**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

ADRIANA DILON FERREIRA

**Produção eficiente de Etanol 2G a partir de hidrolisado
hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimizando
condições de cultivo e operacionais**

Lorena-SP

2016

ADRIANA DILON FERREIRA

**Produção eficiente de Etanol 2G a partir de hidrolisado
hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimizando
condições de cultivo e operacionais**

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração: Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão original

Lorena-SP

2016

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Adriana Dilon
Produção eficiente de Etanol 2G a partir de
hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar:
otimizando condições de cultivo e operacionais /
Adriana Dilon Ferreira; orientador Prof. Dr. Silvio
Silvério Silva - Versão Original. - Lorena, 2016.
153 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério Silva

1. Etanol. 2. Scheffersomyces stipitis. 3.
Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.
4. Fermentação . 5. batelada alimentada. I. Título.
II. Silva, Prof. Dr. Silvio Silvério , orient.

Dedico a minha família, meus pais Marly e José Maria (in memorian), exemplos de pessoas dedicadas, as minhas queridas irmãs, Andréia e Lílian, sobrinhos Aron e Alec, por fazerem parte da minha vida. A você Felipe, meu filho querido, com todo meu amor, que sirva de inspiração e exemplo para seguir em frente, apesar das dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça dessa conquista e a Nossa Senhora por interceder quando mais necessito.

A todos da minha família por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pela oportunidade e privilégio de fazer parte de sua equipe ao longo dessa trajetória de conhecimento e aprendizado que foi o doutorado. Procuramos palavras perfeitas ou pelo menos combinações que definam as pessoas como elas são, porém existem pessoas cuja palavra ou gesto jamais serão suficientes para demonstrar o quanto se tornaram queridas em nossa vida. Diante disso, a mera tentativa de registrar minha gratidão não será suficiente para expressar minha admiração e respeito.

A todo corpo docente do Departamento de Biotecnologia (LOT), pelos conhecimentos compartilhados, e apoio principalmente dos Prof.(s) Dr(s) Júlio, Inês, Marcus, Adriane e Rita. Um agradecimento especial à Prof.^a Dr^a. Maria das Graças que me adotou em seu laboratório, bem como toda a sua equipe. Aos queridos Prof.(s) Dr.(s) Arnaldo Márcio, Elisângela (Lili), que além do conhecimento, fizeram a hora do almoço mais alegre para enfrentar o dia a dia.

Aos funcionários dos laboratórios, parte administrativa, biblioteca, oficina, portaria, limpeza, pela boa vontade, ajuda, e convivência diária. Especialmente Paulinho, Nicamor, Djalma, Cibele, Fabrício e Bárbara, Zé Cobrinha, Nadir, Walkíria, André, Isnaldi, Joel e Regina Horta pela atenção e boa vontade de sempre. As queridas meninas da CPG, Sandra, Cida e Ana, sempre prestativas e dispostas a ajudar.

Aos amigos do laboratório Rafael, Sabrina, Wagner, Bruna Caroline, Javier, Matheus Soler, Leyanis, Felipe, Swapnil, Said, Ruly, pelos conhecimentos compartilhados, colaboração e convivência. Especialmente Larissa Brumano e Paulo Marcelino obrigada pela ajuda e amizade.

A **TODOS** os amigos e colegas que fiz no Departamento de Biotecnologia (LOT) e foram muitos.... pela colaboração, convivência e amizade.

As minhas amigas especiais Kelly e Débora, por todo apoio, conhecimento compartilhado, amizade verdadeira - vocês estarão sempre em meu coração. As queridas Raquel, Martha, que, mesmo de longe, sempre esteve torcendo por mim.

A querida amiga Renata pela amizade, convivência, risadas e pelas palavras amigas.

A amiga Nicole, com a qual, em tão pouco tempo de convivência, conseguimos criar uma amizade que vou levar para sempre - obrigada por tudo, pelo apoio, amizade e carinho

A amiga Marcília, que, mesmo estando longe sempre me salvou quando mais precisei.

Aos amigos de JF, importantes para mim nessa caminhada, especialmente Matheus Dillon, Beto, tia Deize, Dorinha, Sr. Araújo, Carlos, Leandra, Fátima, sempre me ajudando com tudo, incentivando e apoiando com palavras amigas.

Ao Departamento de Biotecnologia – Debiq – EEL da Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade da realização do Doutorado.

Todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Ferreira, A. D. **Processo eficiente de produção de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar:** otimização condições de cultivo e operacionais 2016. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

No Brasil, vários grupos de pesquisa vêm se empenhando em desenvolver estratégias que visam ao aproveitamento da biomassa vegetal, principalmente biomassa de cana-de-açúcar, para a produção de etanol de segunda geração (2G), o que coloca o País numa posição de destaque no cenário internacional, na busca por alternativas para a produção de energia de forma sustentável e economicamente competitiva. Dentro deste contexto, este trabalho avaliou a obtenção de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, pela determinação das melhores condições de suplementação do meio de cultivo e das condições operacionais em processo descontínuo e descontínuo alimentado. Na etapa de estabelecimento da suplementação do meio de cultivo foi empregado um planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central e um planejamento de mistura. As melhores condições foram (2,0 g/L) extrato de levedura, (0,5 g/L) fosfato de potássio, (0,5 g/L) peptona, (0,5 g/L) sulfato de magnésio e (0,01 g/L) sulfato de zinco. Quanto ao estabelecimento das condições operacionais $pH_{inicial}$, agitação e vazão de ar em biorreator, utilizou-se um planejamento central composto rotacional com três repetições no ponto central. As melhores condições encontradas foram $pH_{inicial}$ 6,0, agitação 225 rpm e aeração 0,45 vvm obtendo-se um fator de conversão em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,23 g/g e produtividade (Q_P) de 0,18 g/L/h. Posteriormente foram realizados processos de fermentação descontínua e descontínua alimentada empregando-se as melhores condições definidas. No processo descontínuo, observou-se a produção de 9,94 g/L de etanol, correspondendo a valores de Q_P de 0,28 g/L/h, enquanto a utilização do processo descontínuo alimentado resultou em favorecimento de 37,3%, 75% nos valores de etanol formado (13,75 g/L), Q_P (0,49 g/L/h), respectivamente. Os resultados indicaram que um meio de cultivo suplementado com adição de poucos nutrientes aliado ao emprego de fermentação em modo descontínuo alimentado é uma estratégia promissora para a produção de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Palavras-chave: Etanol. *Scheffersomyces stipitis*. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação. Batelada alimentada.

ABSTRACT

Ferreira, A. D. **An efficient process of 2G ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate:** optimizing cultivation and operational conditions 2016. 153p. Thesis (Doctoral of Science) - Lorena School of Engineering, University of São Paulo, Lorena, 2017.

In Brazil, research groups have been striving to develop strategies aimed at the use of plant biomass, and second generation ethanol has made the country a leader in this area. Energy and sustainability solutions are key to making this technology more competitive to meet the growing demand for biofuels. In this work, the acquisition of 2G ethanol from sugarcane hemicellulose hydrolyzate in culture medium optimized by *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 yeast residue was evaluated. Simple batch and fed batch operational conditions were evaluated for use in bioprocesses. Experiments were performed in Erlenmeyer flasks with medium containing sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate, which was detoxified using the yeast *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, in order to optimize the culture medium according to a fractional factorial design of 2^{9-5} , with three repetitions at the midpoint, and a mix plan. The best optimized conditions were yeast extract (2.0 g/L), potassium phosphate (0.5 g/L), peptone (0.5 g/L), magnesium sulfate (0.5 g/L) and zinc sulfate (0.01 g/L). Soon after, pH_{inicial} variables, agitation, and air flow rate were optimized in the bioreactor using a central composite rotational design with three repetitions at the midpoint. The best conditions were found with pH_{inicial} at 6.0, agitation at 225 rpm and aeration at 0.45 vvm, which obtained a $Y_{P/S}$ of 0.23 g/g and a Q_P of 0.18 g/L/h. The performance of *Scheffersomyces stipitis* yeast in a discontinuous fed-batch process with optimized conditions were also evaluated. In the process, the simple batch reached a 9.94 g/L ethanol production a Q_P of 0.28 g/L/h. While yeast performance in the fed-batch process was resulted in improvement 37.3%, 75% ethanol formed values (13.75 g/L), and productivity (0.49 g/L/h), respectively. The results indicated that the culture medium supplemented with addition of a few nutrients together with the use of fermentation in fed-batch is a promising for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate.

Key words: Ethanol. *Scheffersomyces stipitis*. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate. Fermentation. Fed-batch.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Representação esquemática de uma biorrefinaria no conceito de duas plataformas -----	29
FIGURA 2.2 Estrutura de uma fibra vegetal -----	35
FIGURA 2.3 Estrutura de uma molécula de celulose-----	36
FIGURA 2.4 Representação esquemática do suporte principal da hemicelulose das plantas -----	38
FIGURA 2.5 Álcoois P-cumaril, coniferil e sinapil: blocos dominantes na lignina tridimensional-----	39
FIGURA 2.6 Biomassa da cana-de-açúcar -----	40
FIGURA 2.7 Produção de uma típica usina brasileira de açúcar-----	41
FIGURA 2.8 Esquema do Pré-tratamento em material lignocelulósico-----	43
FIGURA 2.9 Tipos de pré-tratamento-----	44
FIGURA 2.10 Metabolismo de xilose por leveduras (esquema simplificado) -----	50
FIGURA 2.11 Microfotografia da Levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124 obtida por microscopia eletrônica de varredura aumentada 5.000 vezes -----	51
FIGURA 2.12 Classificação geral dos biorreatores -----	60
FIGURA 4.1 Biorreator de bancada com capacidade total de 1 litro New Brunswick Scientific Co. USA, modelo Multigen-----	74
FIGURA 4.2 - Biorreator agitado – STR capacidade total de 2,4 L empregado no processo de obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando as leveduras <i>Scheffersomyces stipitis</i> . -----	76
FIGURA 4.3 - Biorreator agitado – STR capacidade total de 2,4L em Batelada alimentada empregado no processo de obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando as leveduras <i>Scheffersomyces stipitis</i> . -----	76
FIGURA 4.4 – Fluxograma de trabalho para produção de etanol 2G a partir de HMBCA com as condições definidas -----	87
FIGURA 5.1 - Concentrações de etanol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> após 96 h de fermentação de acordo com o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central -----	92
FIGURA 5.2 Consumo de açúcares durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> após 96 h de fermentação de acordo com o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central -----	92

FIGURA 5.3 Crescimento Celular durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> após 96 h de fermentação de acordo com o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central -----	95
FIGURA 5.4 Estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) por meio do gráfico de Pareto da variável resposta conversão de açúcares em etanol (YP/S) de acordo o planejamento fatorial fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central -----	97
FIGURA 5.5 Gráficos de efeitos principais para o fator YP/S de acordo com o planejamento fatorial fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central de acordo com as condições estabelecidas na Tabela 4.2 -----	98
FIGURA 5.6 Crescimento celular, concentração de açúcares e produção de etanol, nos Ensaio fermentativos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 do planejamento fatorial para estudo da influência das variáveis: extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	99
FIGURA 5.7 Consumo de açúcares durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> após o tempo final de fermentação de 96 h de acordo com o planejamento de Mistura -----	101
FIGURA 5.8 Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis significativas no nível de confiança de 95% para a variável resposta produtividade em etanol (Q_P) de acordo o planejamento de mistura -----	105
FIGURA 5.9 – Curva de contorno do planejamento de mistura para a produtividade em etanol (Q_P) -----	106
FIGURA 5.10 Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●), dos Ensaio fermentativos 1, 2, 3, 4 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $pH_{inicial}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	109
FIGURA 5.11 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●), nos Ensaio fermentativos 5, 6, 7, 8 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $pH_{inicial}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	110
FIGURA 5.12 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●), nos Ensaio fermentativos 9, 10, 11, 12,13 e 14 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $pH_{inicial}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> .-----	112

FIGURA 5.13 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●), nos Ensaios fermentativos 15, 16, 17, 18 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e pH _{inicial} na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> .-----	113
FIGURA 5.14 Superfície de resposta para a produtividade volumétrica em etanol em função das variáveis codificadas agitação e aeração para o processo de produção de etanol a partir de HHBCA pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> em biorreator de bancada de 1L (Multigen) -----	115
FIGURA 5.15 –Superfície de resposta para resposta produtividade em função da agitação e pH _{inicial}	116
FIGURA 5.16. –Superfície resposta para resposta produtividade em função da aeração e do pH inicial -----	117
FIGURA 5. 17 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●) para o processo descontínuo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador de 2,4 L. -----	119
FIGURA. 5.18- Velocidade instantânea de consumo de substrato para o processo descontínuo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico usando a levedura <i>S. stipitis</i> . -----	120
FIGURA 5.19 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●) para o processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH _{inicial} 6,0 com volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h. (A) Processo fermentativo completo até 72 h (B) Processo descontínuo alimentado das 48 às 60h. -----	121
FIGURA 5.20 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●) para o processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH _{inicial} 6,0 com volume inicial de meio 800 mL e vazão de alimentação 0,0685 L/h. (A) Processo fermentativo completo até 72 h (B) Processo descontínuo alimentado das 48 às 60h. -----	121
FIGURA 5.21 - Concentração de células (▲), concentração de açúcares (■) e produção de etanol (●) para o processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH _{inicial} 6,0 com volume inicial de meio 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h. (A) Processo fermentativo completo até 72 h (B) Processo descontínuo alimentado das 48 às 60h. -----	122

FIGURA 5.22 - Morfologia celular de *Scheffersomyces stipitis* após 50h de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH_{inicial} 6,0. (A) Descontínuo Alimentado com volume inicial de meio 500mL e vazão 0,0833L/h; (B) Descontínuo Alimentado com volume inicial de meio 800mL e vazão 0,0685 L/h; (C) e (D) Descontínuo Alimentado com volume inicial de meio 1000mL e vazão 0,042L/h; (E) Descontínuo sem alimentação. As células foram fotografadas em aumento de 100x ----- 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Gerações de Biocombustíveis -----	27
Tabela 2.2 – Composição química de diferentes tipos de biomassa Lignocelulósica-----	35
Tabela 2.3 Exemplos de Leveduras fermentadoras de pentoses e suas Características -----	49
Tabela 2.4 - Produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos suplementados com diferentes nutrientes por diferentes linhagens de <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	57
Tabela 4.1 – Níveis codificados para as variáveis $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $FeCl_3$, $CaCl_2$, Ureia, Extrato de Levedura, Peptona, $(NH_4)_2SO_4$ para estudo da influência destes nutrientes na produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	72
Tabela 4.2 - Matriz do planejamento de mistura para o estudo da influência das variáveis extrato de levedura (E.L.), peptona e fosfato de potássio (KH_2PO_4), em níveis codificados e reais, na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	73
Tabela 4.3 – Níveis codificados para o estudo da influência das variáveis agitação, aeração e pH inicial na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de bancada com capacidade nominal de 1 litro -----	75
Tabela 4.4 – Parâmetros operacionais utilizados no processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada-----	77
Tabela 5.1 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar -----	88
Tabela 5.2 - Caracterização química do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) obtido do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (Hidrolisado original), hidrolisado concentrado a vácuo e hidrolisado destoxificado.-----	89
Tabela 5.3 –Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{9-5} obtidas a partir do estudo da influência da suplementação nutricional, após 96 h da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	96

Tabela 5.4 - Análise de variância dos fatores sobre a conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$)-----	98
Tabela 5.5 – Matriz do planejamento de misturas obtidas a partir do estudo da influência da suplementação nutricional na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	103
Tabela 5.6- Resultados obtidos utilizando as condições definidas do planejamento de mistura para o estudo da influência da suplementação nutricional na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> -----	107
Tabela 5.7- Matriz do planejamento central composto rotacional 2^3 com quatro repetições no ponto central para estudo da influência das variáveis $pH_{inicial}$, aeração e agitação na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> tendo como variáveis resposta $Y_{P/S}$ e Q_P . -----	108
Tabela 5.8 - Análise de variância dos fatores sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) -----	114
Tabela 5.9 Resultados obtidos utilizando as condições definidas do planejamento Central Composto obtidos durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por <i>S. stipitis</i> em Fermentador STR Bioengineering no processo de Batelada com agitação 225 rpm, aeração 0,45 vvm e $pH_{inicial}$ 6,0.-----	118
Tabela 5.10 - Resultados obtidas durante o estudo do processo descontínuo alimentado na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $pH_{inicial}$ 6,0, volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h.-----	124
Tabela 5.11 - Resultados obtidas durante o estudo do processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $pH_{inicial}$ 6,0, volume inicial de meio 800 mL e vazão de alimentação 0,0685 L/h -----	124
Tabela 5.12 – Resultados obtidas durante o estudo do processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $pH_{inicial}$ 6,0, volume inicial de meio 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h -----	125
Tabela 5.13 - Resultados comparativos entre o estudo do Processo descontínuo e Processo descontínuo alimentado obtidos durante a fermentação para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura <i>S. stipitis</i> em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $pH_{inicial}$ 6,0, volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h.-----	126

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS	27
2.2 APROVEITAMENTO DA BIOMASSA NA CONCEPÇÃO DE BIORREFINARIA	29
2.3 ETANOL: O PRINCIPAL BIOCOMBUSTÍVEL	30
2.3.1 Panorama do Etanol de segunda geração no Brasil e no Mundo	30
2.3.2 Mercado Mundial e Brasileiro de Etanol	31
2.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	34
2.4.1 Celulose	36
2.4.2 Hemicelulose	37
2.4.3 Lignina	38
2.5 O BAGAÇO DE CANA-DE AÇÚCAR	39
2.5.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	42
2.5.2 Pré-tratamento ácido diluído	44
2.5.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico	46
2.6 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOETANOL	47
2.6.1 Metabolismo de xilose assimilado por leveduras	49
2.6.2 A levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRLY-7124	50
2.6.3 Suplementação nutricional do meio de cultura	52
2.7 BIORREACTORES E PROCESSOS FERMENTATIVOS	59
2.7.1 Processo Fermentativo em Regime de Batelada Alimentada	61
3 OBJETIVOS	66
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	67
4.1.1 Matéria-prima	67
4.1.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar	67

4.1.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar: hidrólise ácida -----	69
4.1.4 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar -----	70
4.1.5 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar -----	70
4.2 PROCESSO FERMENTATIVO -----	71
4.2.1 Micro-organismo -----	71
4.2.2 Preparo do inóculo -----	71
4.2.3 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol pela levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124-----	71
4.2.4 Fermentação em biorreatores de bancada do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>S. stipitis</i> usando diferentes regimes de fermentação -----	74
4.2.4.1 Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em Fermentadores de Bancada-----	74
4.2.4.2 Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em Fermentador STR em batelada alimentada -----	77
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS -----	78
4.3.1 Determinação da concentração celular -----	78
4.3.2 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, etanol, furfural e 5- hidroximetilfurfural -----	78
4.3.3 Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa)-----	79
4.3.4 Determinação do pH -----	80
4.3.5 Determinação da concentração de fenóis -----	80
4.3.6 Determinação dos Parâmetros Fermentativos para processos descontínuos -----	80
4.3.6.1 Fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$, $g_{\text{etanol}}/g_{\text{xilose} + \text{glicose}}$)80	
4.3.6.2 Eficiência de conversão de xilose em etanol ($\eta\%$) -----	81
4.3.6.3 Produtividade volumétrica em etanol (QP , $g_{\text{etanol}}/L/h$) -----	81
4.3.6.4 Fator de rendimento de açúcares em biomassa ($Y_{X/S}$, $g_{\text{biomassa}}/g_{\text{xilose}}$)81	
4.3.6.5 Modelo cinético -----	82

4.3.7. Determinação dos parâmetros fermentativos no processo de batelada alimentada	82
4.3.7.1 Volume do meio	82
4.3.7.2 Modelo para célula	82
4.3.7.3 Modelo para Substrato	83
4.3.7.4 Modelo para Produto	84
4.3.7.5 Fator de conversão de açúcares em etanol	84
4.3.7.6 Fator de rendimento de açúcares em biomassa	85
4.3.7.7 Produtividade global em etanol	85
4.3.8 Viabilidade e pureza da cultura	86
4.3.9 Fluxograma do Trabalho	86
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	88
5.2 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	89
5.3 Processo Fermentativo	91
5.3.1 Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura para a levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	91
5.3.2 Efeito do pH inicial, aeração e agitação na produção de etanol em biorreator agitado- STR utilizando a levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	107
5.3.3 Estudo do processo em batelada alimentada da produção de etanol utilizando a levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124 em biorreator agitado- STR de 2,4 L (Bioengineering)	119
6 CONCLUSÕES	130
7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	131
REFERÊNCIAS	132

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com a crise energética causada pelo aumento do uso dos combustíveis fósseis e problemas ambientais como acúmulo de gases causadores do efeito estufa, países em todo mundo têm buscado novas fontes de energia, especialmente às obtidas de biomassa limpa e renovável (SARKAR et al., 2012; CHEN; LI, 2013).

Desta forma, há o interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos renováveis e sustentáveis visando também a obtenção de outros produtos o que tem pressionado a indústria química para investir em novos meios para obter os mesmos produtos de forma mais sustentável e econômica (PAES; ALMEIDA, 2014).

O aumento do uso de recursos como a biomassa lignocelulósica reduz a dependência pelo petróleo, sendo uma importante contribuição para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável, promovendo a diminuição da emissão de gases do efeito estufa, mudanças climáticas, e outros fatores. (RAGAUSKAS et al., 2006).

Várias políticas de apoio à produção e utilização de biocombustíveis nos transportes foram globalmente estabelecidas nas últimas décadas (SORDA; BANSE; KEMFERT, 2010; LAMERS et al., 2011; POSADA et al., 2013), a fim de promover a independência energética e diminuir os impactos ambientais negativos causados pelo uso convencional de combustíveis fósseis (como por exemplo, gasolina, diesel). Estima-se que em 2025, 15 % do mercado global da indústria química será bio-derivado (PAES; ALMEIDA, 2014).

Os materiais lignocelulósicos são fonte de matéria-prima para a produção de etanol, e diversos outros produtos, por meio da bioconversão (MOSIER et al., 2005). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, gerando assim milhões de toneladas de bagaço anualmente. A matéria-prima é abundante, barata e facilmente encontrada, o que é um incentivo para seu aproveitamento, conduzindo a produção de energia sustentável com melhores desempenhos ambientais, econômicos e sociais (RODRIGUES, 2011).

O bioetanol produzido a partir da fermentação de carboidratos como, por exemplo, sacarose e amido é chamado de etanol de primeira geração (1G), enquanto o álcool produzido a partir de materiais lignocelulósicos é chamado de etanol de segunda geração (2G) (QUINTERO; RINCÓN; CARDONA, 2011).

Estudos demonstram grande potencial para essa biomassa em diversos campos. Este tema vem hoje acompanhado do conceito de “biorrefinarias”, que são semelhantes a refinarias de petróleo, em concepção, entretanto utilizam material biológico em oposição às fontes fósseis, permitindo a coprodução de combustíveis, compostos químicos, eletricidade e calor (SANTOS et al., 2012).

Potencialmente as biorrefinarias industriais têm sido identificadas como rotas promissoras para a criação de um novo segmento industrial com base em matérias-primas renováveis (SANTOS et al., 2012).

Outro avanço para o futuro sustentável vem sendo a redescoberta da alcoolquímica. De acordo com Bastos (2007) futuramente, a alcoolquímica poderá substituir à petroquímica e o etanol poderá assumir o lugar do petróleo como fonte de matérias-primas, provavelmente por razões econômicas. Este setor vem recebendo investimentos em pesquisa e desenvolvimento principalmente no etanol lignocelulósico em vários países da União Europeia e EUA (SILVA et al., 2012) .

