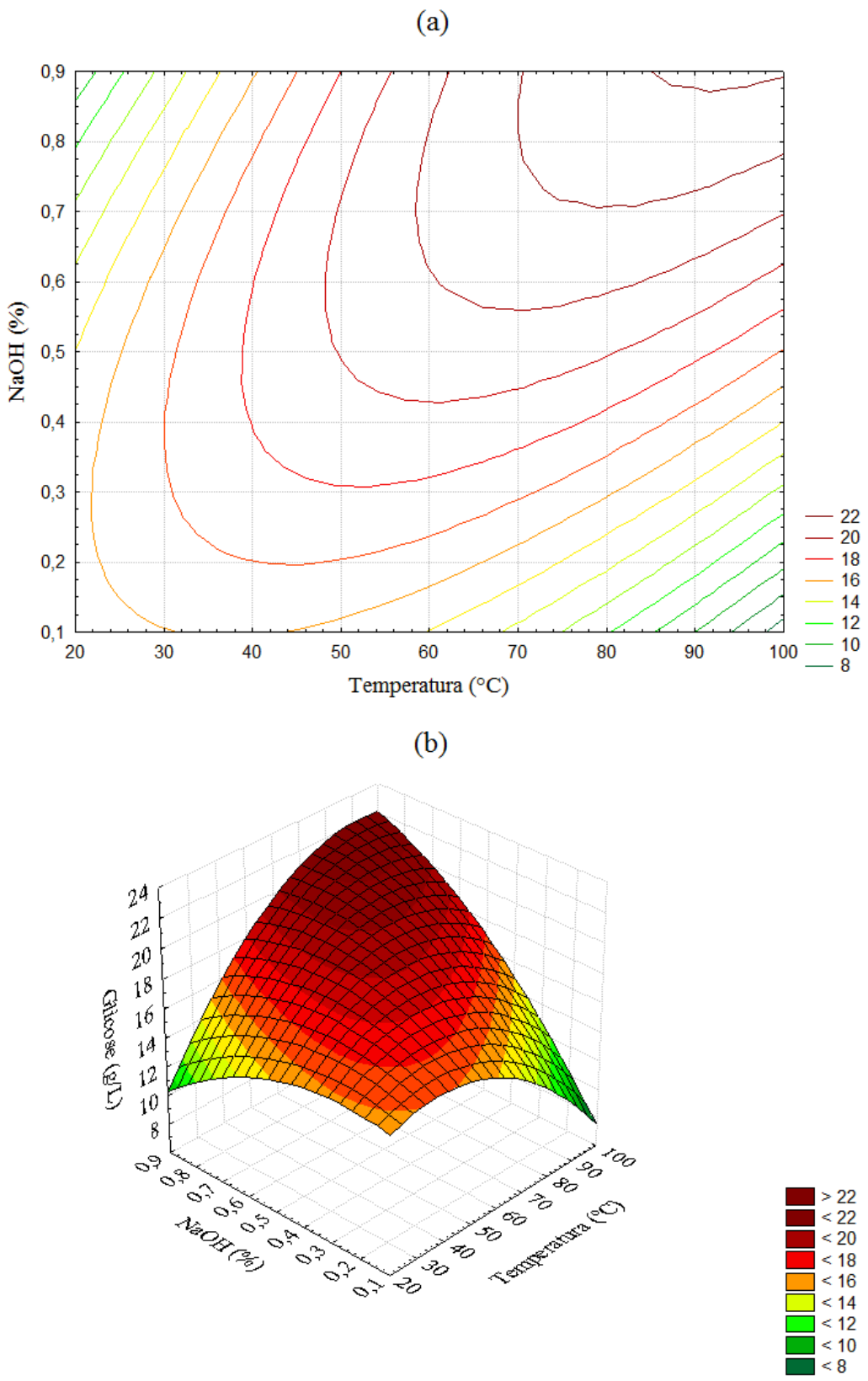


Figura 5.13: Curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) descritas pelo modelo y1 que representa a concentração de glicose após 12 horas de sacarificação enzimática da celulignina obtido do pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de malte submetido a diferentes condições de tratamento alcalino.

A Figura 5.13 mostra as curvas de nível (a) e superfície de resposta (b) estimadas para o modelo que descreve a concentração de glicose no hidrolisado celulósico em função da temperatura e concentração de hidróxido de sódio no tratamento alcalino. Nota-se que nas condições mais severas de tratamento alcalino (altas temperaturas e altas concentrações de hidróxido de sódio), a concentração de glicose obtida após sacarificação enzimática foi máxima, em torno de 22 g/L. Por outro lado, em condições mais amenas de ambos os parâmetros (temperatura baixa combinada a baixa concentração de hidróxido de sódio), a concentração de glicose hidrolisada na sacarificação abaixou para 16 g/L. Nota-se ainda que quando são combinadas altas temperaturas com baixas concentrações de hidróxido de sódio, ou ainda, baixa temperatura e alta concentração de hidróxido de sódio, a concentração de glicose recuperada decrescem ainda mais, atingindo um valor de 10 g/L.