Neste contexto, a utilização do bagaço da cana, bem como outros materiais lignocelulósicos, tem sido apontada como uma alternativa para aumentar significativamente a produção de etanol. Os biocombustíveis são “carbono neutro”, o que significa que o carbono produzido durante combustão é consumido pelas plantas para a síntese orgânica (REYES-ORTIZ et al., 2013).

O processo de fotossíntese pode ser resumido em poucos passos. As plantas verdes utilizam a energia do sol, convertendo-a de energia dos fótons em energia química. Esta energia é utilizada, em parte, para sintetizar todos os hidratos de carbono que constituem a matéria vegetal (REYES-ORTIZ et al., 2013).

Apesar da conversão de biomassa em biocombustíveis se apresentar simples, não obstante, a natureza complexa da estrutura da biomassa apresenta alguns desafios como o pré-tratamento, tempo de fermentação e custo da produção do etanol de segunda geração.

A hidrólise ácida do bagaço, método comumente empregado para separação da sua fração hemicelulósica, libera um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares fermentescíveis (HHBC), com predominância da pentose D-xilose. Entretanto, além de liberar a xilose, o pré-tratamento também libera substâncias que podem atuar como inibidores de micro-organismos, como aldeídos, furanos e ácidos alifáticos, que são produtos de degradação de carboidratos, e os compostos fenólicos, que são derivados da lignina (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; a; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; GÍRIO et al., 2010; JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Desta forma, o hidrolisado necessita passar por uma etapa de destoxificação por tratamentos biológicos, físicos e/ou químicos como métodos isolados ou combinados que permita a redução destes compostos tóxicos sem a perda de açúcares fermentescíveis (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; a; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; GÍRIO et al., 2010; JONSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

A produção de etanol por via fermentativa a partir da xilose é influenciada por diversos fatores como a concentração de substrato e células, suplementação nutricional, aeração, pH inicial e agitação, os quais exercem influência sobre o metabolismo microbiano. (INLOES et al., 1983; NAJAFPOUR; YOUNESI; KU ISMAIL, 2004; LIN, Y.; TANAKA, S., 2006; BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Outro desafio da fermentação é a busca por micro-organismos fermentadores de pentose, uma vez que se faz necessária a eficiente e integral conversão deste carboidrato potencial oriundo de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar.

Dentre estes micro-organismos a levedura *Scheffersomyces stipitis* destaca-se por ser uma das melhores produtoras de etanol a partir de xilose e por apresentar vantagens para processo em escala industrial (PEREIRA JR., 1991; OLIVEIRA, 2010).

Para aplicações em grande escala, o processo fermentativo necessita estar bem estabelecido. Na tentativa aumentar a produtividade a condução do processo fermentativo é muito importante.

O sistema descontínuo alimentado tem sido empregado para se obter alta concentração celular, alta produtividade além de permitir controlar os níveis de

nutrientes ou catabólitos no biorreator para se obter os níveis desejados do produto. Permite também, obter taxas de formação de produto com baixa taxa de crescimento (SCHMIDELL; FACCIOOTTI, 2001).

O estabelecimento de metas para o aumento do consumo de bioetanol nos próximos anos, principalmente nos países desenvolvidos, requer um aumento da produção de etanol e para isso políticas públicas de incentivo a tecnologia e a pesquisa para que o etanol de segunda geração se torne comercialmente competitivo se fazem necessárias. (MILANEZ et al., 2015).

Neste trabalho estudou a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, avaliando as melhores condições de suplementação do meio de cultivo e condições operacionais em processo descontínuo e descontínuo alimentado contribuindo para obtenção novos conhecimentos nesta linha de pesquisa científica colaborando para melhoria na produtividade e redução custos de produção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Os biocombustíveis podem ser classificados conforme a matéria-prima e tecnologia utilizadas em seus processos de produção (DEMIRBAS, 2009). Na Tabela 2.1. são indicadas: três gerações de biocombustíveis, as suas matérias-primas e exemplos de tipos de produtos obtidos. Os processos de conversão podem ser químicos (ex. esterificação de ácidos graxos ou a transesterificação dos triglicerídeos ao biodiesel) ou bioquímicos (ex. fermentação do caldo de cana-de-açúcar ao bioetanol) (DEMIRBAS, 2009; ESCOBAR et al., 2009; NAIK et al., 2010).

Tabela 2.1 – Gerações de Biocombustíveis

Gerações de biocombustíveis	Matéria-prima	Produtos
Primeira	Cana-de-açúcar, amido, e gorduras animais	Bioálcoois, biodiesel, biogás.
Segunda	Matéria lignocelulósica	Bioálcoois, bio-hidrogênio, biocombustível sintético ^(a)
Terceira	Microalgas	Óleos vegetais, Biodiesel

^(a) Conversão de misturas de CO e H₂ (gás de síntese) em combustíveis líquidos.
Fonte: (DEMIRBAS, 2009)

O etanol, também denominado álcool etílico (C₂H₅OH), é produzido, desde os tempos antigos, pela fermentação dos açúcares contidos na matéria orgânica das plantas. Ainda hoje, grande parte do etanol é obtido pelo mesmo processo, embora possa ser produzido a partir de eteno, derivado do petróleo (BASTOS, 2007). O etanol é um composto de extrema importância e possui um papel considerável na matriz energética global (LIN, Y.; TANAKA, S., 2006). É o principal biocombustível empregado no mundo, correspondendo a 10% da energia mundial, com perspectiva de crescimento de 145% nos próximos dez anos (VIEGAS, 2013).

O etanol de primeira geração (1G) é obtido de biomassas tais como caldo da cana-de-açúcar, beterraba, milho, trigo e mandioca. Os Estados Unidos é o maior produtor de álcool por meio do milho, seguido do Brasil que utiliza a cana-de-açúcar. Já a União Europeia produz o álcool de batatas e beterrabas, mas esse processo é pouco produtivo (SANTOS et al., 2012).

Os combustíveis de segunda geração (2G) são produzidos a partir de uma ampla variedade de biomassa lignocelulósica. A segunda geração é chamada de biocombustível avançado, pois é abundante, acessível, sustentável e obtido de fontes renováveis, como materiais lignocelulósicos que se encontram, por exemplo, em madeiras, árvores, resíduos agrícolas, florestais ou urbanos, palhas de milho, trigo, arroz, gramíneas, ou como subprodutos da indústria da pasta para papel (DEMIRBAS, 2009; ESCOBAR et al., 2009).

Além disso, não interferem com a produção de alimentos e permitem uma considerável redução na demanda de insumos energéticos na etapa de produção agrícola, melhorando os índices de sustentabilidade dos biocombustíveis (LORA; VENTURINI, 2012).

Em um momento em que a expansão da área agrícola para produção de biocombustível apresenta dificuldades no Brasil, o etanol de biomassa lignocelulósica mostra-se como uma fonte promissora. Calcula-se que essa tecnologia pode aumentar em 50% da produção de álcool nacional apenas usando o bagaço da cana-de-açúcar, sem necessidade de expandir a área de plantação (DAUBERMANN et al., 2014). Os combustíveis de segunda geração representam uma alternativa para o uso energético da biomassa, apresentando vantagens ambientais e econômicas (PACHECO, 2011).

A terceira geração de biocombustível baseia-se no uso de matérias-primas como as algas para a produção de biodiesel (DEMIRBAS, 2011).

A utilização do bioetanol é muito mais abrangente do que a produção de energia. O etanol também é utilizado em diversos segmentos como solvente, componente de formulações médicas, na indústria de higiene e limpeza, alimentícia e muitas outras de origem química, petroquímica ou biotecnológica. Considerado uma matéria-prima para processos de produção de ácidos orgânicos, éteres, ésteres, óxidos, hidrocarbonetos e produção de biopolímero (LIN, Y.; TANAKA, S., 2006; LIN, Y.; TANAKA, S., 2006; MILESSI et al., 2013).

O grande diferencial dos produtos gerados a partir do bioetanol, e aqueles utilizados pela indústria, estão em explorar os fatores positivos que este possui junto aos consumidores, por ser um produto sustentável (RODRIGUES, 2011).

2.2 APROVEITAMENTO DA BIOMASSA NA CONCEPÇÃO DE BIORREFINARIA

Compreende-se que o conceito de biorrefinaria é análogo da refinaria de petróleo que fraciona a biomassa em uma família de produtos, ou seja, a biorrefinaria seria uma unidade industrial com facilidades capazes de converter a biomassa em produtos químicos e combustíveis (POSADA et al., 2013).

A biorrefinaria consiste no aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica (Figura 2.1), em processos de conversão bioquímica ou termoquímica para a obtenção de bioenergia na forma de energia elétrica, térmica e biocombustíveis de primeira, segunda ou terceira geração e de produtos químicos ou biomoléculas de alto valor agregado (MUSSATTO et al., 2013; POSADA et al., 2013; MONCADA; TAMAYO; CARDONA, 2014).

Figura 2.1 – Representação esquemática de uma biorrefinaria no conceito de duas plataformas

Fonte: Adaptada de NREL (2008) *Nacional Renewable Energy Laboratory*

A vantagem é que as biorrefinarias podem produzir um conjunto maior de classes de produtos em comparação com as refinarias de petróleo, já que são

alimentadas por amplas variedades de matérias-primas. A desvantagem é que um número bem maior de processos tecnológicos é necessário, além do que muitos destes processos ainda se encontram em estágio de desenvolvimento (DALE; KIM, 2008).

O conceito de biorrefinaria é atraente porque permitiria a produção de compostos de alto valor agregado e/ou grandes volumes de biocombustíveis, com os preços de mercado competitivos, reduzindo os custos de eliminação de resíduos e de energia. Além disso, sempre levando em consideração a sustentabilidade do processo e seus impactos indiretos, como o uso da água, impacto sobre os solos e a biodiversidade e a competição por alimentos (PAES; ALMEIDA, 2014).

2.3 ETANOL: O PRINCIPAL BIOCOMBUSTÍVEL

2.3.1 Panorama do Etanol de segunda geração no Brasil e no Mundo

O Brasil iniciou um programa para substituir a gasolina pelo etanol, com a criação do Programa Proálcool, em 1975, mediante a crise do petróleo da década de 70, na tentativa de reduzir as importações de petróleo e seus derivados. Neste programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para produzir etanol, e, conseqüentemente, estudos tanto na área tecnológica como agrícola foram bastante intensificados pelos grupos de pesquisa, levando o Brasil a uma posição muito favorável em termos de segurança energética (RENÓ et al., 2014).

Grandes potencialidades são observadas para a produção de energia a partir de biomassa. O programa brasileiro de bioetanol é um exemplo da eficiência da produção de cana-de-açúcar e da alta tecnologia de produção de bioetanol (SOCCOL et al., 2010).

A matriz energética mundial tem participação em torno de 82% de fontes de carbono fóssil, sendo 32% de petróleo, 26% de carvão mineral e 21,5% de gás natural. A biomassa corresponde apenas a 9,9% da matriz energética mundial, Ministério das Minas e Energia (MME, 2015). Entretanto, apesar dos atrativos,

deve notar-se que apenas uma parte da biomassa produzida é utilizada na produção de bioenergia, (CORTEZ; LORA; GÓMEZ, 2008).

Portanto, a fim de satisfazer necessidades mais amplas, um aumento significativo na produção de etanol só será possível se houver um avanço nos conhecimentos básicos necessários para o desenvolvimento de tecnologias que serão capazes de obter energia a partir de materiais lignocelulósicos presentes na cana-de-açúcar (SOCCOL et al., 2010).

2.3.2 Mercado Mundial e Brasileiro de Etanol

Os grandes mercados consumidores de biocombustíveis estão em processo de recuperação econômica, devido redução dos preços do petróleo o que acarretou uma diminuição nos investimentos nas usinas e nos projetos com etanol de segunda geração, Empresa de Pesquisa Energética (EPE 2015). Entretanto, observa-se menor interesse em relação aos biocombustíveis de primeira geração, dando-se preferência a políticas de incentivo à eficiência energética e/ou à divulgação de outras fontes mais avançadas, como os biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (EPE, 2013).

De acordo com Soares; Rossell (2007), os custos de produção de biomassa no Brasil são os menores do mundo, portanto, a possibilidade de resultados viáveis é potencialmente alta. Além desse fator, a produção de etanol lignocelulósico tem como perspectiva aumentar em até 50% a produção de álcool sem necessitar expandir o plantio. A viabilidade do etanol de segunda geração está diretamente relacionada com a demanda do mercado e com o desenvolvimento das tecnologias de produção de etanol a partir da biomassa.

O etanol lignocelulósico vem recebendo atenção especial em muitos países, como os da União Europeia (UE), os EUA, a China e o Brasil. Nesses países, governos e empresas estão envolvidos em viabilizar comercialmente o etanol de segunda geração (2G), que representa importante passo na direção da sustentabilidade ambiental e, em alguns casos, segurança e independência energética nacional (DAMASO et al., 2014).

Muitos consideram a conversão desses materiais um dos maiores desafios dos próximos cinquenta anos, em que prevalecerão as empresas e economias que conseguirem desenvolver tecnologias alternativas à economia do petróleo (BASTOS, 2007).

Nas últimas décadas, o estudo sobre o processo de conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis ganhou importância e o estudo pelos grupos de pesquisa em todo o mundo foram intensificados, colocando algumas empresas como pioneiras nessa tecnologia e na etapa de plantas comerciais (UNICA, 2013; DAMASO et al., 2014; AVELINO GONÇALVES; DOS SANTOS; DE MACEDO, 2015).

Velasco (2009) estima que a produção de biocombustíveis convencionais e de celulósicos terá um crescimento exponencial até 2022 de acordo com os padrões norte-americanos.

Conforme Bloomberg (2013) estudos realizados pela Bloomberg New Energy Finance sugerem que o preço do etanol produzido a partir do bagaço, palha e outros tipos de biomassa têm chances de tornar-se mais atraente. A pesquisa coletou dados e previsões de custos de produtos de 11 grupos empresariais que estão na frente em pesquisa e desenvolvimento de etanol lignocelulósico no mundo.

Os resultados indicam que em 2012 o custo da produção do etanol de segunda geração foi de US\$ 0,94 por litro, cerca de 40% maior do que o custo de produção do etanol de milho norte-americano de US\$ 0,67. (BLOOMBERG, 2013).

A longo prazo, segundo Milanez et al. (2015) com os avanços nas etapas de produção e conversão de biomassa e da redução no custo de enzimas e equipamentos, o etanol de segunda geração pode ser mais competitivo que o etanol convencional e aproximando do preço de barril de petróleo a US\$ 44.

Com este nível de competitividade o etanol de segunda geração (2G) não só reduziria o volume de gasolina importada, como também exportaria além de determinar investimentos na química renovável. A associação de tais produtos químicos com o etanol de segunda geração, não apenas contribuiria para reduzir o significativo déficit brasileiro na indústria química, mas também colocaria o Brasil como referência mundial para localização de biorrefinarias (MILANEZ et al., 2015).

Viegas (2013) faz uma análise do grupo Pike Research, empresa de pesquisa de mercado e consultoria que fornece uma análise dos mercados globais de tecnologia limpa, indicam que o mercado mundial de biocombustíveis irá crescer 145% nos próximos dez anos, passando de uma demanda de 110 bilhões de litros em 2012 para 270 bilhões de litros em 2021.

No Brasil, a partir de iniciativas governamentais, como o Plano Conjunto BNDES-Finep de Apoio à Inovação Tecnológica Industrial dos Setores Sucroenergético e Sucroquímico – PAISS, viabilizou recursos para implementação de três plantas comerciais de etanol de segunda geração (2G) (MILANEZ, et al. 2015). Com muitas expectativas a Granbio esperava abrir duas usinas até 2016, a Raízen projetando bilhões em investimentos para ampliar a sua produção de etanol 2G, a Odebrecht esperava estar operando até o fim deste ano e a Abengoa também esperava entrar na disputa. Entretanto, o ano de 2016 que deveria ser uma referência para a indústria de etanol de segunda geração no Brasil, devido à crise econômica que se instaurou no país e entraves do processo, as previsões não se concretizaram, conforme Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, 2016).

Apesar da incerteza do mercado diante do negócio, para o BNDES, o Brasil é pioneiro nessa tecnologia, não só pelo número de projetos em funcionamento, mas também por oferecer biomassa barata e previsões de crescimento das lavouras de cana-energia. Muitas dúvidas como: quanto essas usinas produziram, qual foi o impacto econômico destes investimentos e quanto avanço ocorreu desde a sua implementação, permanecem sem resposta, pois as empresas não as divulgam. Porém, quando forem solucionadas, poderão trazer de volta o entusiasmo com o etanol de segunda geração (CNPEM, 2016).

Os avanços tecnológicos e as soluções dos problemas previstos irão depender de incentivos de políticas públicas ao setor de etanol lignocelulósico visando a ampliação dos investimentos em pesquisa e desenvolvimento com a finalidade de aumentar a eficiência em diversas etapas da produção (MILANEZ et al., 2015; CNPEM, 2016).

2.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Devido ao seu caráter renovável, abundante e de baixo custo, os materiais lignocelulósicos são matérias-primas potencial para a produção de etanol, e de outros produtos utilizados em diversos segmentos industriais (RENÓ et al., 2014).

A Ásia gera cerca de 667,6 milhões de toneladas de palha de arroz, a Europa produz 132,59 milhões de toneladas de palha de trigo enquanto os EUA 140,86 milhões de toneladas de palha de milho (SARKAR et al., 2012). Dentre as biomassas lignocelulósicas estudadas, destaca-se no Brasil o bagaço da cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo e o cavaco de eucalipto, com uma produção anual de 350 milhões de toneladas, (CARVALHO et al., 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; DUSSÁN, 2013; CARVALHO et al., 2015) encontradas em diversas regiões do País.

Outros resíduos de culturas agrícolas, como palha de milho, trigo e arroz, resíduos do processamento de frutas cítricas, biomassa de coco, resíduos provenientes da indústria de papel e da extração de óleo de girassol e mamona, bem como resíduos sólidos municipais, poderiam eventualmente ser usados como matéria-prima para produzir etanol. No entanto, cada fonte de biomassa representa um desafio tecnológico (SOCCOL et al., 2010).

O aproveitamento destes materiais relaciona-se com a sua constituição. Os resíduos lignocelulósicos são construídos de celulose, hemicelulose, lignina, uma pequena quantidade de extrativos e cinzas. As proporções de todos os constituintes variam para cada espécie vegetal (KUHAD; SINGH, 1993).

A Tabela 2.2 apresenta a composição aproximada de alguns materiais lignocelulósicos encontrados na natureza.

Tabela 2.2 – Composição química de diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	40-44	25-35-	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: (GÓMEZ et al.; 2010)

O bagaço de cana-de-açúcar, como sendo um lignocelulósico, é composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2.2). Além destes, estão presentes, em proporções menores, cinzas e extrativos (GÍRIO et al., 2010).

Figura 2.2 - Estrutura de uma fibra vegetal

Fonte: Adaptado de (SILVA et al. ; 2009)

2.4.1 Celulose

A celulose é um dos principais componentes estruturais da parede celular, e fornece resistência mecânica e estabilidade química das plantas, sendo, portanto, o composto orgânico mais abundante do mundo (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992). Este polissacarídeo estrutural é o β -1,4-poliacetal de celobiose (4-O- β -D-glicopiranosil-D-glucose), considerado comumente como um polímero de glicose. Sua fórmula química é $(C_6H_{10}O_5)_n$ e a estrutura é uma cadeia do polímero e se apresenta na Figura 2.3.

A natureza da ligação entre as moléculas de glicose (β -1,4 glicosídicas) permite que o polímero seja disposto em longas cadeias retas. As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente a hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (CONVERSE; WARE, 1994; WOOD; SADDLER, 1998). As pontes de hidrogênio, por sua vez, resultam na formação de cadeias paralelas ligadas entre si (FAULON; CARLSON; HATCHER, 1994).

Figura 2.3 - Estrutura de uma molécula de celulose

Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1983)

As ligações inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente a hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (CONVERSE; WARE, 1994; WOOD; SADDLER, 1998).

As fibras de celulose, quando colocadas em contato com a água e certos solventes orgânicos, sofrem intumescimento. A extensão do intumescimento pode ser intercristalino. No primeiro caso o agente intumescedor penetra nas regiões amorfas e nos espaços entre elas. O caso mais comum de intumescimento cristalino é o inchamento da celulose em água. No segundo caso o agente intumescedor penetra nas regiões cristalinas das microfibras. O intumescimento

cristalino pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções de alguns sais (D'ALMEIDA, 1988).

A solubilidade do polímero é fortemente relacionada com o grau de hidrólise alcançada. Como resultado, fatores que afetam a taxa de hidrólise da celulose também afetam a sua solubilidade (KRÄSSIG et al., 2004).

2.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero de diferentes açúcares C5 e C6, que também presente na parede celular vegetal. A hemicelulose é um termo coletivo. É usado para representar uma família de polissacarídeos tais como arabinoxilanas, gluco-mananas, galactanas e outros, que são encontrados na parede celular da planta e com a composição e estrutura diferentes dependendo de sua origem e o método de extração (LIMA; RODRIGUES, 2007; FENGEL; WEGENER, 1991).

O tipo mais comum de polímeros que pertencem à família de polissacarídeos da hemicelulose é xilana. Na Figura 2.4 é apresentada a molécula de uma xilana que envolve ligações 1→4 de unidades xilopiranosil com unidades α -(4-O)-metil-D-glucuronopiranosil anexado a unidades de anidroxilose. O resultado é uma cadeia de polímero ramificado que é principalmente composto de monômeros de açúcar de cinco carbonos, xilose, e em menor grau, monômeros de açúcar de seis carbonos como a glicose (LIMA; RODRIGUES, 2007).

Um dos aspectos mais relevantes da estrutura e composição da hemicelulose é a falta de estrutura cristalina, principalmente devido à estrutura altamente ramificada, bem como a presença de grupos acetil ligados à cadeia polimérica (KIRK-OTHMER, 2001; HARMSEN et al., 2009).

Figura 2.4 - Representação esquemática do suporte principal da hemicelulose das plantas.

Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1983)

Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar grande parte de uma estrutura molecular amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e mais fácil de ser degradada do que a celulose. A hemicelulose é insolúvel em água à baixa temperatura. No entanto, sua hidrólise começa em uma temperatura mais baixa que a da celulose, o que a torna solúvel em temperaturas elevadas (THERMOWOOD, 2003). A presença de ácido melhora significativamente a solubilidade em água. Nos materiais lignocelulósicos, a hemicelulose está intimamente ligadas a celulose e a lignina, funcionando como uma fase adesiva na estrutura do material.

2.4.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula natural de estrutura complexa. É um polímero tridimensional amorfo com unidades fenilpropanol como blocos de construção predominante. São mais comumente encontrados os álcoois p-cumaril, coniferil e sinapil (FENGEL; WEGENER, 1991) (Figura 2.5).

Dividindo as plantas superiores em duas categorias, de madeira dura (angiospermas) e mole (gimnospermas), foi identificado que a lignina da madeira mole é composta por mais de 90% de álcool coniferil com o restante de unidades de álcool p-cumaril. Por outro lado, a lignina contida em madeira dura é composta de diferentes proporções de unidades tipo álcool coniferil e sinapil (KIRK-OTHMER, 2001).

Figura 2.5 - Álcoois P-cumaril, coniferil e sinapil: blocos dominantes na lignina tridimensional

Fonte: Adaptado de (FENGEL; WEGENER, 1983)

A lignina se comporta como uma rede tridimensional insolúvel, desempenhando um papel importante na resistência da célula e desenvolvimento, afetando o transporte de água, nutrientes e metabólitos na célula vegetal. Ela atua como ligante entre as células criando um material composto que tem uma notável resistência ao impacto, compressão e flexão (HARMSEN et al., 2009).

Os solventes que foram identificados para dissolver a lignina incluem álcoois de baixo peso molecular, dioxano, acetona, piridina e dimetilsulfóxido. Além disso, foi observado que em temperaturas elevadas, ocorre um suavizado térmico da lignina, o que permite reações de polimerização de natureza ácida ou alcalina (O'CONNOR et al., 2009).

2.5 O BAGAÇO DE CANA-DE AÇÚCAR

Pode-se separar a cana-de-açúcar em três frações ou produtos de importância econômica: caldo, bagaço, palhada e ponteiros (Figura 2.6). A produção atual de açúcar e etanol provém do caldo, que corresponde a um terço do potencial energético da planta. O coproduto da extração do caldo é o bagaço, que corresponde a outro terço deste potencial. A palhada e ponteiros, que correspondem ao último terço. (PANDEY et al., 2000).

Figura 2.6- Biomassa da cana-de-açúcar

Fonte: Adaptado Seabra (2008)

O bagaço de cana-de-açúcar (ou “bagaço”, como é geralmente chamado) é um subproduto da cana que sobra após a extração do suco. Morfologicamente, o bagaço é constituído de 50% de fibras exteriores, 30% de células parenquimatosas, 15% de segmentos de vasos e 5% de células epidérmicas (CORTEZ; JUNIOR; ALMEIDA, 2013). O bagaço não é uma biomassa homogênea, apresentando variações em sua composição, assim como na sua estrutura morfológica em função dos procedimentos de corte e de processamento industrial (CGEE, 2009).

A hemicelulose e a celulose apresentam-se como uma das principais frações estruturais do bagaço de cana, representando uma fonte potencial de xilose e glicose (BETANCUR; PEREIRA JR, 2010; SANTOS et al., 2012).

O potencial de geração de subprodutos da cana de açúcar (matéria seca) representa em média 14% da massa da cana (SEABRA, 2008). Desta forma, para cada tonelada de cana (colmos) produzida têm-se 140 Kg de bagaço (base seca) e 140 Kg de palha, nova matéria-prima devido à proibição da queima da palha de cana (CONAB, 2013). A produção de uma típica usina brasileira de açúcar, álcool e bagaço é apresentada na Figura 2.7.

Figura 2.7 - Produção de uma típica usina brasileira de açúcar

Fonte: FARINA, E. et al.¹ (2010 apud RODRIGUES, 2011)

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), no segundo levantamento realizado pela (CONAB, 2016) com previsão para safra 2016/2017 tem-se uma abordagem aproximada entre 610 e 630 milhões de toneladas, com crescimento de 2,9% da safra anterior. Deste montante, o bagaço representa 30%, ou seja, aproximadamente 189 milhões de toneladas (CONAB, 2016).

Estudos vêm sendo conduzidos visando utilizar o bagaço excedente para a produção de etanol lignocelulósico. Se aproveitadas, 70% de palhada e ponteiros podem ser utilizadas na produção de energia elétrica e calor, assim como na produção de bioetanol a partir de material lignocelulósico. Os 30% excedentes devem ser deixados no campo, com vantagens agrônômicas como: auxiliar no controle de ervas daninhas e aumentar a fertilidade do solo, Instituto Euvaldo Lopes (IEL, 2008; VAZ JUNIOR, 2011).

A implantação da tecnologia de etanol de bagaço de cana é favorecida, uma vez que o processo de produção pode ser anexado às unidades açúcar/etanol já existentes, exigindo menores investimentos, infraestrutura, logística e fornecimento de energia. Além disso, o bagaço é gerado nas unidades industriais, e, como tal, não possui custos de transporte. Este é um cenário promissor, uma vez que de cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de etanol podem ser produzidos, considerando o uso só da sua parte celulósica (SOCCOL et al., 2010).

Um grande número de trabalhos científicos e inovações tecnológicas no tema têm sido gerados devido ao crescente incentivo à pesquisa promovido, em

¹ FARINA, E. M. M. Q., VIEGAS, C., PEREDA, P. e GARCIA, C. Mercado e concorrência do etanol. In: SOUZA, E. L. e MACEDO, I. C. (Org.). **Etanol e Bioeletricidade**: a cana-de-açúcar no future da matriz energética. São Paulo: ÚNICA, 2010.

especial no Estado de São Paulo, pela agência de fomento à pesquisa Fapesp, institutos de pesquisa como CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) e CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e empresas como Dedini S/A, Cosan S/A, Petrobras S/A e Shell Petróleo S/A, entre outras.

2.5.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

A eficiente redução da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a liberação dos polissacarídeos estão entre as mais importantes nas áreas de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico e para a obtenção de químicos em processos desenvolvidos em biorrefinaria (HUANG et al., 2011).

O maior desafio de processamento na produção de biocombustível é o pré-tratamento da biomassa. Por meio de uma etapa de pré-tratamento envolvendo um mecanismo pelo qual a estrutura lignocelulósica é rompida, a fração hemicelulósica é separada e os açúcares fermentescíveis como xilose, glicose, arabinose tornam-se mais acessíveis (MOSIER et al., 2005) para serem fermentados pelos micro-organismos capazes de metabolizar esses polissacarídeos para produção de etanol.

A quantidade variável de hemicelulose e lignina em um material lignocelulósico depende de fatores como tipo da planta a partir da qual a biomassa é obtida, idade da colheita, solo, entre outros. Percebe-se a variedade de métodos de pré-tratamento, para diversos tipos de matérias lignocelulósicas (CLAASSEN et al., 1999).

Do ponto de vista econômico, o pré-tratamento é um passo fundamental no processo de bioconversão porque deve melhorar a separação entre os componentes da parede celular, evitando a formação de compostos que inibem a hidrólise e posteriores processos de fermentação.

O pré-tratamento consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar significativamente nos dispêndios das etapas anteriores e subsequentes. O pré-tratamento é requerido para modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica a fim de disponibilizar a

maior quantidade de açúcar possível (pentose e hexoses) (SARKAR et al., 2012; SANTOS, 2013), como pode ser observado na Figura 2.8.

De acordo com Galbe; Zacchi (2010), para um pré-tratamento ser considerado eficaz, deve apresentar algumas características, como: resultar em alta extração de açúcares; formando açúcares diretamente ou subsequentemente, por hidrólise; permitir alta digestibilidade da celulose, no caso de subsequente hidrólise enzimática; ter baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas do processo como calor secundário; minimizar custos; ter baixo custo de capital e operacional.

Figura 2.8 - Esquema do Pré-tratamento em material lignocelulósico

Fonte: Modificado e adaptado de (HAGHIGHI MOOD et. al. , 2013)

Muitos métodos de pré-tratamento têm sido utilizados e podem ser divididos em quatro grupos: I – Pré-tratamento físico, II – Pré-tratamento físico-químico, III – Pré-tratamento químico e IV – Pré-tratamento biológico (Figura 2..9) (MORA-PALE et al., 2011; SANT'ANA DA SILVA et al., 2011; SARKAR et al., 2012; HAGHIGHI MOOD et al., 2013; MESA et al., 2015).

Cada um destes métodos tem vantagens e desvantagens, e não existindo um pré-tratamento específico para as aplicações práticas que envolvem diferentes tipos de materiais lignocelulósicos.

Figura 2.9 - Tipos de pré-tratamento

Fonte: Arquivo pessoal

2.5.2 Pré-tratamento ácido diluído

Dentre os diferentes métodos de pré-tratamento disponíveis, a hidrólise ácida com ácido diluído tem sido bastante estudada e se mostrado um método eficiente para a liberação de açúcares fermentescíveis, sendo a mais empregada para a decomposição da estrutura lignocelulósica e geração de açúcares (LAOPAIBOON et al., 2010).

Considerando que a composição da parede celular dos materiais lignocelulósicos e as condições de operação influenciam diretamente na recuperação de açúcares, diversos fatores vêm sendo extensivamente estudados para aplicação da hidrólise ácida em diferentes materiais lignocelulósicos, entre eles destacam-se o tempo de reação e a concentração de ácidos utilizada, os quais influenciam diretamente na formação de inibidores e nos danos causados aos equipamentos (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011).

Os ácidos normalmente utilizados para a obtenção de hidrólise em laboratório são o ácido sulfúrico, o ácido clorídrico e o ácido trifluoroacético. Enquanto os ácidos sulfúrico e clorídrico discriminam pouco as ligações

glicosídicas de diferentes tipos, atacando celulose e hemiceluloses de forma similar, o ácido trifluoroacético quebra preferencialmente as ligações mais fracas, que são as ligações do tipo alfa (α) presentes nas ramificações das hemiceluloses (BUCKERIDGE; SANTOS; DE SOUZA, 2010).

O processo de hidrólise ácida consiste em utilizar um ácido forte para romper as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos de um polissacarídeo. Esta técnica é especialmente útil na separação e solubilização da fração hemicelulósica.

Quando realizada com ácidos diluídos, permite, igualmente, aumentar a susceptibilidade da celulose a futuros processos de hidrólise sem afetar a sua estrutura base. Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros açúcares (OLIVEIRA, 2010).

As reações secundárias, utilizando ácido diluído, gera produtos de degradação menos pronunciados do que usando o ácido concentrado e a digestibilidade do material pré-tratado correlaciona bem com a remoção da fração hemicelulósica (WYMAN, 1994; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Há dois tipos de processos de pré-tratamento com ácido diluído: os que trabalham a altas temperaturas (maiores que 160 °C) com fluxo contínuo para baixa carga de sólidos (5-10% w/w) e os que trabalham a baixas temperaturas (menores que 160 °C) em bateladas para alta carga de sólidos (10-40% w/w) (SUN; CHENG, 2002; SAHA, 2003). A temperatura ideal para a ruptura de hemicelulose está entre 100 e 120 °C e a concentração ideal de ácido sulfúrico é aproximadamente de 3% (BUCKERIDGE; DIETRICH, 1990).

O processo de hidrólise tem um bom potencial para liberar açúcares fermentáveis a partir de biomassa vegetal e pode ser adaptado a diferentes casos (BUCKERIDGE; SANTOS; DE SOUZA, 2010).

Por exemplo, Canilha et al. (2010) verificaram condições para a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e observaram que o emprego de 2% v/v de ácido sulfúrico, 150 °C e 30 min, foi eficiente na liberação dos açúcares fermentescíveis. Milessi et al. (2013a) e Dussan et al (2016) empregaram uma proporção de 1/10 entre massa de bagaço e volume da solução de H₂SO₄ para a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar, o que resultou um hidrolisado rico em xilose. Para a palha de trigo, Baboukani; Vossoughi; Alemzadeh (2012)

observaram maiores recuperações de açúcares utilizando 1,6 % v/v de ácido sulfúrico, 147 °C e 30 min.

2.5.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

Os subprodutos gerados a partir de pré-tratamento são fortemente dependentes da matéria-prima e do método utilizado. Esses compostos agem inibindo o metabolismo microbiano, razão pela qual são chamados de inibidores, dificultando a bioconversão dos açúcares nos produtos desejados (CANILHA et al., 2010) e consequentemente afetando o desempenho da produção de etanol pelos micro-organismos fermentadores (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

As substâncias que podem atuar como inibidores de micro-organismo são os compostos fenólicos e outros aromáticos, ácidos alifáticos, aldeídos, furanos, como o furfural e o hidroximetilfurfural, íons inorgânicos, e etanol ou outros produtos de fermentação. Além disso, ácidos alifáticos, como o ácido acético, fórmico e levulínico e compostos fenólicos derivados da lignina, são também formados (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; GÍRIO et al., 2010). A formação dessas substâncias podem ser observadas quando ácidos e/ou altas temperaturas são utilizadas (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). O ácido acético, o furfural e o hidroximetilfurfural são liberados durante a hidrólise ácida (SILVA; MATOS; CARVALHO, 2005).

A escolha do método de destoxificação depende do tipo de hidrolisado a ser destoxificado (quanto à eficiência do método de destoxificação em relação ao hidrolisado) e do micro-organismo fermentador empregado (em relação a quais inibidores devem ser removidos) (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011).

Dentre as metodologias apresentadas, a técnica de “*overliming*” é considerada a mais utilizada (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011) e tem sido efetiva como um processo de destoxificação devido à remoção parcial de inibidores tóxicos, como furfural e hidroximetilfurfural, mesmo que este mecanismo não seja ainda completamente bem compreendido (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Durante o “*overliming*”, o ácido sulfúrico é removido do hidrolisado pela adição de bases como por exemplo, hidróxido de cálcio, resultando em um ajuste do pH, condição sob a qual um precipitado é formado. Este precipitado consiste de sais de cálcio de baixa solubilidade, como o sulfato de cálcio, componente que precipita compostos ácidos (DU PREEZ, 1994b; ROBERTO et al., 1994).

A técnica de “*overliming*” ocasiona outros efeitos benéficos, como a remoção de compostos fenólicos, precipitação de íons de metais pesados e conversão do furfural em álcool furfurílico ou ácido furóico (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b). Entretanto, já foi observado que as concentrações de ácido acético durante o tratamento não são alteradas significativamente (KARIMI; EMTIAZI; TAHERZADEH, 2006). Uma desvantagem do “*overliming*” é a perda de açúcares devido a reações de degradação catalisadas pelo hidróxido e conversão dos açúcares a compostos não fermentescíveis (CARVALHO et al., 2005). Por exemplo, um método que pode ser utilizado em conjunto com a técnica de “*overliming*” para a diminuição da concentração de ácido acético em hidrolisados é a adsorção por carvão ativado, técnica que contribui com a diminuição das concentrações de derivados fenólicos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

2.6 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE BIOETANOL

A obtenção de etanol por processos fermentativos pode ser realizada por bactérias ou leveduras utilizando diversos açúcares, como glicose, frutose, manose, xilose e arabinose, que podem ser metabolizados e convertidos a etanol. As espécies bacterianas mais conhecidas por possuir capacidade de produzir etanol são *Zymomonas mobilis* (SANTOS, 2012) e a *Klebsiella pneumoniae*, entretanto as melhores produtividades são obtidas por leveduras (SREENATH; JEFFRIES, 2000; SCORDIA et al., 2012; MILESSI et al., 2013a; RODRIGUES et al., 2016).

O objetivo da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar energia em forma de ATP, que será empregada na realização dos diversos processos fisiológicos e de biossíntese, necessários para a manutenção celular,

crescimento e multiplicação (SILVA et al., 2016). O etanol e o gás carbônico resultantes são consequentes dos produtos de excreção. Entretanto, o etanol, bem como outros produtos como glicerol e ácidos orgânicos, podem ser oxidados metabolicamente, gerando mais ATP, mas apenas em condições de aerobiose (PORTO, 2005).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal micro-organismo utilizado na produção industrial de etanol (1G) a partir do caldo de cana-de-açúcar por sua habilidade de crescimento em altas concentrações de açúcar, elevada produtividade (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004).

Embora alguns micro-organismos utilizem a xilose como fonte de carbono (LIN, Y.; TANAKA, S., 2006), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de fermentar este açúcar, um dos principais constituintes da fração hemicelulósica dos materiais ligocelulósicos (NAKAMURA; SAWADA; INOUE, 2001). A incapacidade de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentar xilose é atribuída à impossibilidade de essa levedura converter eficientemente esse substrato em xilulose (SALES, 2010).

A Tabela 2.3 apresenta alguns exemplos de leveduras fermentadoras de açúcares (pentose), entre elas se destacam a *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces shehatae* e *Pachysolen tannophilus* (CHENG et al., 2008; SINGH; MAJUMDER; GHOSH, 2014), três micro-organismos relatados por apresentarem bom desempenho na bioconversão de xilose em etanol. Dentre estas três, *Scheffersomyces stipitis* é a mais eficiente e produtiva (SINGH; MAJUMDER; GHOSH, 2014).

Tabela 2.3 – Exemplos de Leveduras fermentadoras de pentoses e suas Características

Levedura	Características	Referências
<i>S. cerevisiae</i> Recombinante	Genes introduzidos para a assimilação da xilose.	(JIN; JEFFRIES, 2004)
<i>Scheffersomyces stipitis</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> e <i>Candida shehatae</i>	• Fermentadoras de xilose. • Precisam de oxigenação regulada para a produção máxima de etanol. • Requerem processo de destoxificação do hidrolisado.	(LIGTHELM; PRIOR; PREEZ, 1988; SKOOG; JEPPSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1992)
<i>Candida acidothermophilum</i>	• Termotolerante. • Podem atingir 80% da produção de etanol teórico.	KADAM; SCHMIDT (1997)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	• Resistência à pressão osmótica, inibição de outros micro-organismos, alta competição capacidade de assimilar diversos açúcares.	(OLSSON; LINDÉN; HAHN-HÄGERDAL, 1992; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1993)
<i>Pseudozyma brasiliensis</i>	• Metaboliza açúcares de cinco carbonos e secreta uma enzima de interesse, xilanase, em grande quantidade.	(JIN; JEFFRIES 2004)

Fonte: Arquivo pessoal

2.6.1 Metabolismo de xilose assimilado por leveduras

A via metabólica utilizada por leveduras para a bioconversão de xilose em etanol (Figura 2.10) se inicia com o transporte de xilose para o interior da célula por meio da membrana celular e tem sido estudada por vários autores (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). A xilose é inicialmente reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (XR), dependente da coenzima NADH e/ou NADPH.

Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) ligada à NAD^+ . A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, molécula esta que pode ser convertida, por meio de reações não oxidativas da via hexose monofosfato, a intermediários da via EMP (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato), os quais podem então ser metabolizados por esta via, a qual está conectada a outras como o ciclo de Krebs e as reações de fermentação alcoólica (Figura 2.9).

A especificidade das enzimas XR e XDH aos cofatores reduzidos e oxidados varia de acordo com a espécie de levedura (SILVA et al., 1996; WILSON

et al., 2003). Por exemplo, na levedura *Scheffersomyces stipitis* possui a enzima XR dependente dos cofatores NADPH ou NADH e a enzima XDH é dependente principalmente do cofator NAD⁺ (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Figura 2.10 - Metabolismo de xilose por leveduras (esquema simplificado)

Fonte: Adaptado de (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a)

2.6.2 A levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRLY-7124

A levedura *Scheffersomyces stipitis* (Figura 2.10) (*Pichia stipitis*), teve o seu gênero recentemente reclassificado após ser analisada filogeneticamente em 2010, por KURTZMAN; SUZUKI (2010) que analisaram as sequências de rRNA D1/D2 LSU (“*large subunit*”) e SSU (“*small subunit*”) para determinar a inserção filogenética de diferentes espécies de *Pichia* e estabeleceram o novo gênero em homenagem ao Prof. W. Alexander Scheffers, Delft University of Technology, Holanda, devido as suas contribuições nos campos de fisiologia de leveduras e biotecnologia, em particular na fermentação de D- xilose.

Morfológicamente, a levedura *S. stipitis* (Figura 2.11) possui células esféricas, elípticas ou ainda alongadas, com tamanho de 2,2 a 6µm, e possui reprodução assexuada, normalmente por brotamento ou gemulação (CORREIA 2008).

Figura 2.11- Microfotografia da Levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 obtida por microscopia eletrônica de varredura aumentada 5.000 vezes

Fonte: Arquivo pessoal

Ao contrário da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é capaz de produzir etanol em meios com altas concentrações de açúcares, sob baixas condições aeróbias (Efeito Crabtree positivo), o micro-organismo *Scheffersomyces stipitis* a respiração não é reprimida pelos açúcares nem pela ausência de aeração (Efeito Crabtree negativo); sendo uma levedura que produz etanol em resposta à limitação de oxigênio. Entretanto, em presença de altas taxas de oxigênio, a produção de massa celular é favorecida (PAPINI et al., 2012).

Dentre as leveduras que fermentam xilose, *Scheffersomyces stipitis* encontra-se como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que converte xilose a etanol com elevado rendimento (VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; CHO et al., 2010; SINGH; MAJUMDER; GHOSH, 2014).

Segundo Agbogbo; Coward-kelly, (2008), *Scheffersomyces stipitis* é uma das poucas leveduras capazes de fermentar xilose a etanol sob condições anaeróbicas. Alguns estudos demonstram que *Scheffersomyces stipitis* produz etanol sob condições anaeróbicas (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1986), entretanto as condições microaeróbicas também são favoráveis para a produção de etanol (AGBOGBO; COWAR D-KELLY, 2008; SILVA et al., 2016).

Na maioria das leveduras fermentadoras de xilose há a formação de xilitol concomitante a produção de etanol (SILVA et al., 2014). A produção de xilitol aumenta com a redução da disponibilidade de O₂. Este fato é necessário na fermentação de xilose para evitar o desbalanceamento redox que pode ocorrer devido aos diferentes cofatores requeridos na primeira etapa do metabolismo de xilose (SIGH, A. et al., 2014).

Em *Scheffersomyces stipitis* não se observa um acúmulo de xilitol significativo quando esta é cultivada em condições limitantes de O₂, apesar do alto rendimento de etanol. Isso pode ser explicado devido à presença de dois mecanismos que têm como objetivo diminuir a produção de xilitol, visto que este é um subproduto obtido durante a conversão de xilose e reduz o rendimento final de etanol (SILVA et al., 2016).

O primeiro mecanismo refere-se à possibilidade de utilização de ambos os cofatores, NADH e NADPH, pela enzima XR, o que favorece o equilíbrio entre os cofatores e, portanto, ocorre baixa ou nenhuma produção de xilitol.

O segundo mecanismo, exclusivo de *Scheffersomyces stipitis*, refere-se à uma via respiratória alternativa que utiliza o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM), uma cadeia transportadora de elétrons não citocromo, proporcionando um maior controle do potencial redox para lidar com o desequilíbrio de cofatores. Deste modo, o uso de cofatores específicos juntamente com o equilíbrio redox resulta em baixa ou nenhuma produção de xilitol (SINGH; BAJAR; BISHNOI, 2014).

Em diversos trabalhos, as leveduras *Scheffersomyces stipitis* têm apresentado resultados promissores na conversão de xilose em etanol a partir dos mais variados hidrolisados de biomassa lignocelulósica, por exemplo, hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de trigo, casca de café, bagaço de malte, casca de avelã entre outros (ROBERTO et al., 1991; HAHN-HAGERDAL et al., 1994; FELIPE et al., 1995; NIGAM, 2001; 2002; CHANDEL et al., 2007; FERREIRA; DUSSÁN; et al., 2011; CADETE et al., 2012; LIN et al., 2012; SILVA et al., 2012; BELLIDO et al., 2013; HICKERT et al., 2013; SILVA et al., 2016).

2.6.3 Suplementação nutricional do meio de cultura

Várias fontes de nitrogênio têm sido investigadas em estudos biotecnológicos para otimizar o crescimento de micro-organismos e a produção de metabólitos de interesse. Dentre as fontes orgânicas mais estudadas estão a peptona, extrato de levedura e aminoácidos. Entre as fontes inorgânicas estão

sulfato de amônio, fosfato de amônio, nitrato de sódio e ureia (ALBUQUERQUE et al., 2014).

A suplementação do meio de fermentação é importante uma vez que proporciona condições para o crescimento do micro-organismo (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009).

Segundo Russell, (2003), os requisitos específicos para o crescimento de leveduras incluem: água; carboidratos fermentescíveis como fonte de carbono e energia; oxigênio; fonte de nitrogênio; fatores de crescimento, como vitaminas, e íons inorgânicos, essenciais para o metabolismo celular.

Os micro-organismos retiram do meio ambiente todas as substâncias necessárias para a síntese de material celular e de obtenção de energia (METCALF; EDDY, 1991). As necessidades nutricionais dos micro-organismos são muito variadas. Por exemplo, organismos autotróficos podem sintetizar todos os metabólitos necessários pela célula a partir de compostos inorgânicos; os heterotróficos requerem um ou mais nutrientes orgânicos como fonte de carbono (METCALF; EDDY, 1991). A habilidade em usar diferentes compostos como fonte de energia e de sintetizar proteínas e compostos do citoplasma a partir de compostos inorgânicos depende da presença de muitas enzimas (METCALF; EDDY, 1991). A falta ou a repressão de um ou mais genes que codificam a formação de uma destas enzimas reflete-se diretamente nas necessidades nutricionais da célula (METCALF; EDDY, 1991).