Rabelo et al. (2012) estudaram o efeito do da concentração de hidróxido de cálcio, da temperatura e do tempo de tratamento alcalino sobre o rendimento de glicose após sacarificação enzimática do bagaço de cana. Segundo os autores a concentração de CaOH foi fator que mostrou menor efeito sobre a solubilização da glicose, sendo o máximo rendimento obtido nas seguintes condições de tratamento (~200mg/g de biomassa); tempo (65,5horas) e temperatura (86,8 °C).

Visando otimizar as condições do tratamento alcalino de forma a se obter simultaneamente um hidrolisado hemicelulósico com menor concentração de ácido acético e maior concentração de xilose, assim como um maior teor de glicose no hidrolisado celulósico utilizou-se um método numérico, disponível no Software Design-Expert. Para tal, foram selecionados convenientemente os critérios de máximo ou mínimo para as variáveis dependentes mantendo as variáveis independentes na região do estudo. A temperatura de 67,6 °C e concentração de hidróxido de sódio de 0,628 % foram as condições selecionadas como condições ótimas. Nessas condições são previstos valores de 0,085 g/L e 19,39 g/L para o ácido acético e xilose, respectivamente no hidrolisado hemicelulósico e de 20,38 g/L de glicose no hidrolisado celulósico.

Como forma de comprovar o modelo, foi realizada o tratamento alcalino do bagaço de malte nas condições otimizadas. Após a obtenção da biomassa tratada, foi realizada a hidrólise com ácido diluído para obtenção do hidrolisado hemicelulósico, e a celulignina que por sua vez foi enzimaticamente hidrolisada

para recuperação do hidrolisado celulósico. O hidrolisado hemicelulósico obtido experimentalmente nas condições otimizadas apresentou concentração de ácido acético de 0,087 g/L, quando o previsto pelo modelo foi 0,085 g/L. Em relação a concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico, foi obtido experimentalmente 16,31 g/L de xilose, quando o previsto pelo modelo foi de 19,39 g/L. A fração de celulignina permitiu obtenção de hidrolisado com 20,77 g/L de glicose, quando o previsto foi 20,38 g/L. Nota-se portanto que o modelo obtido pelo planejamento foi confirmado experimentalmente.

A partir dos resultados obtidos, nota-se que tratamento alcalino nas condições otimizadas promoveu uma redução de 90% na concentração de ácido acético e aumento de 4,5% na concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico. Além disso, o hidrolisado celulósico apresentou uma aumento de 15% na concentração de glicose no hidrolisado celulósico, em relação aos valores de referência, ou seja, aos obtidos nos hidrolisados provenientes do bagaço de malte não submetido ao tratamento alcalino.

Estas condições otimizadas de tratamento alcalino serão empregadas para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos e celulósicos, os quais serão avaliados quanto a sua fermentabilidade pelas leveduras *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*, respectivamente.

5.8. Efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a sacarificação e fermentação da celulignina

Nesta etapa, o bagaço de malte tratado sob as condições previamente otimizadas (0,63% de NaOH e 67,6 °C), foi submetido ao processo de hidrólise com ácido diluído visando a recuperação da celulignina. O efeito do tratamento alcalino sobre a sacarificação e a fermentação esta fração foi avaliado utilizando como parâmetro de comparação os resultados obtidos com a celulignina do bagaço de malte não tratado (referência). Para tanto, duas estratégias foram abordadas: (1) sacarificação e fermentação em separado (SHF) e (2) sacarificação e fermentação simultânea (SSF).

A Figura 14 mostra os resultados obtidos no ensaio de sacarificação e fermentação em separado (SHF) da celulignina de bagaço de malte com e sem tratamento alcalino. Nota-se que a sacarificação da celuligina não tratada solubilizou 16,8 g/L de glicose após 12 horas de sacarificação, enquanto que a

celulignina tratada o teor deste açúcar atingiu 20,3 g/L, correspondendo a um aumento de glicose de 20,8%. Estes resultados sugerem que o tratamento alcalino favorece a sacarificação da celulignina, embora não seja possível avaliar o impacto do tratamento sobre o rendimento de hidrólise, uma vez que a composição da biomassa não foi determinada.