O nitrogênio consiste de 10 a 15% do peso seco das células, é o componente básico na formação de aminoácidos que formam as proteínas, sendo assimilado sob forma amoniacal (SLININGER et al., 2006). Fontes de nitrogênio em outras formas que não a amoniacal são primeiramente transformadas em íons amônio no interior da célula (CARMOUZE, 1994). A absorção de nitrogênio é necessária para a síntese de proteínas e outros componentes nitrogenados da célula, entretanto as leveduras só podem utilizar compostos nitrogenados de baixa massa molar, como íons amônio inorgânicos, ureia, aminoácidos e pequenos peptídeos. Leveduras não podem romper e metabolizar proteínas ou peptídeos maiores que tripeptídeos (INGLEDEW, 1999; CINELLI, 2012).

O sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) pode ser utilizado como fonte de nitrogênio e o farelo de arroz como fonte de aminoácidos. Ambos os nutrientes favorecem o crescimento de leveduras (CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2002).

Basso; Alves; Amorim (1996) relatam que a acidez resultante da utilização do sulfato de amônio, embora auxilie no controle da contaminação bacteriana (consequentemente reduz as formações de ácidos láctico e acético), ocasiona estresse à levedura, diminuindo sua viabilidade e sua multiplicação. Laopaiboon et al. (2010) observaram que a suplementação de caldo de sorgo com 3,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de peptona favoreciam a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, a adição de sulfato de amônio juntamente com estes compostos foi prejudicial, favorecendo a formação de subprodutos.

Dentre as principais fontes de nitrogênio complexas empregadas em bioprocessos, o extrato de levedura tem sido um dos mais utilizados por ter uma composição rica em vitaminas do complexo B e aminoácidos (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

Slininger et al. (2006) avaliaram o emprego de fontes de nitrogênio na forma de aminoácidos, além de minerais em meio semissintético contendo xilose como principal fonte de carbono, para a produção de etanol utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis*. Estes autores verificaram que os aminoácidos quando utilizados de forma isolada não resultaram em benefícios para o processo fermentativo, visto que a levedura utiliza os aminoácidos para várias aplicações na célula, principalmente para síntese de proteínas. Entretanto, quando os aminoácidos foram utilizados de forma combinada, foram capazes de aumentar a produtividade volumétrica em etanol. Segundo estes autores, os aminoácidos arginina e ácido glutâmico foram os que apresentaram os maiores efeitos sobre o aumento da produtividade volumétrica em etanol. Além disto, foi constatado que a faixa ótima da razão carbono:nitrogênio (C:N) em concentrações de xilose de 50 g/L, foi de 127:1 a 24:1; com a concentração de xilose de 100 g/L foi de 126:1 a 33:1 e com concentração de xilose de 150 g/L foi de 182:1 a 57:1, respectivamente. Neste estudo foi também avaliado o efeito da ureia em combinação com diferentes aminoácidos sobre a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis*. De acordo como os autores, quando a ureia ou aminoácidos foram utilizados como única fonte de nitrogênio, o acúmulo de etanol foi de 11 e 24 g/L, respectivamente. Entretanto, quando se utilizou uma combinação destas fontes (80% de ureia e 20% de aminoácidos) a uma relação C:N de 37:1, a produção de etanol atingiu 46 g/L.

Silva, J.P.A. et al. (2011) avaliaram a influência de ureia e extrato de levedura na composição do meio de fermentação, sobre a produção de etanol a partir de xilose pela levedura *Scheffersomyces stipitis*. Estes autores verificaram grande influência do tipo de fonte de nitrogênio, sobre a produtividade volumétrica em etanol e a velocidade de consumo de substrato. Quando o meio empregado foi a ureia como única fonte de nitrogênio, a levedura consumiu de forma insuficiente a xilose e consequentemente não produziu etanol. No entanto, quando foi utilizado extrato de levedura como única fonte de nitrogênio, foram obtidos valores de Q_P e Q_S cerca de 0,33 e 0,89 g/L/h, respectivamente, e, com a combinação ureia e extrato de levedura na composição do meio de fermentação, a levedura apresentou valores Q_P e Q_S próximos a 5,05 e 1,38 g/L/h, respectivamente.

Em relação às outras fontes nutricionais, as vitaminas, tais como biotina, riboflavina, niacina, tiamina, entre outras, são importantes reguladores e cofatores de diversos processos metabólicos. Entre os íons inorgânicos que atendem à demanda como macro e micronutrientes necessários para o crescimento de leveduras, estão o fósforo e o enxofre, além de importantes cátions, como zinco, manganês, magnésio, cálcio, cobre, potássio e ferro (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O íon magnésio influencia diretamente na velocidade de crescimento das leveduras, no consumo de açúcar e na produção de etanol, e em geral é exigido pela levedura na faixa de concentração milimolar (REES; STEWART, 1997). Este composto participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimula a síntese de ácidos graxos essenciais, regula os níveis iônicos celulares, a ativação de ATPases na membrana e a absorção de fosfato juntamente com potássio (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1994).

O íon cálcio é necessário em concentrações da ordem de miligrama por litro (PELCZAR; CHANG; KRIEG, 1996), podendo interferir na velocidade da glicólise de piruvato a etanol, influenciando diretamente na eficiência da fermentação. Zeng et al. (2010) verificaram que a presença de cloreto de cálcio favorece a produção de etanol por uma linhagem recombinante de *Zymomonas mobilis*. Os autores observaram que a presença deste sal aumenta a estabilidade da membrana celular, uma vez que auxilia na transferência de compostos visando manter o equilíbrio iônico e as funções da membrana plasmática. Desta maneira,

o cloreto de cálcio pode exercer um papel crucial para a viabilidade em meios estressantes como hidrolisados ácidos.

O zinco é um elemento necessário em várias atividades enzimáticas relacionadas com as enzimas álcool desidrogenase, aldolase, fosfatase alcalina, DNA e RNA-polimerase (MAYALAGU; PATTURAJAN; CHATTERJI, 1997). Estes componentes em meio de fermentação são fatores importantes com efeito significativo sobre a fisiologia de leveduras e produção de etanol (BIRCH; WALKER, 2000). Sreenath; Jeffries (2000) observaram que a presença de 10 mg /L de zinco, juntamente com outros nutrientes suplementados no meio de fermentação formulado com hidrolisado de madeira aumentou a taxa de utilização de açúcar, quando em comparação com a ausência de zinco. O aumento na produção de etanol ocasionada pela adição de zinco foi, provavelmente, devido à elevada atividade dependente de zinco, de álcool desidrogenase (ADH) na via fermentativa (HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

Segundo Ranzan (2010), o fósforo também tem papel importante nas vias metabólicas que são iniciadas com uma fosforilação do substrato. Esse elemento, constituinte das moléculas de ATP, é absorvido pelas células sob a forma de sais, como KH_2PO_4 ou K_2HPO_4 . Já o enxofre, constituinte estrutural da célula, é de grande importância para a formação de proteínas, e pode ser suprido por metionina, cisteína e sulfatos (FRANÇA; RODRIGUES, 1985).

Vários trabalhos da literatura que relatam o emprego da levedura *Scheffersomyces stipitis* na conversão de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes materiais utilizam meios de fermentação suplementados com diversos nutrientes, como os mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósico suplementados com diferentes nutrientes por diferentes linhagens de *Scheffersomyces stipitis*

Micro-organismo	Matéria-prima	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L/h)	Suplementação	Tempo de fermentação (h)	Referência
<i>Scheffersomyces stipitis</i> DSM 3651	Palha de trigo	0,4	0,3	Extrato de Levedura (10 g/L), Peptona (20 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,47 g/L), KH ₂ PO ₄ (12,8 g/L), Na ₂ HPO ₄ (0,51 g/L) e MgSO ₄ .7H ₂ O (0,47 g/L)	72	BELLIDO et al. 3(2013)
<i>S. stipitis</i> CBS6054	Bagaço de cana-de-açúcar	0,39	0,079	Extrato de levedura (4,25 g), ureia (5,68 g) e peptona (16,4 g) em 50 mL	36	BISWAS; UELLEND AHL; AHRING (2013)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Bagaço de cana 30 g/L de açúcares totais	0,29	-	Peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L), CaCl ₂ (0,1 g/L) e (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,0 g/L)	96	MILESSI et al. (2013)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Casca de café	0,26	0,36	Glicose (30 g/L), E.L. (3,0 g/L), (NH ₄) ₂ HPO ₄ (3,0 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (1,0 g/L).	30	MUSSATTO et al. (2012)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124 CBS6054	Gigant reed (<i>Arundo donax</i> L.) 26 g/L de açúcares totais	0,33	-	Ureia (5 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5 g/L), KH ₂ PO ₄ (1 g/L)	48	SCORDIA et al. (2012)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Bagaço de cana-de-açúcar	0,46	0,29	Peptona (5,0 g/L), E.L. (3,0 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,0 g/L) e CaCl ₂ (0,1 g/L)	48	SILVA, D.D.V.D. et al. (2011)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Casca de avelã 50 g/L açúcares totais	0,432	0,186	Ureia (6,4 g/L), KH ₂ PO ₄ (1,2 g/L), Na ₂ HPO ₄ (0,18 g/L), E.L. (10 g/L), traços de: CaO, ZnO, FeCl ₃ .6H ₂ O, MgO, CuSO ₄ .5H ₂ O, CoCl ₂ .6H ₂ O, H ₃ BO ₃	125	ARSLAN; EKEN-SARAÇOĞLU (2010)

(Continua)

(Continuação)

Micro-organismo	Matéria-prima	YP/S (g/g)	QP (g/L/h)	Suplementação	Tempo de fermentação (h)	Referência
<i>S. stipitis</i> DSM3651	Bagaço de cana 26,8 g/L açúcares totais	0,3	-	Extrato de levedura (3,0 g/L), Extrato de malte (3,0 g/L) e Peptona (5,0 g/L)	48	CANILHA et al. (2010)
<i>S. stipitis</i> KCCCM12009	Álamo Amarelo (<i>Arundo donax</i> L.)	0,48	0,4	E.L (5,0 g/L), K ₂ HPO ₄ (1,0 g/L) MgSO ₄ (1,0 g/L)	72	CHO et al. (2010)
<i>S. stipitis</i> CBS 5773	Resíduo da indústria de papel	0,29	0,47	Novozym 188	48	MARQUES et al. (2008)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Semente de girassol 24-30 g/L de açúcares totais	0,32	0,065	Uréia (6,4 g/L), KH ₂ PO ₄ (1,2 g/L), Na ₂ HPO ₄ (0,18 g/L), extrato de levedura (10 g/L), traços de: CaO, ZnO, FeCl ₃ . 6H ₂ O, CuSO ₄ .5H ₂ O, CoCl ₂ .6H ₂ O, H ₃ BO ₃ , MgO	200	TELLI-OKUR; EKEN- SARAÇOĞLU (2008)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Palha de arroz	0,32	0,24	Uréia (2,3 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (1,0 g/L) e E.L. (3,0 g/L)	48	SILVA (2007)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Jacinto de água (<i>Eichhornia crassipes</i>)	0,19	0,02	CuSO ₄ .H ₂ O (2,5 g/L) FeCl ₃ .6H ₂ O (2,7 g/L), MnSO ₄ .H ₂ O (1,7 g/L), Na ₂ Mo ₂ O ₄ .2H ₂ O (2,42 g/L), ZnSO ₄ .7H ₂ O (2,87 g/L), CaCl ₂ .6H ₂ O (2,4 g/L).	30	NIGAM (2002)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Palha de trigo	0,36	0,3	Biotina (0,1mg/L), CaCl ₂ .2H ₂ O (0,05g/L) e Tiamina (4 g/L)	120	NIGAM (2000)
<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	Sabugo de milho 35,9 g/L de açúcares totais	0,34	0,11	Ureia (6,4 g/L), KH ₂ PO ₄ (1,2 g/L) Na ₂ HPO ₄ (0,18 g/L), E.L. (10 g/L), traços de: CaO, ZnO, FeCl ₃ .6H ₂ O, CuSO ₄ .5H ₂ O, MgO, CoCl ₂ .6H ₂ O e H ₃ BO ₃	96	EKEN- SARAÇOĞLU; ARSLAN (2000)
<i>S. stipitis</i> FPL-Y606	Mistura de madeira	0,49	0,26	Ureia (2,27 g/L), peptona (6,56 g/L), ZnSO ₄ (10 mg/L)	75	SREENATH; JEFFRIES (2000)

Fonte: Arquivo pessoal

(conclusão)

2.7 BIORREATORES E PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os reatores biológicos são onde ocorre a reação biológica e por esse motivo são um elemento fundamental em qualquer processo biotecnológico (TEIXEIRA; DA FONSECA, 2007). Eles abrangem um largo espectro em escala e aplicações, desde a obtenção de uma grande diversidade de produtos como enzimas, antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos, solventes, ou ainda no tratamento de resíduos orgânicos industriais ou domésticos (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

As configurações de reatores biológicos mais comumente utilizadas são apresentadas na Figura 2.12 (SCHMIDELL et al., 2001). Referem-se ao modelo de biorreator empregado, devem-se considerar aspectos como configuração e tamanho do biorreator, condições de processo e modo de operação, uma vez que estes aspectos têm um impacto significativo no processo (SCHMIDELL et al., 2001).

Para selecionar o tipo de reator biológico mais adequado para um determinado processo são necessários estudos de mistura, de transferência de calor e de massa entre as fases em presença e de construção, operação e manutenção. Além disso, é igualmente necessário obter informações sobre o sistema biológico que vai ser utilizado, a sua resistência mecânica, as suas necessidades nutricionais, bem como as características reológicas do meio, dentre outras (TEIXEIRA; DA FONSECA, 2007).

Van't Riet; Tramper (1991) sugerem algumas alternativas práticas para orientar a escolha de um biorreator. Se a viscosidade do meio for superior a $0,1 \text{ N.s.m}^2$ deve-se utilizar reator de tipo tanque agitado, pois as colunas de bolhas e os “*air-lift*” não têm boas características de transferência de massa gás-líquido para aqueles valores de viscosidade. Entretanto, se for necessária flexibilidade quanto a viscosidade do meio e do arejamento, então será necessário, novamente, reator tipo tanque agitado, pois nem a coluna de bolhas nem o *air-lift* serão suficientemente versáteis no que se refere a esses requisitos. No intuito de realizar uma fermentação com meio pouco viscoso e a grande escala (50 a 500 m^3), deve-se empregar uma coluna de bolhas pois é o tipo de reator de menor custo. Já se a fermentação for inserida a uma escala ainda maior (200 a 1000

m³), a opção deverá ser sobre o *air-lift* porque permite adições locais de substrato. Um reator do tipo tanque agitado necessitaria de uma potência de agitação muito elevada (> 1MW) para reatores de volume superior a 500m³.

O biorreator de tanque agitado é o tipo de reator mais utilizado em processos industriais (TEIXEIRA; DA FONSECA, 2007). O agitador desempenha várias funções simultaneamente, auxilia a transferência de massa e de calor e agita e homogeneiza as suspensões. Este biorreator apresenta vantagens importantes, permitindo um controle simples da dispersão de gás e da agitação do meio por alteração da velocidade do agitador, que é o responsável por uma dispersão de gás eficiente e pela possibilidade de empregar este tipo de reator em fermentações com meios muito viscosos (TEIXEIRA; DA FONSECA, 2007).

Figura 2.12 – Classificação geral dos biorreatores

Fonte: Adaptado de (SCHMIDELL et al., 2001)

2.7.1 Processo Fermentativo em Regime de Batelada Alimentada

Os processos fermentativos podem ser divididos em batelada, simples, contínuo, semicontínuo e batelada alimentada (fed-batch) de acordo com a operação e o produto a ser escolhido.

Os primeiros a utilizarem o termo cultura por processo descontínuo alimentado "fed-batch" foram Yoshida; Yamane; Nakamoto (1973) para descrever uma fermentação descontínua continuamente alimentada com meio nutriente. O processo fed-batch é definido como uma técnica em processos microbianos, em que um ou mais nutrientes são acrescentados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos permanecem-no fermentador até o final da fermentação (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A vazão da alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. A mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de alimentação de dornas com nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que o metabolismo microbiano seja conduzido para determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). A escolha adequada da vazão de alimentação conduz a melhores resultados de produtividade e rendimento do processo (CHENG et al., 2009; SILVA, 2010).

Segundo de Oliveira (1995), uma característica importante do processo batelada alimentada é a possibilidade de manter a concentração de substrato em níveis muito baixos em um sistema. As principais vantagens do processo batelada alimentada em relação ao processo batelada simples são: a possibilidade de controle do substrato, pelo uso de uma determinada vazão de alimentação e de uma determinada concentração de substrato na alimentação; a possibilidade de obtenção de elevadas concentrações de metabólitos; o aumento da produtividade em células e em produto e também uma maior facilidade no emprego de sistemas de controle avançados.

Entretanto, existem desvantagens, como a dificuldade de manutenção e assepsia por períodos longos, a possibilidade de ocorrência de mutação dos

micro-organismos e a dificuldade de manutenção de homogeneidade no reator (DE OLIVEIRA, 1995).

A condução de um processo fermentativo em sistema descontínuo alimentado é normalmente empregada para se obter altas concentrações celulares (ELLISTON et al., 2013) e altas produtividades (UNREAN; NGUYEN, 2013), além de permitir controlar os níveis de nutrientes ou catabólitos no biorreator para se obter os níveis desejados do produto de interesse (CHENG et al., 2009; CARRASCO et al., 2013; UNREAN; NGUYEN, 2013) .

Existem várias estratégias que podem ser utilizadas no sistema descontínuo alimentado, dependendo dos objetivos a serem atingidos. Dentre eles destacam-se a batelada alimentada repetida (FURLAN; DELIA-DUPUY; STREHAIANO, 1997), a vazão exponencial de alimentação (RODRIGUES; SILVA; FELIPE, 1998) e a batelada alimentada com volume constante no meio (GAO; TAN, 2003). A batelada alimentada permite obter altas taxas de formação de produto com baixa taxa de crescimento.

A estratégia do cultivo com batelada alimentada com controle da taxa de crescimento específico pela alimentação do substrato pode ser aplicado para evitar a inibição do substrato e o acúmulo de sub-produtos indesejáveis, que são necessários para alcançar melhor rendimento e produtividade do produto desejado (UNREAN; NGUYEN, 2013).

A principal vantagem do processo de batelada alimentada está relacionada com a repressão catabólica que é reduzida ou eliminada pela alimentação alternada do substrato. Apesar de o substrato exercer um efeito inibitório, as suas adições intermitentes melhoram a produtividade da fermentação pela manutenção de baixa concentração de substrato durante o processo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Os hidrolisados hemicelulósicos, além dos inibidores, outros açúcares podem interferir no metabolismo de xilose, e que podendo ter seus efeitos minimizados empregando-se a fermentação descontínua alimentada (RODRIGUES; SILVA; FELIPE, 1998). Além disso, a inibição causada por altas concentrações de xilose pode ser minimizada (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Por exemplo, Rodrigues; Silva; Felipe (1998) avaliaram a obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo alimentado, utilizando vazão exponencial de alimentação num fermentador de 5 L

a 30 °C, agitação de 300 min 0,4 vvm e volume de meio 2,5 L. A alimentação do meio preparada com hidrolisado foi iniciada com diferentes níveis de concentração de xilose 20, 30 e 40 g/L. A maior produtividade 0,62 g/L foi alcançada utilizando 73 g/L de xilose na alimentação e mantendo-se 40 g/L de xilose no reator, obtendo-se nestas condições 44 g/L de xilitol com um fator de conversão de 0,79 g/g e eficiência de fermentação de 85%.

Em outro estudo, Cheng et al. (2009) investigaram a produção de etanol por *S. cerevisiae* em fermentação em processo descontínuo alimentado, contendo glicose 50 g/L extrato de levedura 1,0 g/L, KH_2PO_4 5,0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/L e pH 5,0. Utilizou-se glicose com concentrações de 2 g/L, 4 g/L e 8 g/L como taxa de alimentação, iniciada na fase exponencial (6h-30h) e agitação de 250 rpm, 30 °C, aeração de 1,0 vvm em um tempo de fermentação de 42 horas. A produção máxima de etanol foi alcançada com a concentração de $2\text{gL}^{-1}\text{hr}^{-1}$ com rendimento de 2.47 g/g.

Em outra investigação Taherzadeh; Niklasson; Lidén (2000) avaliaram a produção de etanol por *S. cerevisiae* em fermentação em processo descontínuo alimentado, baseado na estratégia de controle e medição on-line da evolução do dióxido de carbono (CER) para controlar a taxa de alimentação do substrato em um biorreator de escala laboratorial. A estratégia de controle foi baseada na razão entre o aumento relativo da (CER) e o aumento relativo na taxa de alimentação. Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066 com diferentes tipos de hidrolisados de resíduos florestais suplementados com 50 g/L de D-glucose, 7,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,5 g/L de KH_2PO_4 ; 0,75 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30 mg/L de EDTA, 9 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 9 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg/L H_3BO_3 ; 1,55 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,8 mg/L $\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,6 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,6 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,2 mg/L de KI, 50 µg/L d-biotina, 0,2 mg/L de ácido p-aminobenzóico, 1 mg/L de ácido nicotínico, 1,0 mg/L de pantotenato de cálcio, 1,0 mg/L de cloridrato de piridoxina, 1,0 mg/L de cloridrato de tiamina, 25 mg/L de m-inositol, 0,5 ml/L de antiespumante (Sigma 289), 10 mg/L de ergosterol e 420 mg/L de Tween 80. O processo foi conduzido a 30 °C, 450 rpm, pH 5,0. O biorreator foi preenchido com de 1L de meio, sendo as concentrações de vitaminas e sais minerais foram triplicadas para compensar a diluição que ocorreu durante a alimentação com o hidrolisado. O “fed-batch” começou após o consumo de toda a glicose. A taxa de alimentação inicial foi 25 mL/h, sendo a

taxa de alimentação mínima permitida. A operação parou com um volume de líquido cerca de 2,8 litros.

Carrasco et al. (2013) avaliaram o potencial de *Scheffersomyces stipitis* CBS6054 para fermentar hidrolisado de Paja Brava, gramínea boliviana, usando o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSCF). O processo descontínuo alimentado iniciou-se após o processo descontínuo e a retirada de todo o etanol formado. O volume total do substrato foi 1,1 L. A taxa de alimentação usada foi de 0,04 L/h aumentada para 0,10 L/h em 16 h. Nos experimentos com batelada alimentada um total de seis porções do meio suplementado, a cada duas horas, com 35 g/L de glicose durante 12 horas para alcançar o conteúdo final de WIS, sólido insolúvel em água, desejado (de partida: 6 até 10% WIS). As fermentações SSCF foram realizadas com agitação de 500 rpm, temperatura de 35 °C, pH de 6,0 e concentração celular de 5 g/L. Duas taxas de aeração, 20 e 40 mL/min foram testadas. As amostras para análise de metabólitos foram tiradas após 0, 2, 4, 6, 8, 24, 28, 32, 48, 72 e 96 h. O rendimento mais elevado no processo em batelada alimentada corresponde com o maior grau de conversão dos açúcares no meio líquido, em particular de arabinose, para a qual a conversão foi dobrada (de 48% para 97%).

Já Unrean; Nguyen (2013) investigaram como a composição do meio de alimentação e a taxa de crescimento de células influenciaram na eficiência da produção de etanol. A estratégia visou controlar o cultivo de *S. stipitis* a uma taxa de crescimento ideal por meio de modelo cinético de batelada alimentada para alcançar alto rendimento e produtividade de etanol durante o cultivo em batelada alimentada. O processo descontínuo alimentado foi realizado nas mesmas condições do processo descontínuo em um biorreator de 2 L com 1 L de volume e de trabalho, a 29,4 °C, pH 5,6, aeração de 1 vvm e agitação de 136 rpm. A fermentação descontínua alimentada foi realizada durante 6 dias. A cultura em descontínuo com alimentação foi mantida com um volume de trabalho de 100 mL por amostras de 10 mL de meio de cultura antes da alimentação de pulso de 10 mL de meio de alimentação sob investigação após cada 24 h. O rendimento de 0,40 g/g e a produtividade de 0,42 g/L/h de etanol foi obtido utilizando a composição do meio de alimentação ótima de 6,7 vezes, suplementado com 33,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6,7 g/L de KH_2PO_4 ; 3,35 g/L de MgSO_4 ; 0,67 g/L de NaCl; 0,67 g/L

de CaCl_2 e 6,7 g/L de extrato de levedura suplementada com 200 g/L de glicose e 67 g/L de xilose.

3 OBJETIVOS

Geral

Contribuir para o desenvolvimento de tecnologia de obtenção de etanol de segunda geração, a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação nutricional na produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e propor, suplementação favorável visando maximizar a produtividade em etanol.
- Otimizar as condições operacionais, agitação, aeração e pH inicial, para o processo descontínuo de produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *Scheffersomyces stipitis* em fermentador de 1 litro.
- Avaliar o desempenho da levedura *Scheffersomyces stipitis* no processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* em fermentador de 2 litros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

4.1.1 Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi cedido pela Usina de Açúcar e Álcool Costa Pinto do Grupo Cosan, localizada na cidade de Piracicaba/SP. Ele foi seco ao sol, moído em moinho de facas rotatórias (MARCONI) e peneirado por malha de 20 mesh.

4.1.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e a celulignina, massa sólida formada após o pré-tratamento, foram caracterizados quanto aos seus compostos químicos (teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), segundo a metodologia descrita por (GOUVEIA et al., 2009). Para estas determinações, foram realizadas triplicatas contendo 2 g (massa seca) de cada variedade de amostra. Em um béquer de vidro de 100 mL, as amostras de 0,1 mg foram tratadas com 10 mL de H₂SO₄ a 72% (v/v), mantidas em banho termostatizado a 45 °C por 7 minutos, permanecendo em contínua agitação durante todo o processo. A reação foi então interrompida com 275 mL de água destilada, e o material foi transferido quantitativamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL. Estes frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. A fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo Whatman® n°1.

O hidrolisado resultante foi analisado quanto as concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Para a quantificação da celulose e hemicelulose presente nas amostras, utilizaram-se, respectivamente, as seguintes equações:

$$C = Cel * 0,95 + Gli * 0,9 + HMF * 1,29 \quad \text{.....(4.1)}$$

Onde, C: celulose, Cel: celubiose, Glic: glicose e HMF: hidroximetilfurfural

$$H = Xil * 0,88 + Ara * 0,88 + Fur * 1,38 + A.A * 0,7 + A.F * 3,09 \quad (4.2)$$

Onde, H: Hemicelulose, Xil: xilose, Ara: arabinose, Fur: furfural, A.A: ácido acético e A. F: ácido fórmico.

Para determinação da lignina solúvel presente no hidrolisado, 5 mL do hidrolisado foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL e adicionados de 40 gotas de NaOH 6,5 M. Os volumes dos balões foram devidamente completados com água destilada e homogeneizados. A determinação foi realizada pela medida de absorbância a 280 nm e analisada pela equação abaixo utilizando valores de absorbância previamente determinados (ROCHA et al., 2012) e considerando as taxas de diluição.

$$C_{lig} = 0,04187 * (A - Adp) - 0,0003279 \quad (4.3)$$

Onde, C_{lig} : concentração de lignina solúvel (g/L), A: absorbância da solução a 280nm Adp: absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares furfural e HMF a 280nm

$$Adp = (C_F * \epsilon_F + C_{HMF} * \epsilon_{HMF}) \quad \text{.....(4.4)}$$

onde:

Adp: absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares furfural e HMF a 280nm

C_F : concentração de furfural

C_{HMF} : concentração de hidroximetilfurfural

ϵ_F : absorvidades do furfural do furfural ($146,85 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Rocha et. al., 2012)

ϵ_{HMF} : absorvidades do do HMF ($114,00 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) (Rocha et. al., 2012)

O material sólido retido no papel-filtro qualitativo foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, seco ao ar e, em seguida, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os filtros contendo o material retido foram transferidos para cadinhos previamente tarados, tampados e acondicionados em mufla de aquecimento elétrico, onde permaneceram a 800 °C por 2 horas. Após o resfriamento, os cadinhos contendo o material foram transferidos para dessecadores e posteriormente quantificados gravimetricamente quanto ao teor de cinzas pela seguinte equação (GOUVEIA et al., 2009):

$$\text{Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} * 100 \quad (4.5)$$

Onde: M_C : Massa de cinzas, M_A : Massa de amostra base, seca.

A lignina insolúvel presente nas amostras foi determinada a partir da diferença entre as massas do resíduo seco e a massa de cinzas contida nos cadinhos pela seguinte equação (GOUVEIA et al., 2009):

$$L_{KI} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (4.6)$$

onde: L_{KI} : Lignina Klason insolúvel, M_K : Massa seca de lignina insolúvel (g), M_C : Massa de cinzas (g), M_A : Massa da amostra base seca (g).

4.1.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar: hidrólise ácida

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido em reator de aço inox com volume efetivo de 250 litros, localizado no departamento de Engenharia Química da EEL/USP. O bagaço foi percolado com H₂SO₄ (98 %) como catalisador em uma razão de 100 mg H₂SO₄/ g de matéria seca durante 20 minutos à temperatura de 121 °C, utilizando-se uma proporção de 1/10 entre massa de bagaço e volume da solução de H₂SO₄ (CARVALHO et al., 2007; DUSSÁN, 2013; MILESSI et al.,

2013). Depois de resfriado, o hidrolisado hemicelulósico foi filtrado, centrifugado e armazenado em câmara fria a 4°C.

4.1.4 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) foi submetido a um processo de concentração a vácuo a um fator de concentração de 5, ou seja, correspondente a 5 vezes o seu teor inicial de açúcares com a finalidade de aumentar a concentração inicial de xilose e reduzir o teor de compostos tóxicos voláteis. Esta etapa foi realizada em um concentrador de aço inox, com capacidade volumétrica de 30 litros a 70 °C (FERREIRA; DUSSÁN; et al., 2011; MILESSI et al., 2013). Após este procedimento o hidrolisado foi armazenado em câmara fria a 4 °C para depois ser submetido ao processo de destoxificação.

4.1.5 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado concentrado foi destoxificado para reduzir o teor de inibidores. Neste procedimento, realizou-se a elevação do pH até 7,0 com óxido de cálcio, seguida pela redução do pH até 5,5 com ácido fosfórico e pela adição de carvão ativo na proporção 2,5% m/v, sendo a mistura mantida em incubadora de movimento rotatório a 200 rpm sob 30 °C por 1 hora, conforme metodologia estabelecida por (ALVES et al., 1998). Após cada etapa do tratamento de destoxificação o hidrolisado foi filtrado sob vácuo e autoclavado sob pressão manométrica de 0,5 atm (110 °C) por 15 minutos.

Após as etapas de destoxificação o hidrolisado hemicelulósico foi caracterizado quimicamente para determinação de seus açúcares e inibidores por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.2 PROCESSO FERMENTATIVO

4.2.1 Micro-organismo

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria - Illinois (EUA) e mantidas em placas contendo meio ágar extrato de malte a 4 °C.

4.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 50 ml de meio composto por 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 30 g/L de xilose (FERREIRA; MUSSATTO; et al., 2011; MILESSI et al., 2013b). As células foram cultivadas em incubadora com movimento rotatório (Quimis) com agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por 24 horas. Após este período as leveduras foram recuperadas por centrifugação a 2600 x g por 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados desta solução foram utilizados como inóculo, estimados pela leitura da absorbância a 600 nm, por espectrofotometria correlacionada à concentração celular com a absorbância em uma curva de calibração previamente estabelecida para levedura *Scheffersomyces stipitis*, a fim de se obter uma concentração inicial de 1,0 g/L de células.

4.2.3 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

Na primeira etapa da avaliação da suplementação nutricional foram realizados testes de fermentação visando avaliar o efeito dos nutrientes de acordo com as suplementações verificadas na literatura pertinente por diferentes autores

(Tabela 2.4). Para tanto foram avaliados os nutrientes sulfato de magnésio (MgSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4), cloreto férrico (FeCl_3), cloreto de cálcio (CaCl_2), ureia, extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), a fim de verificar seus efeitos sobre o processo de produção de etanol. Para o estudo foi empregado o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central para estudar a influência de nove fatores envolvidos (SANTOS, 2007). Na Tabela 4.1 estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central.

Estes ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de hidrolisado HHBCA destoxificado, empregando células livres de *Scheffersomyces stipitis* em uma concentração inicial de 1g/L. A suplementação foi realizada de acordo com o delineamento experimental. Os frascos foram mantidos em incubadora de movimento rotatório sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C. A fermentação foi conduzida por um período de 96 h com retirada de amostras a cada 24 h para determinação de pH, concentração celular, açúcares, ácido acético e etanol. Os ensaios foram executados em ordem aleatória para minimizar a ocorrência de erros sistemáticos. As análises dos dados foram feitas com o auxílio do programa estatístico STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc. OK, USA).

Tabela 4.1 – Níveis codificados para as variáveis MgSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , CaCl_2 , Ureia, Extrato de Levedura, Peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para estudo da influência destes nutrientes na produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Parâmetros (g/L)	Níveis		
	Inferior (-)	Central 0	Superior (+)
MgSO_4	0	0,25	0,50
ZnSO_4	0	0,005	0,01
FeCl_3	0	0,050	0,10
CaCl_2	0	0,050	0,10
Ureia	0	1,50	3,00
Extrato de Levedura	0	1,50	3,00
Peptona	0	1,50	3,00
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	1,50	3,00
KH_2PO_4	0	1,00	2,00

Fonte: Arquivo pessoal

Em seguida, com os melhores resultados dos experimentos reportados foram realizados novos ensaios fermentativos com o objetivo de otimizar as concentrações de extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio, sulfato de magnésio e sulfato de zinco em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de hidrolisado HHBCA destoxificado, empregando células livres de *Scheffersomyces stipitis* com concentração inicial de 1,0 g/L. A suplementação foi realizada de acordo com um novo planejamento de mistura, (Tabela 4.2) (CAMPOS; AMORIM; FERREIRA, 2007) mantendo sulfato de magnésio (MgSO_4) e sulfato de zinco (ZnSO_4) constantes com 0,01 g/L e 0,5 g/L respectivamente. A fermentação foi conduzida por 96h e amostras foram retiradas a cada 24h e analisadas quanto ao pH, concentração celular e o teor de açúcares, ácido acético e etanol em CLAE.

Tabela 4.2 - Matriz do planejamento de mistura para o estudo da influência das variáveis extrato de levedura (E.L.), peptona e fosfato de potássio (KH_2PO_4), em níveis codificados e reais, na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis Reais		
	X_1	X_2	X_3	Extrato de Levedura (g/L)	Peptona (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)
1	1,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00	0,00	3,00	0,00
3	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	3,00
4	0,50	0,50	0,00	1,50	1,50	0,00
5	0,50	0,00	0,50	1,50	0,00	1,50
6	0,00	0,50	0,50	0,00	1,50	1,50
7	0,67	0,17	0,17	2,00	0,50	0,50
8	0,17	0,67	0,17	0,50	2,00	0,50
9	0,17	0,17	0,67	0,50	0,50	2,00
10	0,33	0,33	0,33	1,00	1,00	1,00

Fonte: Arquivo pessoal

Os experimentos foram realizados em duplicata. ZnSO_4 : 0,01 g/L e MgSO_4 : 0,5 g/L foram mantidos constantes

Com a finalidade de comprovar a efetiva otimização do processo foram realizados os experimentos em duplicata, e uma nova fermentação em condições otimizadas. Os ensaios foram executados em ordem aleatória para minimizar a

ocorrência de erros sistemáticos. As análises dos dados foram feitas com o auxílio do programa estatístico STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc. OK, USA).

4.2.4 Fermentação em biorreatores de bancada do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis* usando diferentes regimes de fermentação.

4.2.4.1 Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em Fermentadores de Bancada

Ensaio iniciais foram conduzidos em biorreator de bancada com capacidade total de 1 litro New Brunswisck Scientific Co., USA, modelo Multigen (Figura 4.1) com controle de temperatura e agitação. Foram utilizados 600 mL de meio de fermentação.

Figura 4.1 - Biorreator de bancada com capacidade total de 1 litro New Brunswisck Scientific Co. USA, modelo Multigen

Fonte: Arquivo pessoal

A esterilização do fermentador foi realizada em autoclave sob pressão manométrica de 1 atm (121 °C) por 15 minutos. O fermentador foi equipado por sensores de pH, de temperatura e de oxigênio dissolvido (DO) e um condensador, e operado em modo descontínuo. O ar foi adicionado constantemente durante o processo de fermentação através de um compressor de ar cuja entrada de ar no

biorreator foi realizada por um “*sparger*”. A vazão de ar para cada ensaio (Tabela 4.3) foi controlada por um rotâmetro e medida com um fluxímetro de bolha. Os parâmetros pH e DO foram medidos por um transmissor Mettler Toledo M300 multiparâmetro de dois canais.

O processo foi iniciado pelo preenchimento do biorreator com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar previamente destoxificado, suplementado de acordo com a condição determinada nos experimentos em frascos Erlenmeyer (item 4.2.3), sendo também adicionado antiespumante. Em seguida os parâmetros operacionais foram ajustados para temperatura de 30 °C e pH_{inicial}, vazão de ar e agitação segundo planejamento central composto rotacional com três repetições no ponto central. A concentração inicial de células de *S. stipitis* no biorreator foi de 1,0 g/L, para todos os ensaios. Na Tabela 4.3, o sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central. Como variável resposta foi considerada o fator de rendimento de xilose em etanol.

Tabela 4.3 – Níveis codificados para o estudo da influência das variáveis agitação, aeração e pH inicial na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de bancada com capacidade nominal de 1 litro.

Parâmetros	Níveis				
	Axial (-α)	Inferior (-)	Central 0	Superior (+)	Axial (+α)
X ₁ (pH inicial)	4,32	5,00	6,00	7,00	7,68
X ₂ (vazão de ar, vvm)	0,03	0,20	0,45	0,70	0,87
X ₃ (Agitação, rpm)	99	150	225	300	351

Fonte: Arquivo pessoal

O processo em batelada foi conduzido até 96 h, com retiradas periódicas de amostras a cada 12 h para determinação de pH, concentração de células, xilose, glicose, arabinose, xilitol, etanol e ácido acético posteriormente analisadas em CLAE.

Depois da determinação da melhor condição experimental, a produção de etanol foi conduzida em reator agitado - STR adquirido da Bioengineering (Wald, Suíça) tipo KLF2000, com capacidade nominal de 2,4 litros (Figura 4.2) contendo 1,5 L de meio nutricional.

Segundo Dussán et al. (2016), que também investigou o uso desse equipamento, o fermentador foi equipado por sensores de pH, de temperatura e

de oxigênio dissolvido (DO), um condensador e um banho termostático (Spencer) e operado em modo descontínuo. O ar comprimido foi adicionado com o auxílio de uma bomba de ar constantemente durante o processo de fermentação. A instrumentação e controle do fermentador incluíram um sistema de controle direto dos parâmetros do processo, temperatura e agitação, sendo que os parâmetros pH e DO foram medidos por um transmissor Mettler Toledo M300 multiparâmetro de dois canais. As medidas de vazão de ar foram realizadas conforme descritas no fermentador New Brunswick de 1L. O processo de esterilização foi realizado “in situ” com aquecimento elétrico (800W) e jaqueta de segurança.

As condições de agitação, aeração e pH inicial foram definidas baseando-se nos valores otimizados obtidos no fermentador New Brunswick de 1L. Com esses valores de agitação e aeração foi possível calcular o coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (k_La) inicial. Para escalar o processo para o fermentador de 2,4 L foi fixada a agitação otimizada e foi variada a vazão de ar até atingir o kLa desejado.

O processo em batelada foi conduzido a 30 °C por um período de 96 h, com retiradas periódicas de amostras a cada 12 h para determinação de pH, concentração de células, xilose, glicose, arabinose, xilitol, etanol e ácido acético.

Figura 4.2 - Biorreator agitado – STR capacidade total de 2,4 L empregado no processo de obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando as leveduras *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

4.2.4.2 Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em Fermentador STR em batelada alimentada

O processo em batelada alimentada foi conduzido em reator agitado - STR Bioengineering (Wald, Suíça) tipo KLF2000, com capacidade nominal de 2,4 litros equipado conforme o processo descontínuo (item 4.2.4.1). Os parâmetros operacionais, volume inicial e final do meio, vazão de ar, agitação, temperatura e aeração, foram ajustados segundo a Tabela 4.4. O meio de fermentação foi hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de levedura (0,5 g/L), peptona (2,0 g/L), fosfato de potássio (0,5 g/L), sulfato de magnésio (0,5 g/L), e sulfato de zinco (0,01 g/L), de acordo com as condições otimizadas anteriormente pelo planejamento de mistura (item 4.2.3).

A batelada alimentada ("fed-batch", Figura 4.3) foi controlada utilizando uma bomba peristáltica (Watson). Previamente, foi realizado uma análise da velocidade de consumo do substrato (dS/dt) no processo de fermentação por bateladas com o objetivo de definir o tempo no qual o processo de alimentação devia ser iniciado.

O processo de batelada alimentada foi conduzido durante 60 h, com retiradas periódicas de amostras a cada duas horas após começado o processo de alimentação. Estas amostras foram estocadas para determinação do pH, da concentração de células, xilose, glicose, arabinose, xilitol, etanol e ácido acético.

Tabela 4.4 – Parâmetros operacionais utilizados no processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada

Experimentos	Volume inicial (mL)	Volume de alimentação (mL)	Vazão de ar (L/h)	Agitação (rpm)	pH inicial	Temperatura (°C)	Aeração (vvm)
1	500	1000	0,0833	225	6,0	30	0,3
2	800	700	0,0685	225	6,0	30	0,3
3	1000	500	0,042	225	6,0	30	0,3

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4.3 - Biorreator agitado – STR capacidade total de 2,4L em Batelada alimentada empregado no processo de obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando as leveduras *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinação da concentração celular

A concentração de células no meio de fermentação foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente definida.

4.3.2 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, etanol, furfural e 5- hidroximetilfurfural

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético, etanol, furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas por CLAE em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, USA). Para a análise do teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol, as amostras foram filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de

45 °C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

Para a análise do teor de furfural e hidroximetilfurfural, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6mm x 100mm, 3,5 micras) mantida à temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 µl; detector de ultravioleta UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila/água 1:8 fluxo de 0,8 mL/min.

4.3.3 Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi determinado pela metodologia de “gassing-out”, segundo PIRT (1975). Inicialmente o meio de cultivo isento de células foi reduzido a zero pela da injeção de nitrogênio (N₂). O meio líquido desaerado foi então agitado e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando-se o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo. Por integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (Equação 4.6) foi possível obter a relação apresentada na Equação 4.7:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (4.7)$$

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_L a \times t \quad (4.8)$$

onde: C/C^* corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de oxigênio dissolvido em relação à concentração de saturação).

O gráfico do logaritmo de $(1 - C/C^*)$ em função do tempo permite a determinação do valor de k_La em h⁻¹.

4.3.4 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por meio de aparelho da marca Micronal modelo B 474, com correção de temperatura.

4.3.5 Determinação da concentração de fenóis

Amostras de 5,0 mL dos hidrolisados foram diluídas e os pH foram ajustados para 12 com NaOH 6N. A concentração de fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria a 280 nm como descrito no item 4.1.2.

4.3.6 Determinação dos Parâmetros Fermentativos para processos descontínuos

4.3.6.1 Fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$, g_{etanol}/g_{xilose + glicose})

O fator de conversão, o qual expressa a massa de etanol produzida por massa de xilose consumida, em gramas, foi calculado pela seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P_F - P_I}{S_I - S_F} \quad (4.9)$$

onde: P_F e P_I : concentração final e inicial de etanol, S_I e S_F : concentração inicial e final de xilose e glicose.

4.3.6.2 Eficiência de conversão de xilose em etanol ($\eta\%$)

$$\eta = \left(\frac{Y_{P/S \text{ obtido}}}{Y_{P/S \text{ teórico}}} \right) \times 100\% \quad (4.10)$$

Onde $Y_{P/S \text{ teórico}} = 0,51 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{açúcar}}$ (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

4.3.6.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q_P , $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L/h}$)

A produtividade volumétrica de etanol, a qual expressa a concentração de etanol produzida (g/L) por tempo (h), foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$Q_P = \frac{P_F - P_I}{t} \quad (4.11)$$

onde: P_I : concentração inicial de etanol, P_F : concentração final de etanol, t : tempo de fermentação

4.3.6.4 Fator de rendimento de açúcares em biomassa ($Y_{X/S}$, $\text{g}_{\text{biomassa}}/\text{g}_{\text{xilose}}$)

O fator de conversão, o qual expressa a massa de biomassa produzida por massa de xilose consumida, em gramas, foi calculado pela seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_F - X_I}{S_F - S_I} \quad (4.12)$$

onde: X_F e X_I : concentração final e inicial de células livres, S_F e S_I : concentração final e inicial de xilose + glicose

4.3.6.5 Modelo cinético

O modelo cinético de Monod (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001) foi utilizado para descrever a atividade microbiana. Este modelo expressa a velocidade específica de crescimento do micro-organismo (μ) como uma função da concentração de substrato limitante (S):

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (4.13)$$

onde: μ : taxa de crescimento celular (h^{-1}), $\mu_{\text{máx}}$: máxima taxa de crescimento celular (h^{-1}), K_s : constante de Monod S concentração de substrato limitante

4.3.7 Determinação dos parâmetros fermentativos no processo de batelada alimentada

4.3.7.1 Volume do meio

O volume do meio foi calculado pelo volume inicial mais a taxa de alimentação do substrato em função do tempo, de acordo com a equação (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001):

$$V = V_i + F \cdot t \quad (4.14)$$

onde: V_i : volume inicial (mL), F : taxa de alimentação de substrato (L/h),
 t : tempo (h)

4.3.7.2 Modelo para célula

Considerando que a velocidade de variação de massa de célula no reator corresponde à massa celular formada decorrente do crescimento microbiano e

que a variação do volume é exclusivamente à alimentação (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) \cdot X \quad (4.15)$$

onde:

$\frac{dX}{dt}$: velocidade de variação da concentração celular no fermentador (g/L.h)

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

D : vazão específica de alimentação (h^{-1})

X : concentração celular no fermentador (g/L)

4.3.7.3 Modelo para Substrato

Considerando que a velocidade de variação de massa de substrato no fermentador corresponde à diferença entre a massa de substrato adicionada por tempo e a utilizada para o crescimento celular e produção de produto. Considerando que a variação do volume ocorreu à alimentação, tem-se a equação (4.16) (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001):

$$\frac{ds}{dt} = D \cdot (S_m - S) - r_s \quad (4.16)$$

onde:

$\frac{ds}{dt}$: velocidade de variação da concentração de substrato residual no fermentador (g/L.h)

S_m : concentração de substrato no mosto de alimentação (g/L)

S : concentração de substrato residual no fermentador (g/L)

D : vazão específica de alimentação (h^{-1})

r_s : velocidade de consumo de substrato (g/L.h)

4.3.7.4 Modelo para Produto

Considerando que a concentração de produto na linha de alimentação é zero, tem-se a equação (4.17) (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot X - D \cdot P \quad (4.17)$$

onde:

$\frac{dP}{dt}$: velocidade de variação da concentração de produto no fermentador (g/L.h)

μ_p : velocidade específica de formação de produto (h^{-1})

X : concentração celular no fermentador (g/L)

D : Vazão específica de alimentação (h^{-1})

P : Concentração de produto no fermentador (g/L)

4.3.7.5 Fator de conversão de açúcares em etanol

O rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) foi calculado pela equação (BORGES, 2008):

$$Y_{P/S} = \frac{P(t)V(t) - P_0V_0}{[V(t) - V_0]S_F + V_0S_0 - V(t)S(t)} \quad (4.18)$$

onde:

P : produto (g/L)

P_0 : produto inicial (g/L)

V : volume (mL)

V_0 : volume inicial (mL)

t : tempo (h)

S : concentração de substrato (g/L)

S_0 : concentração de substrato inicial (g/L)

S_F : concentração do substrato do meio alimentado (g/L)

4.3.7.6 Fator de rendimento de açúcares em biomassa

O rendimento em células ($Y_{X/S}$) foi calculado pela equação (BORGES, 2008):

$$Y_{X/S} = \frac{X(t)V(t) - X_0V_0}{[V(t) - V_0]S_F + V_0S_0 - V(t)S(t)} \quad (4.19)$$

onde:

X : biomassa celular (g/L)

X_0 : biomassa inicial (g/L)

V : volume (mL)

V_0 : volume inicial (mL)

t : tempo (h)

S : concentração de substrato (g/L)

S_0 : concentração de substrato inicial (g/L)

S_F : concentração do substrato do meio alimentado (g/L)

4.3.7.7 Produtividade global em etanol

A produtividade volumétrica de etanol, a qual expressa a concentração de etanol produzida (g/L) por tempo (h), foi calculada de acordo com a seguinte equação (BORGES, 2008):

$$Q_p = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (4.20)$$

onde:

P_0 : concentração inicial de etanol

P_f : concentração final de etanol

t : tempo de fermentação

4.3.8 Viabilidade e pureza da cultura

Foram realizadas visualizações microscópicas de lâminas preparadas a fresco, para verificar a viabilidade da cultura da levedura *Scheffersomyces stipitis*. O método consistiu em utilizar 2 mL de solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em igual volume de citrato de sódio 2% (p/v). (ODUMERO et al., 1992).