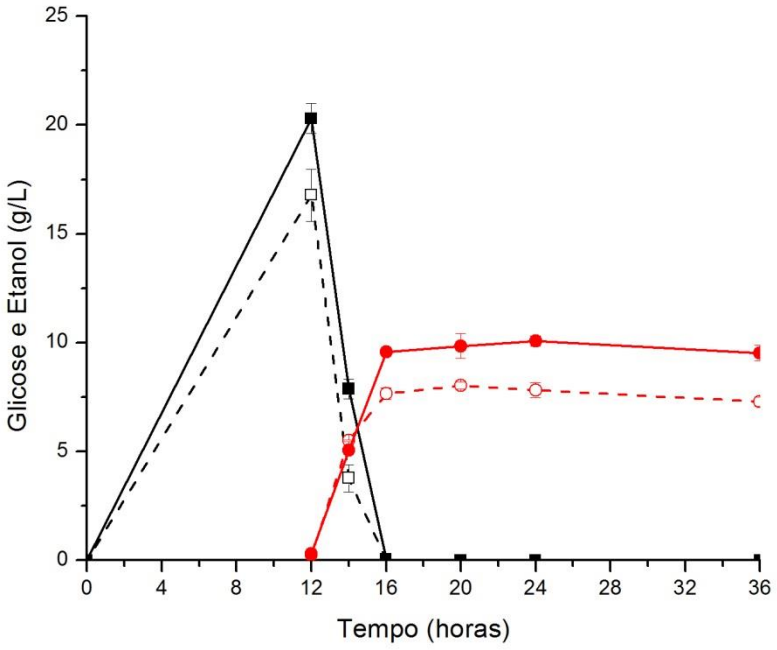


Figura 5.14. Ensaios de SHF da celulignina do bagaço de malte sem tratamento alcalino: etanol---○---, e glicose---□---, e tratado com 0,63% de NaOH a 67,6 °C: etanol—●— e glicose—■—, empregando a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25 FPU/g e 25 UI/g, respectivamente, sob 45 °C e 100 rpm

O pré-tratamento alcalino empregando condições brandas é conhecido como um método capaz de melhorar a digestibilidade enzimática da biomassa lignocelulósica. De acordo com Mosier et al. 2005 este método é geralmente mais eficaz no tratamento de resíduos agrícolas e culturas herbáceas. A imersão da biomassa em solução de hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amoníaco ou cal, numa concentração inferior a 2%, tem sido relatado como um processo capaz de promover deslignificação da biomassa, perda de xilana, diminuição da cristalinidade de celulose e inchaço da biomassa (Zhao, Zhang, Liu, 2008) e como consequência, a produção de açúcar é favorecida. De fato, Mc Intosh e Vancov obtiveram um aumento de 5,6 vezes na liberação de glicose quando a palha de sorgo foi pré-tratada com 2% de NaOH, 121° C por 60 min.

Com relação à produção de etanol pela levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860, verifica-se que a glicose foi totalmente consumida após 4 horas e a produção de etanol atingiu o máximo de 7,65 g/L para a celulignina referência (CL^R) e 9,57 g/L para a celulignina do bagaço de malte tratado (CL^T), após 16 horas de processo, ou seja, 4 horas de fermentação. O aumento de 25 % observado na produção de etanol empregando a celulignina do bagaço de malte tratado pode ser atribuído ao maior teor de glicose presente no hidrolisado correspondente, o que indica que a capacidade fermentativa da levedura foi mantida. Como consequência, o fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) foi semelhante em ambos materiais avaliados (~0,46 g/L), porém a produtividade volumétrica em etanol na celulignina tratada (Q_P = 2,40 g/L.h) foi ligeiramente superior em relação a não tratada (Q_P = 1,91 g/L.h.

Os resultados referentes aos ensaios de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) da celulignina de bagaço de malte estão mostrados na Figura 15. Nessa configuração de processo, o inóculo e as enzimas foram adicionados ao mesmo tempo no meio contendo a celulignina, conforme descrito no item 4.4 de materiais e métodos. Observa-se que a concentração de glicose liberada pela ação das enzimas celulolíticas se manteve baixa (menor que 0,5 g/L na CL^R e 1,5 g/L na CL^T), durante as 24 horas de SSF, provavelmente devido à elevada taxa de consumo deste carboidrato pela levedura *K. marxianus* NRRL Y-6068. Nota-se ainda que para ambas as frações de celulignina avaliadas, a máxima concentração de etanol foi obtida após 8 horas de fermentação atingindo 7,7 g/L a partir da CL^R e 11,0 g/L a partir da CL^T, ou seja, o tratamento alcalino foi responsável pelo aumento de 43% na concentração máxima de etanol obtida no processo de SSF. Nesta configuração a produtividade volumétrica em etanol foi de 0,89 g/L.h e de 1,29 g/L.h empregando a CL^R e CL^T. respectivamente.

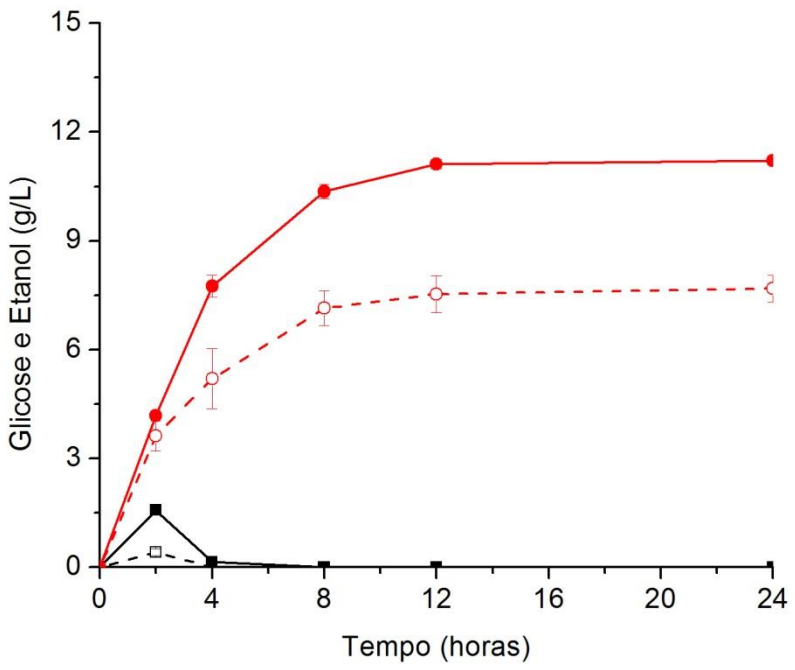


Figure 5.15. Ensaios (SSF) da celulignina do bagaço de malte sem tratamento alcalino: etanol---○---, e glicose---□---. E tratado com 0,63% de NaOH a 67,6 °C: etanol—●— e glicose—■—, empregando a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25FPU/g e 25UI/g, respectivamente, sob 45 °C e 100rpm

Diante dos resultados obtidos nas diferentes estratégias de sacarificação e fermentação empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860, faz-se necessário realizar uma comparação entre os parâmetros fermentativos referentes a esses ensaios, os quais estão apresentados na Tabela 5.7.

Nota-se que para ambas as configurações de processo avaliadas (SHF e SSF) a fermentação da celulignina do material tratado (CLT) forneceu maior concentração de etanol, e essa diferença foi mais pronunciada na SSF. Além disso, a produtividade volumétrica total em etanol, a qual considera o tempo de sacarificação e fermentação no processo foi aumentada em 2,2 vezes em relação à SHF.

Castro (2011) avaliando a produção de etanol a partir da celulignina da palha de arroz empregando a mesma levedura também constatou que a SSF foi a estratégia mais adequada ao processo quando comparada a SHF. Neste estudo, os autores obtiveram um aumento de 3,7 vezes no valor produtividade volumétrica total em etanol.

Tabela 5.7. Parâmetros fermentativos dos ensaios de SHF e SSF da celulignina de bagaço de malte referência (CL^R) e tratado (CL^T), por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em temperatura de 45 °C e agitação de 100rpm.

	SHF		SSF	
Parâmetros	CL^R	CL^T	CL^R	CL^T
Tempo de sacarificação (h)	12	12	-	-
Tempo de fermentação (h)	4	4	8	8
Tempo total de processo (h)	16	16	8	8
Concentração inicial de glicose (g/L)	16,77	20,30	0	0
Concentração máxima de etanol (g/L)	7,65	9,57	7,14	10,35
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,46	0,47	-	-
η (%)	90	92	-	-
Q_P (g/L.h)	1,91	2,39	0,89	1,29
Q_{PT} (g/L.h)	0,48	0,60	0,89	1,29

$Y_{P/S}$ (g/g) = Fator de conversão de glicose em etanol; η (%) = Eficiência de fermentação, Q_P (g/L.h) = Produtividade volumétrica em etanol considerando apenas o tempo de fermentação; Q_{PT} (g/L.h) = Produtividade volumétrica total em etanol considerando o tempo de sacarificação e de fermentação

Considerando que no presente trabalho, para ambas as estratégias de processos avaliadas a eficiência da fermentação atingiu 90% e que a produtividade volumétrica em etanol é um dos fatores mais importantes para a viabilidade econômica do processo, pode-se concluir que o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) empregando o bagaço de malte submetido ao tratamento alcalino nas condições previamente otimizadas é a estratégia mais indicada para a produção de etanol empregando a levedura termotolerante *K. marxiaus* KRRL Y-6860.

5.7. Efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico

Como forma de avaliar o efeito do tratamento alcalino do bagaço de malte sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico, ensaios foram realizados com a levedura *Pichia stipitis*, sob condições previamente definidas por Garcia (2012). Para tanto, foi utilizando como parâmetro de comparação os resultados obtidos na fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte não tratado (referência).