Para verificar a pureza da cultura utilizaram-se lâminas fixadas e coradas com fucsina. As observações foram realizadas em microscópio óptico digital binocular (LABOMED Digi3 3000) equipado com câmera digital possibilitando o fornecimento de informações sobre a morfologia celular.

4.3.9 Fluxograma do Trabalho

A Figura 4.4 é uma representação esquemática do presente trabalho que foi realizado nos laboratórios do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena-USP.

Figura 4.4 – Fluxograma de trabalho para produção de etanol 2G a partir de HMBCA com as condições definidas.

V_0^* : volume de meio inicial ; V_{alm}^* : volume de alimentação

Fonte: Arquivo pessoal

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A Tabela 5.1 apresenta a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”. Os dados obtidos foram comparados com demais trabalhos em que o bagaço de cana-de-açúcar também foi utilizado como objeto de estudo.

A composição química da amostra de bagaço de cana-de-açúcar investigada no presente trabalho apresentava 34,64 % de celulose, 18,90 % de hemicelulose, 27,61 % de lignina e 6,41 % de cinzas (Tabela 5.1). Os valores obtidos para a composição química estão em concordância aos trabalhos encontrados na literatura que são 35-43% de celulose, 22-30% de hemicelulose, e 13-26% de lignina para bagaço de cana-de-açúcar, conforme pode ser observado também na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referências
39,9 ± 0,587	28,3 ± 0,01	20,4 ± 0,12	3,39 ± 0,41	MORO (2015)
42,6 ± 0,2	26,2 ± 0,5	22,5 ± 0,3	4,3 ± 1	SILVA (2014)
37,6 ± 1,4	29,4 ± 1,1	13,2 ± 0,5	0,9 ± 0,2	PEREIRA et al. (2015)
35,2 ± 0,9	24,5 ± 0,6	22,2 ± 0,1	20,9 ± 4,3	REZENDE et al. (2011)
39,49 ± 0,08	26,07 ± 0,05	23,33 ± 0,09	3,24 ± 0,12	MARTINS; RABELO; COSTA (2015)
42,19 ± 1,93	27,6 ± 0,88	21,56 ± 1,67	2,84 ± 1,22	MILESSI et al. (2013b)
42,37 ± 0,47	22,35 ± 0,17	26,72 ± 0,45	4,81 ± 0,11	OLIVEIRA (2015)
34,64 ± 0,03	18,90 ± 0,03	27,61 ± 0,03	6,41 ± 0,03	Presente trabalho

Fonte: Arquivo pessoal

A variedade de cana-de-açúcar que está sendo processado de forma operacional nas usinas no Brasil, não consegue ter um ótimo controle devido ao fornecimento da matéria-prima por diferentes fazendas e a única análise

realizada, antes de ser processada, é a determinação do teor de açúcar, ou seja, o índice Brix (ROCHA et al., 2015).

De acordo com Oliveira (2015), as variações observadas quando se utilizam condições experimentais semelhantes podem ser devido à variabilidade da biomassa, como a propriedades do solo, clima, estágio de maturação, ou até a forma de lavagem do material, o que reflete diretamente no percentual de cinzas.

5.2 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Na Tabela 5.2 são apresentadas as concentrações dos principais componentes do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido após as etapas de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído, concentração a vácuo e destoxificação.

Tabela 5.2 - Caracterização química do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA) obtido do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (Hidrolisado original), hidrolisado concentrado a vácuo e hidrolisado destoxificado.

Componente	Hidrolisado Original	Hidrolisado Concentrado 5X	Hidrolisado Destoxificado
Xilose (g/L)	14,19	69,65	63,37
Glicose (g/L)	1,52	7,32	7,04
Arabinose (g/L)	1,43	7,08	6,95
Ácido Acético (g/L)	0,85	3,15	2,91
Furfural (g/L)	0,146	0,181	0,035
HMF (g/L)	0,015	0,020	0,019
Fenóis Totais (g/L)	2,57	5,47	1,33
pH	1,10	0,75	5,5

Fonte: Arquivo pessoal

Como pode ser observado na Tabela 5.2, a concentração total de açúcares, glicose, xilose e arabinose, obtida na hidrólise (hidrolisado original) foi de 17 g/L, sendo a proporção entre eles, de aproximadamente 1,1:9,9:1 respectivamente. Resultados semelhantes foram reportados por outros autores (FERREIRA; MUSSATTO; et al., 2011; CHAUD et al., 2012; MILESSI et al., 2013b; DUSSAN et al., 2016), que empregaram hidrólise com ácido diluído e obtiveram um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, com proporção bastante semelhante, de 1:9:1 para glicose, xilose e arabinose, respectivamente. Após a

etapa de concentração, o teor de glicose, xilose e arabinose no hidrolisado, aumentou de 1,52, 14,19 e 1,43 g/L para 7,32, 69,65 e 7,08 g/L, respectivamente. A etapa de concentração visa aumentar os açúcares monoméricos no hidrolisado com o propósito de fornecer as concentrações adequadas destes para fermentação por micro-organismo (MILESSI et al., 2013a).

Além dos açúcares, a hidrólise ácida do bagaço de cana também resultou na liberação e/ou formação de compostos considerados tóxicos ao processo fermentativo como ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e fenólicos.

Em relação ao ácido acético, verificou-se que, após a etapa de concentração a vácuo (fator de concentração de 5X) a concentração deste ácido aumentou de forma não proporcionalmente de 0,85 g/L para 3,15 g/L. Isto ocorreu provavelmente devido à volatilização deste composto durante o processo de concentração a vácuo a 70 °C sob pressão reduzida, fato este também relatado por (RODRIGUES et al., 2001).

A quantidade elevada de moléculas de ácido acético não dissociado no hidrolisado tem efeito inibitório sobre o crescimento celular sob pH baixo, as quais se difundem livremente através da membrana celular, ionizando no citoplasma e diminuindo o pH intracelular. Como consequência, a energia e vias anabólicas/catabólicas podem ser desacopladas, resultando em uma redução do crescimento do crescimento das células (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; SLININGER et al., 1991; TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOĞLU, 2008). Entretanto, a tolerância de micro-organismos ao ácido acético pode variar de acordo com as espécies, as condições de cultura utilizadas e à concentração de ácido, sendo reportado por (FELIPE et al., 1995) o uso deste composto como fonte de carbono para a levedura.

Para o furfural e o HMF verificou-se que a etapa de concentração não resultou em aumento proporcional de suas concentrações em função de sua volatilidade a altas temperaturas (GREEN; PERRY, 1977). O furfural teve aumento de 1,24 vezes e o HMF teve aumento de 1,3 vezes, enquanto os fenóis totais foram aumentados 2,12 vezes.

Quanto ao método de destoxificação utilizado, por alteração de pH seguido de adsorção em carvão ativo (ALVES et al., 1998) observou-se (Tabela 5.2) uma diminuição nas concentrações de inibidores, especificamente redução de 8% de ácido acético, 8,67% de furfural, 5% de HMF e 75,6%% de fenóis. Além disso,

também foi verificada uma perda de cerca de 8% de açúcares. Tais resultados confirmam a eficiência do processo de tratamento do hidrolisado, principalmente no caso dos compostos fenólicos, cuja remoção é importante devido ao fato deles serem um dos mais relevantes inibidores do metabolismo das leveduras (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

5.3 Processo Fermentativo

5.3.1 Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura para a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

Para avaliar o efeito dos nutrientes: sulfato de magnésio (MgSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4), cloreto de ferro (FeCl_3), cloreto de cálcio (CaCl_2), ureia, extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), fosfato de potássio (KH_2PO_4), comumente utilizados como suplementação nutricional em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a produção de etanol (Tabela 2.4), foi realizado um planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central.

Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 são apresentados a formação de produto, o consumo de substrato bem como o crescimento celular, para cada ensaio do planejamento fatorial, no tempo de 96h.

Como pode ser verificado nas Figuras 5.1, 5.2, e Tabela 5.3, o Ensaio 4, em que os nutrientes sulfato de magnésio, sulfato de zinco, extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio estavam em seus níveis (+1), proporcionou maior consumo de açúcares (85,38%), maior produção de etanol (9,5 g/L) e $Y_{P/S}$ de 0,193 g/g, indicando favorecimento da produção de etanol pela adição destes nutrientes.

É importante ressaltar que, em todos os experimentos realizados, não foi observado o consumo de arabinose pela levedura *Scheffersomyces stipitis*. Esse comportamento é característico da levedura, tendo sido anteriormente relatado por Agbogbo, Coward-kelly (2008); Canilha et al. (2010); Silva et al. (2014).

Figura 5.1 - Concentrações de etanol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* após 96 h de fermentação de acordo com o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5.2 - Consumo de açúcares durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* após 96 h de fermentação de acordo com o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central.

Fonte: Arquivo pessoal

As fontes de nitrogênio comumente utilizadas para produção de etanol são extrato de levedura e peptona, as quais são empregadas para aumentar o crescimento ou a viabilidade da levedura, o consumo de açúcar e reduzir o tempo de fermentação (WALKER, 2009).

No Ensaio 1, quando o meio de fermentação foi suplementado apenas com fosfato de potássio (Tabela 5.3), observou-se $Y_{P/S}$ de 0,156 g/g, consumo de 73,57% e concentração de etanol de 6,56 g/L pela levedura *Scheffersomyces stipitis*. Estes resultados indicam a importância da utilização do fosfato de potássio como fonte de fósforo, um nutriente importante já que este elemento é fundamental na via de formação de ATP. O grupo fosfato pode ser transferido por intermediários de muitas reações diferentes, para formar vários compostos fosforilados (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

Segundo Jones; Gadd (1990), o fósforo exerce um papel importante no metabolismo de biossíntese dos fosfolipídeos da membrana. Limitações de fosfato de potássio podem resultar na redução de biomassa e alterações na estrutura da membrana devido ao desequilíbrio no metabolismo dos fosfolipídeos. Para um nível ótimo de adição de fósforo, faz-se necessário determinações experimentais, de acordo com a matéria -prima utilizada.

Já no Ensaio 13 (Figuras 5.1, 5.2 e Tabela 5.3) em que o hidrolisado foi suplementado com cloreto de ferro, cloreto de cálcio, ureia, sulfato de amônio e fosfato de potássio, em seu nível +1, observou-se o menor consumo de açúcares (35%), a menor produção de etanol (2,0 g/L), menor $Y_{P/S}$ (0,092 g/g) e menor produtividade (0,019 g/L/h), o que indica que a presença de alguns dos nutrientes estudados pode não favorecer a produção de etanol. Estes resultados também foram confirmados pela análise do diagrama de Pareto (Figura 5.4) sobre o parâmetro fermentativo $Y_{P/S}$ em que os nutrientes que tiveram significância no nível -1 foram os nutrientes apresentados no Ensaio 13.

Os Ensaios 2,3,5,8,11,13 e 16, nos quais o hidrolisado foi suplementado com ureia, apresentaram os menores desempenhos. Diferentes pesquisadores relataram efeitos negativos do uso de sulfato de amônio e também da ureia como fontes de nitrogênio na fermentação de açúcares para produção de etanol (BELY; RINALDI; DUBOURDIEU, 2003; WANG; BOHLSCHEID; EDWARDS, 2003; BELTRAN et al., 2005; LAOPAIBOON et al., 2009).

Alguns estudos relataram que a adição de sulfato de amônio excessiva pode fazer com que ocorra o aumento da concentração de álcoois superiores (BELTRAN et al., 2005), ácido acético (BELY et al., 2003) ou de sulfeto de hidrogênio (WANG et al., 2003). No entanto, os resultados obtidos por Laopaiboon et al. (2010) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* indicaram que o sulfato de amônio não parece ser adequado como fonte de nitrogênio no caldo de sorgo para a produção de etanol, e, portanto, não seria usado para os experimentos subsequentes.

Laopaiboon et. al. (2009) analisaram os efeitos da fonte de nitrogênio em sorgo para produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e não utilizaram a ureia para suplementação em sua pesquisa, pois esta poderia reagir com etanol obtendo-se o carbamato de etila (uretano) como um subproduto, o que resultaria em menor concentração de etanol.

Silva, J.P.A. et. al. (2011) também relataram a não formação de etanol durante fermentações de hidrolisado de palha de arroz por *Scheffersomyces stipitis* quando o meio foi suplementado somente com ureia.

Slininger et. al. (2006) estudaram o emprego de fontes de nitrogênio e minerais em *S. stipitis* em meio semissintético e verificaram que a produção foi pequena, 11 g/L de etanol, quando se utilizou somente a ureia como suplementação.

Em relação ao crescimento celular, foi observado que o Ensaio 6, hidrolisado suplementado com sulfato de magnésio, cloreto de ferro, extrato de levedura, sulfato de amônio em seus níveis (+1), apresentou a maior formação de biomassa celular (5,3 g/L). Enquanto o menor crescimento celular (2,2 g/L) foi verificado no Ensaio 8 (Figura 5.3) empregando sulfato de magnésio, sulfato de zinco, cloreto de ferro e ureia, o que poderia indicar que as concentrações empregadas desses nutrientes não foram adequadas para favorecer o crescimento celular.

Em todos os ensaios com exceção do Ensaio 13 (Tabela 5.3), o valor de $Y_{X/S}$ não foi superior aos valores de $Y_{P/S}$, indicando que as condições empregadas favoreceram a produção de etanol e não a de biomassa.

Figura 5.3 - Crescimento Celular durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* após 96 h de fermentação de acordo com o planejamento experimental fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central.

Fonte: Arquivo pessoal

Os valores dos parâmetros fermentativos conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica em etanol (Q_P), conversão de açúcares em biomassa ($Y_{X/S}$), eficiência ($\eta\%$), após 96 h de fermentação, estão apresentados na Tabela 5.3, e indicam que o Ensaio 4 foi o que resultou nos maiores valores de $Y_{P/S}$ (0,193 g/g) e Q_P (0,097 g/L/h).

Tabela 5.3 –Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{9-5} obtidas a partir do estudo da influência da suplementação nutricional, após 96 h da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Ensaios	Níveis codificados								Níveis Reais								Variáveis Resposta					
	MgSO ₄	Zn SO ₄	FeCl ₃	CaCl ₂	Ureia	E.L.	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	Mg SO ₄	Zn SO ₄	Fe Cl ₃	Ca Cl ₂	Ureia	E.L.	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	YP/S (g/g)	QP (g/L/h)	YX/S (g/g)	Eficiência (%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,156	0,068	0,082	30,65
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0,50	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	3,00	3,00	0,00	0,134	0,052	0,045	26,18
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	0,00	0,01	0,00	0,00	3,00	3,00	0,00	3,00	0,00	0,138	0,048	0,054	27,01
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	0,50	0,01	0,00	0,00	0,00	3,00	3,00	0,00	2,00	0,193	0,097	0,076	37,91
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0,00	0,00	0,10	0,00	3,00	3,00	3,00	0,00	0,00	0,13	0,046	0,064	25,42
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	0,50	0,00	0,10	0,00	0,00	3,00	0,00	3,00	2,00	0,14	0,054	0,108	27,4
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,00	0,01	0,10	0,00	0,00	0,00	3,00	3,00	2,00	0,147	0,057	0,082	28,73
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	0,50	0,01	0,10	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,124	0,049	0,031	24,31
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	3,00	3,00	3,00	0,00	0,139	0,06	0,075	27,32
10	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	0,50	0,00	0,00	0,10	3,00	3,00	0,00	0,00	2,00	0,14	0,06	0,075	27,38
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	0,00	0,01	0,00	0,10	3,00	0,00	3,00	0,00	2,00	0,135	0,054	0,089	26,45
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	0,50	0,01	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,133	0,055	0,038	26,06
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	0,00	0,00	0,10	0,10	3,00	0,00	0,00	3,00	2,00	0,092	0,019	0,145	18,09
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	0,50	0,00	0,10	0,10	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,125	0,056	0,034	24,49
15	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,00	0,01	0,10	0,10	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,053	0,058	25,51
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,50	0,01	0,10	0,10	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	0,13	0,051	0,069	25,42
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,01	0,05	0,05	1,50	1,50	1,50	1,50	1,00	0,133	0,054	0,104	26,13
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,01	0,05	0,05	1,50	1,50	1,50	1,50	1,00	0,135	0,054	0,107	26,52
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0,01	0,05	0,05	1,50	1,50	1,50	1,50	1,00	0,134	0,054	0,103	26,3

Fonte: Arquivo pessoal

Uma análise estatística empregando-se a variável resposta fator de conversão de açúcares em produto ($Y_{P/S}$) foi realizada para melhor entendimento da influência dos nutrientes utilizados para suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, sobre a produção de etanol por *S. stipitis*.

No gráfico de Pareto (Figura 5.4) observa-se que para a variável resposta $Y_{P/S}$, as variáveis (6) extrato de levedura, (9) fosfato de potássio, (7) peptona, (2) sulfato de zinco e (1) sulfato de magnésio mostraram efeitos significativos no nível (+1). Entretanto, as variáveis (3) cloreto de ferro, (5) ureia, (4) cloreto de cálcio, (8) sulfato de amônio apresentaram significância no nível (-1), correspondendo a um valor real de 0 g/L.

Figura 5.4 - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) por meio do gráfico de Pareto da variável resposta conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$) de acordo o planejamento fatorial fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central..

Fonte: Arquivo pessoal

Como foi observado anteriormente, nas análises quanto ao consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol, que estes compostos não permitem a maximização do fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), uma vez que a ausência deles no meio de fermentação favorece a produção deste bioproduto. A significância estatística dos efeitos principais sobre o parâmetro fermentativo $Y_{P/S}$, no processo de produção de etanol, foi também estudada pela análise da variância dos fatores (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Análise de variância dos fatores sobre a conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$).

Fatores	SQ	GL	MQ	F	P
(1) $MgSO_4$	0,000161	1	0,000161	22,7150	0,001021
(2) $ZnSO_4$	0,000340	1	0,000340	47,9447	0,000069
(3) $FeCl_3$	0,001424	1	0,001424	200,5953	0,000000
(4) $CaCl_2$	0,001175	1	0,001175	165,5320	0,000000
(5) Ureia	0,001259	1	0,001259	177,3704	0,000000
(6) E.L	0,000552	1	0,000552	77,7626	0,000010
(7) Peptona	0,000391	1	0,000391	55,0942	0,000040
(8) $(NH_4)_2SO_4$	0,000411	1	0,000411	57,8547	0,000033
(9) KH_2PO_4	0,000403	1	0,000403	56,7486	0,000036
Erro Puro	0,000000202	2	0,00000101		
Total (corr.)	0,006179	18			

E.L extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.
 $R^2 = 98,97\%$, R^2 (adj.) = 97,93%

Na Figura 5.5 pode-se observar a influência das variáveis estudadas sobre o parâmetro fermentativo $Y_{P/S}$. As variáveis sulfato de magnésio, sulfato de zinco, extrato de levedura, peptona, fosfato de potássio, apresentaram efeito positivo sobre o parâmetro $Y_{P/S}$ no nível (+1). Comportamento similar também foi observado para as variáveis cloreto de ferro, cloreto de cálcio, ureia, sulfato de amônio, porém no nível -1.

Figura 5.5 - Gráficos de efeitos principais para o fator $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial fracionado 2^{9-5} com três repetições no ponto central de acordo com as condições estabelecidas na Tabela 4.2

Fonte: Arquivo pessoal

Com o objetivo de otimizar as concentrações de extrato de levedura (0 g/L a 3 g/L) peptona (0 g/L a 3 g/L) e fosfato de potássio (0 g/L a 3 g/L) utilizou-se um planejamento de mistura (Tabela 4.3). As concentrações de sulfato de magnésio (MgSO_4) e sulfato de zinco (ZnSO_4) foram mantidas constantes em todos os ensaios (0,5 e 0,01 g/L, respectivamente).

A Figura 5.6 apresenta o crescimento celular, concentração de açúcares e produção de etanol durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando planejamento de mistura.

Na Figura 5.6 observa-se também se observa que o ensaio 8, com adição de extrato de levedura (2,00 g/L), fosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,50 g/L) e peptona (0,50 g/L), foi o que apresentou maior consumo de açúcares (85 %), maior concentração de etanol (20 g/L) e maior crescimento celular correspondendo a $Y_{X/S}$ 0,0933 g/g. Já no ensaio 10 (Figura 5.6), contendo extrato de levedura (1,00 g/L), peptona (1,00 g/L) e fosfato de potássio (KH_2PO_4) (1,00 g/L), foi observada uma concentração de etanol de 17,82 g/L e um $Y_{X/S}$ de 0,06 g/g, embora o aumento tenha sido gradativo durante toda a fermentação, não foi maior do que o observado no Ensaio 8.

Figura 5.6 - Crescimento celular, concentração de açúcares e produção de etanol, nos Ensaios fermentativos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 do planejamento fatorial para estudo da influência das variáveis: extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

(Continua)

(Continuação)

Figura 4.4 - Crescimento celular, concentração de açúcares e produção de etanol, nos Ensaios fermentativos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 do planejamento fatorial para estudo da influência das variáveis: extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

No Ensaio 7 com o extrato de levedura (2,00 g/L), peptona (0,50 g/L) e fosfato de potássio (KH_2PO_4) (0,50 g/L), observou-se que o consumo de substrato atingiu 80% (Figura 5.7) com uma produção de etanol de 16 g/L e crescimento celular de 4,5 g/L semelhante ao Ensaio 10 (Figura 5.6).

Figura 5.7 - Consumo de açúcares durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* após o tempo final de fermentação de 96 h de acordo com o planejamento de Mistura

Fonte: Arquivo pessoal

Estes resultados indicam um favorecimento do crescimento celular e produção de etanol quando se utilizou extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio (KH_2PO_4). Outros pesquisadores, relatam que quando utilizaram como suplementação peptona, extrato de levedura, fosfato de potássio e sulfato de magnésio com a levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, observaram um aumento tanto na concentração final quanto no rendimento em etanol (AMARTEY; JEFFRIES, 1994).

Já Xiros; Olsson (2014), avaliaram o efeito da suplementação sobre a fermentabilidade do hidrolisado de abeto (*Picea abies*) por *Saccharomyces cerevisiae*, e verificaram que o extrato de levedura e a peptona resultaram em aumento dos valores de produtividade volumétrica e rendimento de etanol.