A Figura 16 A e B apresenta o perfil cinético da fermentação de *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de malte não tratado (HH^R) e tratado (HH^T), respectivamente. Nota-se que no (HH^R) a glicose foi totalmente consumida pela levedura após 41 horas de fermentação e que a xilose foi quase que totalmente assimilada após 220 h de cultivo. Verifica-se ainda que o consumo de xilose se iniciou após o esgotamento da glicose, indicando uma assimilação sequencial dos açúcares. Este mesmo comportamento foi verificado na fermentação do (HH^T), porém o tempo necessário para o consumo da glicose e da xilose foi reduzido para 25 e 125 horas, respectivamente. Comportamento semelhante ao obtido no presente trabalho, foi também observado por Bellido et al. (2011) durante o estudo da bioconversão do hidrolisado de palha de trigo por *P. stipitis* visando a produção de etanol. Os autores constataram que a glicose foi totalmente consumida nas primeiras 24 horas de fermentação e que somente após seu esgotamento foi dado inicio a assimilação de xilose, a qual foi gradualmente consumida em 168 horas.

Com relação ao etanol, nota-se que para ambos hidrolisados avaliados a concentração máxima do produto foi obtida após 89 horas de fermentação, porém no hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de malte tratado (HH^T) a produção de etanol foi cerca de 3 vezes superior aquela obtida no (HH^R), passando de 5,8 para 17,4 g/L.

O favorecimento do processo fermentativo empregando o hidrolisado do bagaço de malte previamente tratado com álcali pode ser atribuído sua capacidade em remover substâncias inibidoras do metabolismo microbiano, especialmente o ácido acético. Conforme discutido anteriormente, no presente trabalho, o tratamento alcalino foi capaz de remover eficientemente o grupamento acetil do material e como consequência, um menor nível de ácido acético foi solubilizado no hidrolisado hemicelulósico. De fato, a concentração inicial de ácido acético no hidrolisado referência foi cerca de 5 vezes superior ao obtido no hidrolisado proveniente do bagaço tratado (Tabela 5.8), demonstrando assim uma maior toxicidade do meio.

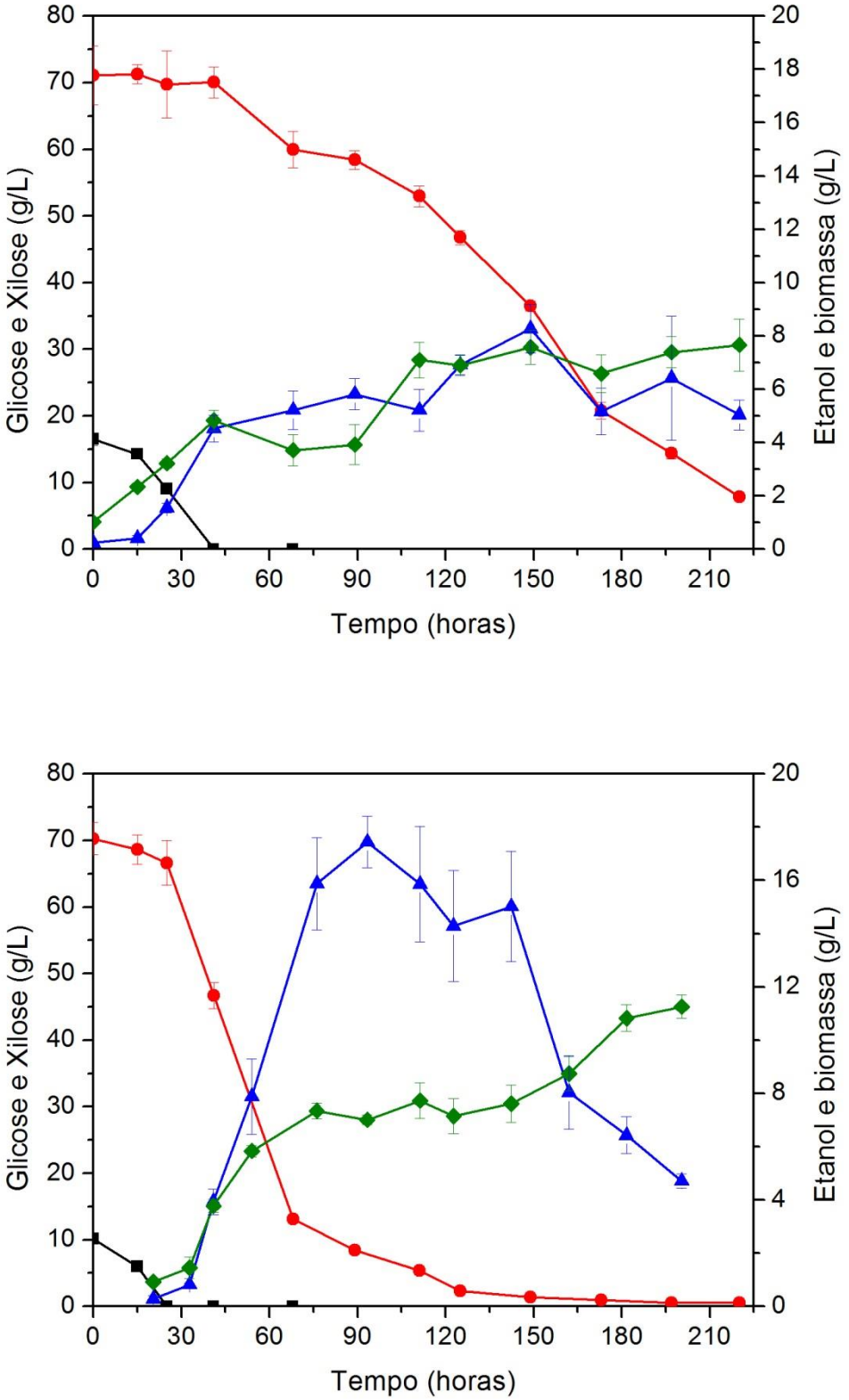


Figura 16. Perfil fermentativo de *P. stipitis* empregando: (A) hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte referência e (B) hidrolisado hemicelulósico obtido do bagaço de malte tratado com 0,63% NaOH, 66,5 °C por 20 minutos. glicose (—■—); xilose (—●—), etanol (—▲—) e biomassa (—◆—).

Tabela 5.8. Parâmetros do processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte tratado com hidróxido de sódio a 0,63% NaOH, 66,5 °C por 20 minutos (HH^T), e do hidrolisado hemicelulósico referência obtido do bagaço de malte não tratado (HH^R)

Parâmetros	Hidrolisado	
	HH^R	HH^T
Concentração inicial de acido acético (g/L)	1,80	0,35
Tempo de fermentação* (h)	89	89
Glicose consumida (%)	100	100
Xilose consumida (%)	18	88
Ácido acético consumido (%)	57	100
Etanol produzido (g/L)	5,8	17,4
Biomassa formada (g/L)	2,9	6,5
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,20	0,24
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,10	0,10
$Y_{P/X}$ (g/g)	2,0	2,4
η (%)	39	47
Q_P (g/L.h)	0,06	0,20

*tempo referente a máxima produção de etanol, $Y_{P/S}$ (g/g) = Fator de conversão de xilose em etanol; $Y_{X/S}$ (g/g) = Fator de conversão de xilose em célula; $Y_{P/X}$ (g/g) = Fator de conversão de célula em etanol; η (%) = Eficiência de fermentação; Q_P (g/L.h) = Produtividade volumétrica em etanol

Comportamento semelhante ao obtido no presente trabalho, foi constatado por Bellido et al. (2011) estudando o efeito do ácido acético na bioconversão de xilose a etanol por *Pichia stiptis* DSM 3651. A produção de etanol decresceu de 17,5 g/L para 10,4 g/L quando a concentração do ácido acético foi aumentada de 0,5 para 1,5 g/L, respectivamente. Segundo os autores, o ácido acético mesmo em baixas concentrações (0,5 g/L), causou inibição ao metabolismo fermentativo da levedura, uma vez que no meio ausente de ácido a produção de etanol atingiu 22,8 g/L. Os autores notaram também, que o consumo de xilose foi muito mais afetado por concentrações altas de ácido acético, em comparação com o consumo de glicose.

De acordo com Cho et al (2010) o crescimento celular da levedura *P. stipitis* decresceu em 24 % quando foram adicionados ao meio 0,7 g/L de ácido acético, enquanto que a produção de etanol não foi afetada. Entretanto, na

presença de 7,1 g/L de ácido acético tanto o crescimento celular quanto a produção de etanol decresceram severamente (71% e 49% respectivamente, em relação ao controle).

A partir dos resultados alcançados, pode-se concluir que o tratamento alcalino do bagaço de malte com 0,63% de NaOH a 67,6 °C afetou positivamente na bioconversão da fração hemicelulósica em etanol por *P. stipitis*, sendo esta uma estratégia eficiente para melhorar o potencial tóxico dos hidrolisados de biomassa.

6. Conclusão

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- O tratamento alcalino do bagaço de malte foi capaz de solubilizar acetato, compostos fenólicos e compostos furanos em todas as concentrações de hidróxido de sódio avaliadas, e não foi observada solubilização de açúcares.
- A solubilização de acetato, compostos fenólicos e furanos no licor alcalino foi favorecida nas maiores concentrações de hidróxido de sódio avaliadas (0,5% a 2%) mostrando a maior taxa de reação nos primeiros 20 min.
- A composição do bagaço de malte foi alterada após o tratamento alcalino, aumentando de 25 para 41% a proporção de hemicelulose, e de 16 para 26% a proporção de celulose na biomassa.
- Para todas as condições avaliadas, o tratamento alcalino do bagaço de malte reduziu a concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico. A menor concentração (0,026 g/L) foi obtida após 20 minutos de tratamento com 2% de NaOH.
- O perfil de solubilização de acetato no licor alcalino foi inversamente proporcional ao de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico.
- Para todas as condições avaliadas, o tratamento alcalino do bagaço de malte reduziu o nível de glicose e aumentou a liberação de arabinose no hidrolisado hemicelulósico. Entretanto, a concentração xilose foi favorecida apenas na concentração de 0,5% de NaOH. Nestas condições, o tratamento alcalino afetou o rendimento de hidrólise da hemicelulose, sendo o aumento da concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico (~ 33%) atribuído ao aumento do teor de hemicelulose no bagaço de malte tratado.
- Sob condições otimizadas (concentração de NaOH de 0,63%, temperatura de 67,6°C e tempo de 20 min), o tratamento alcalino do bagaço de malte promoveu uma redução de 90% na concentração de ácido acético, concomitante ao aumento de 4,5% e 15% na concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico e concentração de glicose no hidrolisado celulósico, respectivamente.
- A sacarificação enzimática da celulignina obtida do bagaço de malte tratado nas condições otimizadas foi favorecida em 20,8% com base na concentração de glicose, em comparação com a referência.