Além disso, fontes de nitrogênio orgânico, como extrato de levedura e peptona, fornecem vários elementos para as células, os quais as tornam mais tolerantes aos compostos inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos, principalmente a disponibilidade de aminoácidos livres, favorecendo altos valores

de rendimento e produtividade em etanol, além de contribuírem para a redução da produção de subprodutos, direcionando assim uma fração maior do carbono metabolizado à produção de etanol (ALBERS et al., 1996; JØRGENSEN, 2009).

Especificamente para *S. stipitis*, é conhecido que a composição nutricional do meio de fermentação, principalmente quanto a fonte de nitrogênio, interfere na sua eficiência de conversão de xilose em etanol, visto que estes componentes estão diretamente relacionados com a eficiência de biossíntese, preservação e manutenção celular e balanço redox de cofatores envolvendo NAD/NADH e NADP/NADPH (SLININGER et al., 2006).

Nos Ensaios 4, 5, 9 (Figura 5.6) observou-se que o consumo de açúcares (glicose xilose) foi de 68,4%; 67,9% e 65,2% respectivamente. No Ensaio 3, no qual o hidrolisado foi suplementado apenas com fosfato de potássio, o consumo de açúcares foi de 36,26% (Figura 5.7).

Observa-se que a suplementação foi um fator importante para otimizar a produtividade em etanol e o consumo de açúcares. O meio de cultivo é importante para o desempenho da levedura, aumentando o rendimento dos produtos da fermentação. Fatores tais como concentração inicial de açúcar, fontes complexas de nitrogênio, concentrações de íons carbonato, pH e temperatura do meio de crescimento são reportados como os fatores de maior relevância que afetam tanto o crescimento celular como a formação de produto (SAMUELOV et al., 1991; NGHIE et al., 1997; LEE et al., 1999a; LEE et al., 1999b.).

Na Tabela 5.5 observam-se os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$, Q_P , eficiência ($\eta\%$) e $Y_{X/S}$ para a produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis*, avaliando a influência dos nutrientes extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio utilizando planejamento de mistura (segundo Tabela 4.2). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 5.5 – Matriz do planejamento de misturas obtidas a partir do estudo da influência da suplementação nutricional na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis Reais			Variáveis Resposta			
	X_1	X_2	X_3	Extrato de Levedura	Peptona	$\text{KH}_2\text{P O}_4$	$Y_{P/S}$	Q_P	Eficiência	$Y_{X/S}$
				(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/g)	(g/L/h)	(%)	(g/g)
1	1	0	0	3	0	0	$0,35 \pm 9,07\text{E-}04$	$0,17 \pm 2,14\text{E-}03$	$68,95 \pm 0,18$	$0,11 \pm 3,21\text{E-}03$
2	0	1	0	0	3	0	$0,33 \pm 8,49\text{E-}03$	$0,12 \pm 2,45\text{E-}03$	$63,98 \pm 1,66$	$0,12 \pm 1,06\text{E-}03$
3	0	0	1	0	0	3	$0,26 \pm 5,28\text{E-}03$	$0,07 \pm 2,24\text{E-}03$	$51,11 \pm 1,04$	$0,08 \pm 1,81\text{E-}03$
4	0,5	0,5	0	1,5	1,5	0	$0,28 \pm 4,09\text{E-}03$	$0,12 \pm 1,56\text{E-}03$	$54,56 \pm 0,80$	$0,10 \pm 2,54\text{E-}03$
5	0,5	0	0,5	1,5	0	1,5	$0,36 \pm 1,36\text{E-}04$	$0,15 \pm 3,65\text{E-}04$	$70,82 \pm 0,03$	$0,07 \pm 2,43\text{E-}03$
6	0	0,5	0,5	0	1,5	1,5	$0,33 \pm 1,00\text{E-}02$	$0,11 \pm 1,56\text{E-}04$	$65,24 \pm 1,97$	$0,07 \pm 2,00\text{E-}03$
7	0,67	0,17	0,17	2	0,5	0,5	$0,31 \pm 2,80\text{E-}03$	$0,17 \pm 8,33\text{E-}04$	$61,62 \pm 0,55$	$0,07 \pm 1,35\text{E-}03$
8	0,17	0,67	0,17	0,5	2	0,5	$0,39 \pm 3,52\text{E-}03$	$0,20 \pm 1,20\text{E-}03$	$76,48 \pm 0,69$	$0,09 \pm 3,00\text{E-}03$
9	0,17	0,17	0,67	0,5	0,5	2	$0,27 \pm 2,05\text{E-}03$	$0,11 \pm 1,56\text{E-}04$	$52,73 \pm 0,40$	$0,09 \pm 7,57\text{E-}04$
10	0,33	0,33	0,33	1	1	1	$0,39 \pm 2,10\text{E-}03$	$0,19 \pm 3,65\text{E-}04$	$75,52 \pm 0,41$	$0,06 \pm 2,10\text{E-}03$

Os experimentos foram realizados em duplicata. ZnSO_4 : 0,01 g/L e MgSO_4 : 0,5 g/L foram mantidos constantes.

Fonte: Arquivo pessoal

Os resultados indicam que a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar contribuiu para o processo de bioconversão de seus açúcares a etanol. Eles revelam também, que somente a adição do fosfato de potássio no meio de fermentação (Ensaio 3) não favoreceu a produtividade em etanol, tendo apresentado os menores valores de rendimento ($Y_{P/S} = 0,26$ g/g), produtividade ($Q_P = 0,07$ g/L/h) e eficiência (51%). Verifica-se também que tanto a peptona quanto o extrato de levedura utilizados separadamente nos Ensaios 1 e 2 favoreceram mais ao fator de conversão de açúcares em células ($Y_{X/S} = 0,11$ g/g e $0,12$ g/g, respectivamente) do que o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S} = 0,35$ g/g e $0,33$ g/g, respectivamente). Observou-se no Ensaio 2, em que a suplementação foi realizada somente com peptona, o maior fator de conversão de açúcares em células ($Y_{X/S} = 0,12$ g/g).

Embora a levedura não tenha consumido todo o açúcar presente no meio nas 96 h de fermentação (Figura 5.7), o Ensaio 8 resultou nos máximos valores de $Y_{P/S}$ ($0,39$ g/g), Q_P ($0,20$ g/L/h) e eficiência de produção de etanol (76,48 %) conforme apresentado na Tabela 5.5. Possivelmente um prolongamento do tempo de fermentação visando o consumo total dos açúcares poderia resultar em uma diminuição de produtividade, o que não seria vantajoso.

Roepcke (2007), estudando a cepa de levedura *Komagataella (Pichia) pastoris* NRRL Y1603, observou que esta levedura não foi capaz de metabolizar todos os açúcares presentes no meio de cultivo, consumindo apenas cerca de 30% dos açúcares disponíveis. Neste trabalho, o crescimento celular foi influenciado pelo baixo consumo de açúcares presentes no meio onde a maior concentração de biomassa produzida por esta levedura foi de $7,72$ g/L, no tempo de 120 h, em um meio com concentração de $0,05$ g/L de $ZnSO_4$.

Os maiores valores de produtividade volumétrica em etanol e velocidade de consumo de substrato ocorreram nos ensaios suplementados com extrato de levedura (Ensaios 8 e 10) Tabela 5.5. Já os Ensaios 02, 03 e 06, que não continham esse nutriente, tiveram menor desempenho, como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura 5.8) onde a variável extrato de levedura apresentou maior valor de significância perante as demais. Dentre os que se destacaram, os Ensaios 08 e 10, continham todos os nutrientes avaliados, indicando um possível efeito combinado da associação de diferentes tipos de suplementação.

Meios nutricionais incluindo fontes de nitrogênio, de carbono e de minerais são requisitos para influenciar a eficiência da biossíntese, a preservação e manutenção de células, e o equilíbrio redox envolvendo os cofatores NAD/NADH e de NADP/NADPH, o que pode aumentar o rendimento de etanol (SLININGER et al., 2006). Estudos indicam que provavelmente a combinação destes nutrientes para que a levedura *S. stipitis* com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, favoreceu a biossíntese e a conversão do substrato a etanol (SILVA et al., 2014).

Slininger et al. (2006) demonstraram que a levedura *P. stipitis* necessita de qualquer fonte de nitrogênio para apoiar não apenas o seu crescimento, mas também para a sua manutenção na produção de etanol.

Como foi visto anteriormente, na análise dos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$, Q_P e eficiência, a variação na concentração dos nutrientes extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio, sulfato de magnésio, pode influenciar na produção de etanol. Por isso, foi avaliado por meio do planejamento de mistura, qual seria a melhor proporção entre esses nutrientes de forma a aumentar a produtividade em etanol. Na Figura 5.8, pode ser observado, através do diagrama de Pareto, quais parâmetros e interações foram significativos. O extrato de levedura, a peptona e o fosfato de potássio, bem como a interação extrato de levedura e fosfato de potássio (AC) apresentaram significância a um nível de confiança de 95% para a variável resposta produtividade em etanol (Q_P).

Figura 5.8 – Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis significativas no nível de confiança de 95% para a variável resposta produtividade em etanol (Q_P) de acordo o planejamento de mistura.

Fonte: Arquivo pessoal

Os dados da Tabela 5.5 sugerem um modelo linear para o ajuste dos dados com coeficientes de correlação $R^2 = 65,5 \%$ e $R^2_{Adj.} = 53,2\%$. O modelo quadrático para ajuste dos dados da produtividade em etanol é dado por:

$$Q_p = 0,165X_1 + 0,135X_2 + 0,056X_3 + 0,006X_1X_2 + 0,208X_1X_3 + 0,169X_2X_3 \quad (5.1)$$

Onde X_1 é extrato de levedura, X_2 é peptona e X_3 é KH_2PO_4 em variáveis codificadas.

Na Figura 5.9, observa-se a variação da composição da mistura dos nutrientes extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio para maximizar a variável resposta produtividade em etanol (Q_p). Os pontos brancos representam os valores experimentais. Na região vermelha escura se encontram os valores máximos de Q_p , o qual é favorecido por uma maior concentração de extrato de levedura e peptona e menor concentração de fosfato de potássio. O valor definido codificado da composição da mistura, extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio foram 0,17, 0,67 e 0,17, respectivamente (em valores reais 0,5 g/L, 0,67 g/L e 0,5 g/L).

Figura 5.9 – Curva de contorno do planejamento de mistura para a produtividade em etanol (Q_p)

Fonte: Arquivo pessoal

Visando validar o modelo, foram realizados experimentos em duplicata com as concentrações ótimas de extrato de levedura, peptona e fosfato de potássio,

acrescidos de sulfato de magnésio e sulfato de zinco de acordo com a análise do planejamento fatorial fracionado (item 4.2.3).

Na Tabela 5.6, podem ser observados os resultados dos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$, Q_P , eficiência e $Y_{X/S}$ utilizando as condições definidas da suplementação nutricional conforme o planejamento de mistura. Substituindo na equação 5.1 os valores codificados definidos de extrato de levedura, peptona, e fosfato de potássio (0,17; 0,67 e 0,17, respectivamente), se obteve um Q_P de 0,154 g/L/h. Comparando-se o modelo com o valor experimental obtido ($Q_P = 0,2334 \pm 0,0299$ g/L/h) pode-se concluir que o modelo (Equação 5.1) não conseguiu representar a variável resposta produtividade em etanol sendo 0,66 vezes menor.

Tabela 5.6 – Resultados obtidos utilizando as condições definidas do planejamento de mistura para o estudo da influência da suplementação nutricional na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Respostas	Média
$Y_{P/S}$ (g/g)	$0,3985 \pm 0,0027$
Q_P (g/L/h)	$0,2334 \pm 0,0299$
Eficiência (%)	$77,84 \pm 0,2700$
Consumo de açúcares (%)	$84,345 \pm 0,7250$
Etanol (g/L)	$19,9 \pm 0,2900$

Fonte: Arquivo pessoal

5.3.2 Efeito do $pH_{inicial}$, aeração e agitação na produção de etanol em biorreator agitado- STR utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

Os níveis de $pH_{inicial}$, aeração e agitação, e as respostas avaliadas, açúcares consumidos, fator de conversão de açúcares em etanol, produtividade em etanol, eficiência de conversão estão apresentados na Tabela 5.7 onde observou-se que a levedura foi capaz de produzir etanol em todas as condições estudadas.

Tabela 5.7 - Matriz do planejamento central composto rotacional 2^3 com quatro repetições no ponto central para estudo da influência das variáveis $\text{pH}_{\text{inicial}}$, aeração e agitação na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* tendo como variáveis resposta $Y_{P/S}$ e Q_P .

Ensaio	Níveis codificados			Níveis Reais			$k_L a$ inicial	$Y_{P/S}$	Q_P	Consumo	Eficiência	
	X_1	X_2	X_3	pH inicial	Aeração Vvm	Agitação rpm	(h^{-1})	(g/g)	(g/L/h)	Açúcares* (%)	Etanol (g/L)	(%)
1	-1	-1	-1	5	0,2	150	3,97	0,045	0,017	58,612	1,66	8,775
2	1	-1	-1	7	0,2	150	1,111	0,125	0,075	65,848	5,39	24,572
3	-1	1	-1	5	0,7	150	3,857	0,052	0,019	51,597	1,79	10,259
4	1	1	-1	7	0,7	150	5,55	0,132	0,114	96,097	8,18	25,793
5	-1	-1	1	5	0,2	300	22,304	0,054	0,017	46,18	1,6	10,604
6	1	-1	1	7	0,2	300	5,107	0,165	0,11	81,782	9,27	32,335
7	-1	1	1	5	0,7	300	25,029	0,151	0,061	57,063	5,88	29,656
8	1	1	1	7	0,7	300	21,395	0,083	0,06	38,854	5,75	16,232
9	0	0	-1,68	6	0,45	99	4,668	0,234	0,164	83,726	11,78	45,7
10	0	0	1,68	6	0,45	351	20,701	0,15	0,082	80,415	7,87	22,473
11	0	-1,68	0	6	0,03	225	0,674	0,196	0,098	72,911	9,41	38,344
12	0	1,68	0	6	0,87	225	7,927	0,142	0,122	98,02	8,77	27,776
13	-1,68	0	0	4,32	0,45	225	6,531	0,056	0,017	42,172	1,65	11,05
14	1,68	0	0	7,68	0,45	225	6,833	0,138	0,13	95,091	9,35	26,97
15	0	0	0	6	0,45	225	5,428	0,19	0,169	80,24	10,13	37,204
16	0	0	0	6	0,45	225	4,989	0,195	0,175	82,967	10,47	38,205
17	0	0	0	6	0,45	225	4,065	0,202	0,174	84,733	10,41	39,654
18	0	0	0	6	0,45	225	5,382	0,207	0,184	84,949	11,02	40,493

*Açúcares consumidos: Xilose + Glicose

Fonte: Arquivo pessoal

Os maiores valores do fator de conversão de açúcares em etanol, 0,19 g/g a 0,23 g/g foram observados nos experimentos com k_La entre 4,0 e 5,4 h^{-1} , aeração de 0,45 vvm, com $pH_{inicial}$ igual 6,0. Entretanto nos experimentos os quais foram utilizados $pH_{inicial}$ 5,00 e aeração de 0,20 vvm, a maior produção de etanol foi de aproximadamente 1,79 g/L e $Y_{P/S}$ de 0,052 g/g. Além disso, pode-se observar a redução nos valores de produtividade em etanol, devido à diminuição do $pH_{inicial}$ empregado.

Nas Figuras 5.10 a 5.13 estão apresentados o crescimento celular, produção de etanol e concentração de açúcares referentes aos experimentos do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $pH_{inicial}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* em biorreator de 1 litro (modelo Multigen).

Figura 5.10 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$), dos Ensaios fermentativos 1, 2, 3, 4 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $pH_{inicial}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

Nos Ensaios 1, 3, 5 e 13 (Figura 5.10, 5.11 e 5.13) com pH menor (5,0) e k_La variando de $3,9 \text{ h}^{-1}$ (0,20 vvm e 150 rpm); $3,8 \text{ h}^{-1}$ (0,70 vvm e 150 rpm); $22,3 \text{ h}^{-1}$ (0,20 vvm e 300 rpm) e $6,5 \text{ h}^{-1}$ (0,45 vvm e 225 rpm), respectivamente, foi observado um consumo de açúcares entre 40 - 58,6% em 96 h conforme Tabela 5.7. Estes experimentos propiciaram os menores valores de etanol (menos de $1,79 \text{ g/L}$) e também de células (valores inferiores de $4,9 \text{ g/g}$).

Resultados semelhantes foram reportados por Scordia et al. (2012), que verificaram inibição da fermentação de hidrolisado hemicelulósico de *Arundo donax* L. com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 5,0 por *S.stipitis*. Uma possível explicação para este comportamento seria que com o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 5,0 o ácido acético estaria em grande parte não dissociado, permitindo a sua difusão para o citoplasma da célula onde se dissocia e reduz o pH intracelular abaixo do alcance fisiológico, resultando em uma fase lag longa, inibição do crescimento celular e enorme diminuição do consumo de xilose (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998).

Figura 5.11 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$), nos Ensaios fermentativos 5, 6, 7, 8 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

Nos Ensaio 7 e 8 (Figura 5.11), empregando-se k_La de $25,0 \text{ h}^{-1}$ (0,70 vvm e 300 rpm) e $21,3 \text{ h}^{-1}$ (0,70 vvm e 300 rpm) e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 5,0, foi observado consumo de 57,0% e 98,8% de açúcares (Tabela 5.7), concentração de etanol de 5,8 g/L e 5,75 g/L e biomassa celular de 5,4 g/L e 8,42 g/L em 96 h de fermentação, respectivamente. Pode-se observar que as concentrações celulares foram superiores às de produção de etanol, indicando uma predominância das vias metabólicas para crescimento celular em relação à formação de produto. O direcionamento do metabolismo dos açúcares assimilados para produção de etanol ou massa celular pela levedura *Scheffersomyces stipitis* depende do fornecimento de oxigênio para as células. Altas taxas de aeração favorecem a formação de biomassa, enquanto baixas taxas de aeração favorecem a produção de etanol (DU PREEZ, 1994a; DUSSÁN et al., 2016).

Comportamento similar foi observado nos Ensaio 5 e 6 (Figura 5.2), destacando-se que o Ensaio 5 com pH 5,0 foi aquele em que se observou a menor produção de etanol (1,6 g/L).

Nos Ensaio 10 e 11 (Figura 5.12) ambos com $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0 e k_La $20,7 \text{ h}^{-1}$ (0,45 vvm e 351 rpm) e $0,67 \text{ h}^{-1}$ (0,03 vvm e 225 rpm), respectivamente, foi observado consumo de açúcar de 80% e 72% (Tabela 5.7), formação de células de 5,37 g/L e 6,43 g/L após 96 h, respectivamente. Comparando a aeração e a agitação nos dois experimentos, ressalta-se a influência da agitação na produção de etanol observando-se concentrações de 9,41 g/L para o Ensaio 11 e 7,8 g/L para o Ensaio 10.

Já nos Ensaio 12 e 14 (Figura 5.12) observou-se consumo de 98% e 95% de açúcares (Tabela 5.11) em 72 h de fermentação com formação de etanol de 8,77 g/L e 9,35 g/L e células de 5,67 g/L e 4,75 g/L, respectivamente. Ao final da fermentação no tempo de 96 h, já não havia mais substrato, observou-se o aumento do pH, diminuição do ácido acético (52%) e também de etanol (31%), provavelmente utilizados como fonte de carbono já que o crescimento não foi prejudicado. O consumo de 75% de ácido acético foi reportado por (SILVA et.al. 2014) avaliando estratégias de adaptação de *S. stipitis* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Dussán et al. (2016) observaram que o crescimento celular foi favorecido com a elevação dos parâmetros agitação e aeração, enquanto a produção de

etanol foi favorecida pela diminuição dos parâmetros agitação, aeração e elevação do parâmetro $pH_{inicial}$ em cultivos de levedura *Scheffersomyces stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar conduzidos em um fermentador agitado - STR Bioengineering (Wald, Suíça) tipo KLF2000 operado em modo descontínuo.

Figura 5.12 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$), nos Ensaios fermentativos 9, 10, 11, 12, 13 e 14 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $pH_{inicial}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5.13 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$), nos Ensaios fermentativos 15, 16, 17, 18 do planejamento central composto rotacional para estudo da influência das variáveis agitação, vazão de ar e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal

O experimento que resultou em maior produção de etanol foi o Ensaio 9 (Figura 5.12). Neste ensaio, a produção de etanol prevaleceu em relação à concentração de células, sendo encontrados os maiores valores de conversão de açúcares em etanol (0,23 g/g) e produtividade volumétrica em etanol (0,18 g/L/h). -Os Ensaios 15, 16 17 e 18 (Figura 5.13, Tabela 5.7, pontos centrais) apresentaram resultados semelhantes. Tais resultados confirmam que tanto o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ quanto a aeração são parâmetros fermentativos muito importantes para produção de etanol.

Observa-se ainda que, nas Figuras 5.12 e 5.13 após o tempo de 60 h, ocorreu a perda do etanol produzido, mesmo com presença de açúcares no meio de fermentação. Comportamento semelhante foi observado por Skoog; Jeppsson; Hahn-Hägerdal (1992) e Dussán et al. (2016) para *S. stipitis*, ambos autores sugeriram que um excesso de oxigênio no meio faz com que a levedura assimile etanol.

Scordia et al. (2012) observaram que o aumento do pH_{inicial} 5,0 para 6,5 melhorou significativamente a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de *Arundo donax* L. pela levedura *Scheffersomyces stipitis*. Com o pH_{inicial} 6,0 após 48h, os autores verificaram 8,20 g/L de etanol, com um fator de rendimento de etanol de 0,33 g/g e uma produtividade de 0,17 g/L/h. De acordo com os autores, o pH ótimo para fermentação de hidrolisados ácidos para a produção de etanol foi de 6,0 e 6,5, com os quais se obtiveram os melhores resultados.

De um modo geral os íons hidrogênio (prótons) são importantes na fisiologia celular da levedura, e mesmo as variações em pH intracelular e extracelular podem ter influência negativa no crescimento e metabolismo das células. A produção de etanol parece ser especialmente sensível às alterações no pH do meio.

O pH intracelular é regulado pela ação da enzima H⁺-ATPase bombeando próton da membrana plasmática, cuja função básica é prover um gradiente eletroquímico para captação de nutrientes e regulação do pH (WALKER, 2009).

A análise de variância (ANOVA) dos efeitos das variáveis independentes e as interações sobre a resposta produtividade volumétrica (Q_P) estão apresentadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Análise de variância dos fatores sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P)

Fator	SS	DF	MS	F	P
A: Agitação (L)	0,000944	1	0,000944	0,78910	0,400292
A: Agitação (Q)	0,009121	1	0,009121	7,62672	0,024612*
B: Aeração (L)	0,000403	1	0,000403	0,33733	0,577367
B: Aeração (Q)	0,012478	1	0,012478	10,43316	0,012056*
C: pH inicial (L)	0,013815	1	0,013815	11,55139	0,009378*
C: pH inicial (Q)	0,024794	1	0,024794	20,73109	0,001867*
A-B (L)	0,000264	1	0,000264	0,22099	0,650838
A-C (L)	0,000453	1	0,000453	0,37875	0,555370
C-B (L)	0,000415	1	0,000415	0,34735	0,571881
Error	0,009568	8	0,001196		
Total SS	0,059717	17			

R²=84 %; R_{Adj}: 66 % *significância p<0,05, 95 %. Q: Quadrático, L: Linear

Observa-se que as variáveis agitação (A), aeração (B) e pH (C) apresentaram significância estatística ao nível de confiança de 95%. Com relação à correlação obtida observa-se que 84% da variação total em torno da média é explicada pela regressão. A variável resposta Q_p apresentou curvatura significativa, o que indica que poderia ser explicado por um modelo quadrático. Obteve-se a equação (5.2) de regressão ajustada aos dados que representam o modelo quadrático, onde X_1 é agitação, X_2 é aeração e X_3 é pH_{inicial} .

$$Q_p = 0,177 - 0,017X_1 - 0,054X_1^2 + 0,011X_2 - 0,063X_2^2 + 0,064X_3 - 0,089X_3^2 - 0,011X_1X_2 - 0,015X_1X_3 - 0,014X_2X_3 \quad (5.2)$$

O modelo proposto foi significativo e não apresentou falta de ajuste, possibilitando representá-lo por meio de superfície de resposta (Figuras 5.14 a 5.16).