- O processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) empregando o bagaço de malte submetido ao tratamento alcalino nas condições previamente otimizadas foi à estratégia mais indicada para a produção de etanol empregando a levedura termotolerante *K. marxiaus* KRRL Y-6860. Nesta configuração a produtividade volumétrica em etanol foi cerca de 2,2 vezes maior em comparação a fermentação e sacarificação em separado (SHF).
- O tratamento alcalino do bagaço de malte nas condições otimizadas afetou positivamente a bioconversão da fração hemicelulósica em etanol por *P. stipitis*, sendo esta uma estratégia eficiente para melhorar o potencial tóxico dos hidrolisados de biomassa, especialmente com relação ao ácido acético.
- Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a etapa de tratamento alcalino do bagaço de malte, provavelmente promoveu mudanças estruturais na celulignina aumentando a liberação de glicose no hidrolisado e ainda foi capaz de remover substâncias inibidoras do metabolismo microbiano, especialmente o ácido acético, favorecendo o processo fermentativo da fração hemicelulósica.

Referências

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **Journal of Biotechnology**, v.10; n. 3, p. 324-331, 2011.

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, n. 3, p. 1-16, 2011.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p. 858-875, 2011.

BALLESTEROS, I.; OLIVA, J.; NAVARRO, A. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. **Applied Biochemistry**, v. 84, p. 97–110, 2000.

BARAKAT, A.; MONLAU, F.; STEYER, J.; CARRERE, H. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 90–99, 2012.

BARAKAT, A.; MONLAU, F.;STEYER, J.; CARRERE, H. Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. **Bioresource Technology**, v.104, p. 90-96, 2012.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis.* **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10868-10874, 2011

CAO, W.; SUN, C.; LIU, R.; YIN, R.; WU, X. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource technology,** v. 111, p. 215–21, 2012.

CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Fuel,** v. 87, n.6, p.692–700, 2008

CHEN, X.; SHEKIRO, J.; ELANDER, R.; TUCKER, M. Improved Xylan Hydrolysis of Corn Stover by Deacetylation with High Solids Dilute Acid Pretreatment. **Industrial e Engineering Chemistry Research**, v. 51, n.1, p.70–76, 2012.

CHEN, X.; SHEKIRO, J.; FRANDEN, M. A.; WANG, W.; ZHANG, M.; KUHN, E.; JOHNSON, D. K. The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for biofuels,** v. 5, n. 1, 2012.

CORTEZ, D; ROBERTO, I.C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1858-1865, 2010.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* , *Zymomonas mobilis* , *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and microbial technology**. 19, p. 220–225, 1996.

DU, B.; SHARMA, L. N.; BECKER, C.; CHEN, S.-F.; MOWERY, R.A, VAN WALSUM, G. P.; CHAMBLISS, C. K.. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, p. 430-440, 2010.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastruture, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

GARCIA-APARICIO, M.P.; OLIVA, J.M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A; NEGRO, M.J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**, v.90, p.1624-1630, 2011.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G. van; FAAIJ A.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short- , middle- and long-term, **Biomass and Bioenergy**, v. 28; p. 384-419, 2005

HENDRIKS, A T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n.1, p.8-10, 2009

HSU, T.C.; GUO, G.L.; CHEN, W.H.; HWANG, W.S Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology,** v. 101, n.13, p. 4907–4913, 2010.

JORDAN, D. B.; BRAKER, J. D.; BOWMAN, M. J.; VERMILLION, K. E.; MOON, J.; LIU, Z. L. Kinetic mechanism of an aldehyde reductase of *Saccharomyces cerevisiae* that relieves toxicity of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 12, p. 1686–1694, 2011.

KLINKE, H. B.; GARCI, L.; THOMSEN, A.B. Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion, **Holzforschung** v. 61, p. 483–487, 2007.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2:11, p. 1-10, 2009

KUMAR, D.; MURTHY, G.S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 27, 2011

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, **Industrial e Engineering Chemistry Research ,** v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009

KUMAR, S.; KOTHARI, U.; KONG, L.; LEE, Y. Y.; GUPTA, R. B. Hydrothermal pretreatment of switch grass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. **Biomass and Bioenergy**, v. 35 n. 2, p. 956–968. 2011.

KWON, Y.; MA, A.; LI, Q.; WANG, F.; ZHUANG, G.; LIU, C. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresource Technology,** v. 102, n.17, p. 8099–8104, 2011

LEE, J. M.; SHI, J.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H. Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. **Bioresource Technology,** v. 100, n.24, p. 6434–6441, 2009.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource technology,** v. 98, n.16, p. 3061–3068. 2007

MATHEW, A. K.; CHANEY, K.; CROOK, M.; HUMPHRIES, A. C. Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption. **Bioresource technology**, v. 102, n. 11, p. 6547–53. 2011.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Ferulic Acid : An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications, **Critical reviews in Biotechnology** v. 24, p. 59–83, 2004

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry, **In vitro celullar e developmental biology-plan**t , v. 45, n.3, p. 372–381. 2009

MILLS, T. Y.; SANDOVAL, N. R.; GILL, R. T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*, **Biotechnology for Biofuels**, v.11, p. 2-26, 2009.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource technology**, v. 96, n.18, p. 1986–1993, 2005

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p 673–86. , 2005

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 85, n. 14, p. 2453–2460, 2005

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 85, n. 14, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology Biotechnology,** v. 8, n.3, 268–274. 2006.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology Biotechnology,** v. 81, n. 3, 268–274, 2006.

MUSSATTO, S.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos. **Industrial Crops and Products,** v. 25, p. 231-237, 2007.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.

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

OKUR, M. T.; SARAÇOGLU, N. E. Ethanol Production from Sunflower Seed Hull Hydrolysate by *Pichia stipitis* under Uncontrolled pH Conditions in a

Bioreactor, **Turkish Journal Engineering Environmental Sciences,** v.30, 317–322, 2006.

OLIVA, M.; NEGRO, J.; SA, F.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; GONZA, A. Effects of acetic acid , furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*, **Process Biochemistry,** v. 41, p.1223–1228 , 2006.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels,** v. 1, n. 7, p. 1-14, 2008.

PALMQVIST, E. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II : inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p.25–33, 2000.

PAMPULHA, M. E, LOUREIRO-DIAS, M. C.. Energetics of the action of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*, **Biotechnology for Biofuels,** v. 184, p.69–72, 2000

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; LIGNOS, G. D.; BAKKER, R. R.; KOUKIOS, E. G. Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Journal of Cleaner Production**, v. 32, p.45–51, 2012

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G; ANNA, L. M. M. S., **Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production and the Context of Biorefinery**, 2008.

REDDING, A. P., WANG, Z., KESHWANI, D. R.,CHENG, J. J.. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology,** v. 102, n.2, p. 1415–1424 , 2011

REINOLD, M.R. **Manual prático de cervejaria**, São Paulo: ADEN Editora e Comunicações, 1997. 214p.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels, **Nature,** v. 454, p.841–845, 2008.

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and microbial technology**, v. 42, n. 2, p.160–6, 2008

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J.J.; BARTOLOMÉ, B; GÓMEZ-CORDOVÉS, C; DEL NOZAL, M.J. Variability of brewer's spent grain within a brewery, **Food chemistry**; v. 80, p. 17–21, 2003.

SILVA, J; MUSSATTO, S.; I.; ROBERTO, I; C; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, p. 259-265, 2012

SINGH, P., SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, 2011

SÖDERSTRÖM, J., PILCHER, L., GALBE, M., ZACCHI, G.. Two-step steam pretreatment of softwood with SO_2 impregnation for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 5, p. 98-100, 2002.

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

SUN, Y.; CHENG, J. J.; Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production. **Bioresource technology,** v.96, n. 14, p.1599–606, 2005

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDN, G. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 15, p. 2653-2659, 1997

TRAN CHAMBERS. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776, **Bioresource technology,** v. 8, p.439–444, 1986

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e Cervejarias. A História, a arte e a Tecnologia**, I ed. São Paulo: Aden Editora e Comunicações Ltda, 2001, 233p.

VÁSQUEZ, M. P. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation, **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 136, p. 141-153, 2007.

WANG, L.; LUO, Z.; SHAHBAZI, A., Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 280-291, 2013

WYMAN, C. E.. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol, **Trends on Biotechnology** v. 25, n.4, 2007

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of Selected Aldehydes on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering,** v. 65, n. 1, p. 10-33, 1999

ZHAO, Xu.; ZHOU, Y.; LIU, D. Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.105, p.160-168, 2012.

ZIMBARDI, F.; VIOLA, E.; NANNA, F.; LAROCCA, E.; CARDINALE, M.; BARISANO, D. Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. **Industrial Crops and Products,** v. 26, n.2, p. 195–206, 2007