Na Figura 5.14 é apresentado por meio de superfície de resposta, a relação entre a variável dependente produtividade em etanol e as variáveis independentes aeração e agitação sendo fixada no ponto central a variável pH_{inicial} .

Figura 5.14 Superfície de resposta para a produtividade volumétrica em etanol em função das variáveis codificadas agitação e aeração para o processo de produção de etanol a partir de HHBCA pela levedura *Scheffersomyces stipitis* em biorreator de bancada de 1L (Multigen).

Fonte :Arquivo pessoal

Como pode ser observado, na Figura 5.14, para maximizar a produtividade em etanol as variáveis independentes aeração e agitação devem ser fixadas no ponto central. O valor máximo de produtividade em etanol foi de 0,16 g/L/h empregando 225 rpm, 0,45 vvm e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 6,0. Além disso, quando ambas as variáveis independentes, agitação e aeração, encontravam-se em seus níveis $-\sqrt{2}$ a produtividade em etanol alcançou o seu valor mínimo ($< 0,01$ g/L/h).

Observa-se na Figura 5.15 a superfície de resposta da produtividade em etanol em função das variáveis codificadas agitação e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ sendo fixado a aeração no seu ponto central.

Figura 5.15 –Superfície de resposta para resposta produtividade em função da agitação e $\text{pH}_{\text{inicial}}$

Fonte: Arquivo Pessoal

O aumento da agitação apresenta influência positiva sobre a produtividade em etanol quando o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ está no nível +1, e quando está no nível -1, uma influência negativa. Da mesma forma, o aumento no $\text{pH}_{\text{inicial}}$ tem um efeito positivo quando a agitação está no nível -1, e negativo quando está no nível +1. Entretanto, quando as variáveis estão no nível -1, elas têm um efeito negativo sobre a produtividade em etanol. O maior valor da produtividade em etanol estimado, cerca de 0,177 g/L/h, foi previsto quando todas as variáveis estavam no ponto central, correspondente a 250 rpm, 0,45 vvm e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 6,00.

Verifica-se na Figura 5.16 a superfície de resposta da produtividade em etanol em função das variáveis codificadas aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ sendo fixada a agitação no seu ponto central. Uma maior produtividade em etanol ($> 0,1$ g/L/h) pode ser obtida quando a aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ se encontram no seu ponto central. O ponto de máxima produtividade em etanol de 0,177 g/L/h foi alcançado quando a agitação e a aeração foram de 225 rpm e 0,45 vvm.

Figura 5.16 –Superfície resposta para resposta produtividade em função da aeração e do $\text{pH}_{\text{inicial}}$

Fonte: Arquivo pessoal

A partir dos resultados apresentados, observa-se a interação entre agitação, aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ na produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Scheffersomyces stipitis* em biorreator de bancada, possibilitando um aumento no valor de Q_P .

Alguns trabalhos como Du Preez (1994b), Skoog; Hahn-Hägerdal (1990), Dussán et al. (2016) relatam que a aeração, é um fator importante na conversão de xilose em etanol, sendo que a aeração regulariza o metabolismo da levedura *Scheffersomyces stipitis*. Uma possível explicação seria que oxigênio disponível é um fator importante na fermentação de xilose por leveduras, visto que o nível de aeração interfere no crescimento celular, balanço redox, formação de produto,

sendo, portanto, capaz de afetar conversão em produto, em células e a produtividade.

A agitação é um dos fatores que apresentam uma grande influência sobre a condição de operação durante a fermentação em biorreatores. É importante para manter homogêneas as condições físicas e químicas dos componentes do meio (nutrientes e células), bem como na transferência de oxigênio (RODMUI; KONGKIATTIKAJORN; DANDUSITAPUN, 2008).

Como a produtividade volumétrica em etanol apresentou relação direta com a agitação, aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$, procurou-se determinar as condições propícias para obtenção de valores maximizados de Q_P . A equação 5.2 foi utilizada para otimizar a produtividade em etanol (Q_P) em função da agitação, aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$. Os valores das variáveis agitação, aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ que maximizaram a produtividade em etanol (0,177 g/L/h) foram 225 rpm, 0,45 vvm e 6,00, respectivamente.

A fim de se validar o modelo, foi realizado um experimento em duplicata nas condições estabelecidas de agitação 225 rpm, aeração 0,45 vvm e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0. Na Tabela 5.9 estão apresentados os valores de $Y_{P/S}$, Q_P , eficiência e consumo de açúcares. A produtividade em etanol obtida experimentalmente correspondeu a aproximadamente 96% do valor calculado com o modelo, sendo este assim validado. Finalmente, o modelo proposto consegue representar a variável resposta produtividade em etanol em função das variáveis independentes agitação, aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$.

Tabela 5.9 Resultados obtidos utilizando as condições definidas do planejamento Central Composto btidos durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *S. stipitis* em Fermentador STR Bioengineering no processo de Batelada com agitação 225 rpm, aeração 0,45 vvm e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0.

Parâmetros	Media
$Y_{P/S}$ (g/g)	$0,2055 \pm 0,0015$
Q_P (g/L/h)	$0,1695 \pm 0,0015$
Eficiência (%)	$40,065 \pm 0,225$
Consumo de açúcares (%)	$82,03 \pm 1,81$

Fonte: Arquivo pessoal

5.3.3 Estudo do processo em batelada alimentada da produção de etanol utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 em biorreator agitado- STR de 2,4 L (Bioengineering)

Após a definição das condições operacionais agitação, aeração e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ foi realizado um novo experimento, em duplicata, em biorreator agitado – STR (Bioengineering), aumentando o volume de trabalho para 1,2 L. O objetivo deste experimento foi estabelecer o melhor tempo para o início do processo descontínuo alimentado, por meio, do critério de máxima velocidade de consumo ($-\text{dS}/\text{dt}$) para melhorar a performance da levedura visando maximizar a produtividade em etanol.

Neste experimento, a agitação foi fixada em 225 rpm e a aeração foi ajustada para 0,3 vvm afim de se obter o k_La de aproximadamente $5,0 \text{ h}^{-1}$. Este k_La corresponde às condições de agitação e aeração que foram definidas anteriormente para um volume de 600 mL e foi escolhido como critério de aumento de escala (1:2).

Na Figura 5.17 observa-se as concentrações de açúcares, células e etanol para o processo descontínuo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador de 2,4 L com 1,2 L de meio.

Figura 5.17 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$) para o processo descontínuo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador de 2,4 L.

Fonte: Arquivo pessoal

A produção máxima de etanol (15 g/L) foi atingida no tempo de 60 h e com uma concentração de células de 5 g/L, correspondendo a um fator de conversão de açúcares em etanol de 0,39 g/g e produtividade volumétrica de 0,26 g/L/h. Tais resultados demonstram que o aumento de escala 1:2 conseguiu representar o processo de produção de etanol, e permitiu melhorar a performance da levedura alcançando um aumento de 1,5 vezes na produtividade em etanol ao ser comparada com a fermentação realizada em fermentador de 1 L (Multigen). Este fato pode ser explicado pela influência da aeração e da geometria dos fermentadores.

A partir dos resultados de concentração de açúcares, células e etanol para o processo de fermentação descontínuo foi realizada a cinética de Monod a fim de se estabelecer o melhor tempo de início do processo descontínuo alimentado ("fed-batch").

Na Figura 5.18 pode ser observada a velocidade instantânea de consumo do substrato em função do tempo de fermentação. Em 48 h de fermentação foi verificada a máxima velocidade de consumo de substrato (0,775 g/L/h) sendo possível o início do processo de batelada alimentada neste tempo, sem prejudicar a performance da levedura, uma vez que a *S. stipitis* já se encontra adaptada ao meio e as condições operacionais no referido tempo.

Figura. 5.18- Velocidade instantânea de consumo de substrato para o processo descontínuo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico usando a levedura *S. stipitis*.

A partir dos dados obtidos no processo descontínuo, foram realizados experimentos em processo descontínuo alimentado avaliando-se volume de meio inicial, volume de alimentação, vazão de ar, agitação, $\text{pH}_{\text{inicial}}$, temperatura e aeração.

Nas Figuras 5.19 a 5.21 observam-se os valores de a concentração de células, concentração de açúcares e produção de etanol no processo descontínuo alimentado no fermentador de 2,4 L utilizando $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0, aeração de 0,3 vvm e agitação de 225 rpm, variando o volume inicial do meio de 500 mL, 800 mL e 1000 mL e a vazão de alimentação de 0,0833 L/h, 0,0685 L/h, 0,042 L/h, respectivamente.

Figura 5.19 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$) para o processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0 com volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h. (A) Processo fermentativo completo até 72 h (B) Processo descontínuo alimentado das 48 às 60h.

Fonte :Arquivo pessoal

Figura 5.20 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$) para o processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0 com volume inicial de meio 800 mL e vazão de alimentação 0,0685 L/h. (A) Processo fermentativo completo até 72 h (B) Processo descontínuo alimentado das 48 às 60h.

Fonte :Arquivo pessoal

Figura 5.21 - Concentração de células ($\blacktriangle$), concentração de açúcares ($\blacksquare$) e produção de etanol ($\bullet$) para o processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, $\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0 com volume inicial de meio 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h. (A) Processo fermentativo completo até 72 h (B) Processo descontínuo alimentado das 48 às 60h.

Fonte :Arquivo pessoal

Como pode ser verificado na Figura 5.19 (A), que representa toda a fermentação, o consumo de substrato de foi de 40%, a concentração celular de 3,0 g/L e produção de etanol 10,67 g/L até as 48 h. Na Figura 5.19 (B), que destaca o intervalo de tempo de 48 a 60 h, onde houve a alimentação do meio, verificou-se consumo de substrato de 52,7%, concentração celular de 4 g/L e produção de etanol de 13,17 g/L. A fermentação foi monitorada até o tempo 72 h, em todos os ensaios, conforme as Figuras 5.19 (A), 5.20 (A) e 5.21 (A), sendo que neste tempo final o consumo de açúcar foi de 57,16%, a concentração celular foi de 3,0 g/L, com produção de 13,95 g/L de etanol.

Na condição com volume inicial de meio 800 mL e vazão de alimentação 0,0685 L/h (Figura 5.20 A), verificou-se um consumo de substrato de 34%, concentração celular de 4,5 g/L e produção de etanol 6,99 g/L até as 48 h. Enquanto no processo descontínuo alimentado, de 48 a 60 h (Figura 5.20 B), observou-se consumo de substrato de 56,8%, concentração celular de 5 g/L e um acúmulo de etanol de 8,84 g/L. No tempo final da fermentação houve o consumo de açúcar de 68,5%, concentração celular de 5,0 g/L e produção de etanol de 9,95 g/L.

Já para a condição com volume de meio de 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h (Figura 5.21 A), foram verificadas as menores taxas de consumo de açúcares (31,38%), concentração celular (1,9 g/L) e produção de

etanol (2,95 g/L) em 48 h de fermentação. No intervalo de 48 a 60h, período de batelada alimentada (Figura 5.21 B), observou-se consumo de 56,92% do substrato, concentração celular de 2,5 g/L e produção de etanol de 4,44 g/L, sendo que no tempo de 72 h o consumo de açúcar foi de 61,15%, com concentração celular de 3,7 g/L e produção de 4,67 g/L de etanol.

Também se observa neste experimento que na condição com volume inicial de meio 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h Figura 5.21 (A), a produção de biomassa foi acompanhada pela formação reduzida de etanol em condições de aeração de 0,3 vvm. Este comportamento foi verificado por Santos et al. (2016) no estudo de processo de reciclagem de células para a produção de bioetanol, empregando alta densidade celular de *S. stipitis* no modo sequencial em batelada utilizando como fonte de carbono xilose e mistura de glicose (xarope de cana diluído), observaram que a produção de biomassa foi acompanhada por reduzida ou nula formação de subprodutos em condições aeróbica indicando que os açúcares disponíveis foram direcionados para a conversão de biomassa celular.

Nas Tabelas 5.10 a 5.12 são apresentados os valores dos parâmetros fermentativos obtidos durante as fermentações, em processos descontínuo e descontínuo alimentado, do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L ($\text{pH}_{\text{inicial}}$ 6,0, aeração de 0,3 vvm e agitação de 225 rpm variando o volume inicial do meio de 500 mL, 800 mL e 1000 mL e a vazão de alimentação de 0,0833 L/h, 0,0685 L/h, 0,042 L/h, respectivamente).

Como pode ser verificado na Tabela 5.10, para a fermentação realizada com o volume inicial de meio de 500 mL e vazão de alimentação constante (0,0833 L/h), os maiores valores de $Y_{P/S}$ (0,49 g/L), $Y_{X/S}$ (0,24g/L) e eficiência de conversão (95,53%) foram obtidos em 58 h de fermentação, enquanto o máximo valor de QP (0,49 g/L/h) foi alcançado em 54h, indicando que o processo de alimentação favoreceu a produção de etanol.

Tabela 5.10 – Resultados obtidas durante o estudo do processo descontínuo alimentado na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH_{inicial} 6,0, volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h.

Regime	Tempo (h)	pH	Consumo Açúcares (%)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g/L/h)	Eficiência (%)
“Batch”	0	6,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00
	12	6,28	11,73	2,88	0,38	0,08	0,24	74,11
	24	6,52	22,06	6,12	0,43	0,04	0,26	83,74
	36	6,63	33,81	9,94	0,45	0,08	0,28	88,75
	48	6,83	40,99	10,67	0,40	0,07	0,22	78,56
“Fed-Batch”	50	6,60	42,21	11,23	0,46	0,10	0,28	90,03
	52	6,51	45,69	12,24	0,43	0,08	0,39	83,40
	54	6,35	50,88	13,63	0,41	0,06	0,49	80,87
	56	6,25	52,97	13,58	0,27	0,12	0,36	53,60
	58	6,18	52,69	13,76	0,49	0,24	0,31	95,53
“Batch”	60	6,10	52,77	13,17	0,18	0,13	0,21	34,58
	72	6,10	57,16	13,95	0,38	0,08	0,19	73,67

Fonte :Arquivo pessoal

Tabela 5.11 - Resultados obtidas durante o estudo do processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH_{inicial} 6,0, volume inicial de meio 800 mL e vazão de alimentação 0,0685 L/h

Regime	Tempo (h)	pH	Consumo Açúcares (%)	Etanol (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g/L/h)	Eficiência (%)
Batch	0	6,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	12	6,34	10,72	2,14	0,31	0,04	0,18	60,81
	24	6,59	16,67	4,53	0,42	0,12	0,19	82,78
	36	6,80	22,14	5,80	0,41	0,12	0,16	79,81
	48	7,04	33,81	6,99	0,32	0,13	0,15	62,99
Fed-Batch	50	6,87	36,96	7,23	0,21	0,10	0,12	41,24
	52	6,81	39,39	7,62	0,28	0,10	0,16	54,55
	54	6,79	46,02	7,77	0,11	0,09	0,13	21,72
	56	6,71	51,12	7,93	0,13	0,07	0,12	24,73
	58	6,66	51,71	8,09	0,27	0,17	0,11	53,03
Batch	60	6,61	56,88	8,84	0,23	0,08	0,15	45,42
	72	6,76	68,52	9,99	0,23	0,08	0,14	44,42

Fonte :Arquivo pessoal

Na Tabela 5.11, que apresenta os principais resultados do experimento com volume inicial de 800 mL e vazão constante de alimentação (0,0685 L/h), verifica-se que os maiores valores de $Y_{P/S}$ (0,32 g/L), Q_P (0,19 g/L/h) e eficiência de conversão (82,78%) foram encontrados em 24h de fermentação, anterior ao período de alimentação do meio. Durante o período de alimentação do meio (48 a 60h), verificou-se queda destes parâmetros fermentativos. Também foi verificado, no tempo 58 h, aumento no valor de $Y_{X/S}$ (0,17 g/L), o que pode indicar uma tentativa de adaptação da levedura ao meio, desviando o seu metabolismo de etanol para a formação de biomassa.

Na Tabela 5.12, observa-se que, na condição em que se empregou volume inicial de 1.000 mL e vazão constante de alimentação de 0,042 L/h, os maiores valores dos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ (0,19 g/L), Q_P (0,26 g/L/h) e eficiência de conversão (36,76%) foram em 52 h de fermentação. A baixa eficiência está relacionada ao baixo consumo de açúcares (40,71%) e pequena produção de etanol (3,99 g/L), também indicando que as características da fermentação avaliadas não favoreceram o bioprocessamento.

Tabela 5.12 – Resultados obtidas durante o estudo do processo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH_{inicial} 6,0, volume inicial de meio 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h

Regime	Tempo (h)	pH	Consumo Açúcares (%)	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L/h)	Eficiência (%)
Batch	0	6,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	12	6,31	17,30	0,98	0,09	0,02	0,08	17,08
	24	6,44	22,22	1,40	0,10	0,04	0,06	19,00
	36	6,44	25,17	2,05	0,13	0,05	0,06	24,56
	48	6,50	31,38	2,95	0,15	0,04	0,06	28,34
	50	6,41	34,99	3,05	0,11	0,08	0,05	22,02
Fed-Batch	52	6,76	40,71	3,99	0,19	0,09	0,26	36,76
	54	6,73	42,45	4,09	0,14	0,10	0,19	27,06
	56	6,71	51,43	4,11	0,06	0,05	0,15	12,10
	58	6,69	54,92	4,22	0,10	0,13	0,13	18,95
Batch	60	6,67	56,92	4,44	0,13	0,11	0,12	25,64
	72	6,70	61,15	4,67	0,12	0,06	0,07	23,03

Fonte :Arquivo pessoal

Comparando-se as três condições de processo descontínuo alimentado avaliadas, verifica-se que a condição em que se utilizou volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h apresentou valores de $Y_{P/S}$, Q_P e eficiência 46%, 206,2% e 48,2% maiores que os verificados para a condição que empregou volume inicial de meio 800 mL e vazão de alimentação 0,0685 L/h, respectivamente. E se comparada à condição em que se utilizou volume inicial de meio 1000 mL e vazão de alimentação 0,042 L/h, tais valores foram 115,7%, 88% e 119,9% maiores.

Estes resultados indicam que quando o meio de alimentação foi adicionado mais rapidamente ao fermentador, pode ter provocado um estresse nas leveduras, em função das novas condições do substrato. Já quando a alimentação foi realizada mais lentamente, ou seja vazão de alimentação maior (0,0833 L/h), houve favorecimento do processo fermentativo, sugerindo uma melhor adaptação da levedura *S. stipitis* ao meio.

A condução da fermentação por processo descontínuo alimentado (volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h) resultou em favorecimento da produção de etanol também se comparada ao processo descontínuo, conforme pode ser verificado na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 - Resultados comparativos entre o estudo do Processo descontínuo e Processo descontínuo alimentado obtidos durante a fermentação para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *S. stipitis* em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH_{inicial} 6,0, volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h.

Regime	Tempo (h)	Consumo Açúcares (%)	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L/h)
"Batch"	36	33,81	9,94	0,45	0,08	0,28
"Fed- Batch"	54	50,88	13,63	0,41	0,06	0,49

Fonte :Arquivo pessoal

O processo descontínuo alimentado mostrou ser uma boa estratégia para melhorar a produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. A sua utilização, resultou em aumento de 50% no consumo de açúcares, 75% na produtividade e 37,32% na quantidade de etanol.

Tais resultados também são suportados pelas análises microscópicas realizadas ao longo do processo fermentativo, para todas as condições avaliadas.

Como pode ser observado na Figura 5.22, com exceção das fermentações em processo descontínuo (Figura 5.22 E) e descontínuo alimentado com volume inicial de meio 500 mL e vazão de alimentação 0,0833 L/h (Figura 5.22 A) em todas as outras condições avaliadas observou-se morte celular (Figura 5.22 B), e alteração da morfologia celular (Figura 5.22 C e D), confirmando que quando se empregou maior vazão de alimentação, as células não conseguiram se adaptar às condições ambientais.

Provavelmente, a exposição das células aos inibidores do metabolismo microbiano mais rapidamente, resultou em maior efeito negativo destes ao metabolismo microbiano, o que ocasionou dificuldades para metabolização do substrato presente, com consequente diminuição do crescimento celular e produção de etanol.

Figura 5.22 - Morfologia celular de *Scheffersomyces stipitis* após 50h de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em fermentador STR Bioengineering de 2,4 L com agitação 225 rpm, aeração 0,3 vvm, pH_{inicial} 6,0. (A) Descontínuo Alimentado com volume inicial de meio 500mL e vazão 0,0833L/h; (B) Descontínuo Alimentado com volume inicial de meio 800mL e vazão 0,0685 L/h; (C) e (D) Descontínuo Alimentado com volume inicial de meio 1000mL e vazão 0,042L/h; (E) Descontínuo sem alimentação. As células foram fotografadas em aumento de 100x

Fonte:Arquivo pessoal

Com relação ao pH do meio alimentado este variou durante o processo (Tabela 5.10 a 5.12) e os tempos em que se observaram os maiores valores de pH coincidem com os tempos em que se verificou menor produção de etanol. Na Tabela 5.10 o maior pH_{inicial} (6,83) ocorreu no tempo 48 h, neste tempo observou também a formação de xilitol (1,80 g/L), glicerol (0,11 g/L) e ácido acético (1,13 g/L).

Na Tabela 5.11 o maior pH_{inicial} (7,04) ocorreu no tempo 48 h, observou-se a formação de xilitol (0,42 g/L), glicerol (0,35 g/L) e ácido acético (0,78 g/L). Segundo Rodrigues et al. (2003) e Arruda et al. (2007) a formação de subprodutos do metabolismo microbiano está relacionada ao estresse celular provocado pelas condições ambientais atribuídas à levedura.

Nas três condições apresentadas a conversão de açúcar em etanol foi maior que a conversão de açúcar em biomassa.

Unrean, Nguyen (2013) relatam redução de 30% no rendimento e 23% na produtividade na produção de etanol pela levedura *S. stipitis* em alta concentração de açúcar (100 g/L), quando comparado com fermentação em batelada em baixa concentração de açúcar (20 g/L) nas mesmas condições de cultura. Em sua pesquisa Krahulec et al. (2012) reportam que em altas concentrações de açúcar pode ocorrer estresse osmótico causando uma diminuição na produção de etanol devido ao redirecionamento do fluxo de carbono no sentido de produzir outros subprodutos como xilitol. As fermentações em batelada alimentada são preferidas para minimizar o estresse osmótico causado pela alta concentração de açúcar, entretanto foi observado neste trabalho que as vazões de alimentação escolhida (0,0685 L/h) e (0,042 L/h) a levedura não conseguiram acelerar a utilização de açúcar e produzir etanol.

Vários estudos investigaram a otimização do processo batelada alimentada para alcançar concentrações elevadas de etanol com o tempo de processamento reduzido, (ZHANG et al., 2010; ZHAO et al., 2013; UNREAN; KHAJEERAM; LAOTENG, 2016) o que, melhoraria a economia do processo lignocelulósicos para a produção de etanol.

Unrean; Nguyen (2013) estudando composição de meio e a taxa de crescimento de *S. stipitis* na produção de etanol utilizando o processo descontínuo alimentado, alcançou rendimento de 0,40 g/g e produtividade de 0,42 g/L/h de etanol.

O sucesso de processos de fermentação utilizado no modo descontínuo alimentado depende, entre outros fatores, da alimentação do substrato apropriado. Para isso devem ser evitadas, concentrações mais elevadas, mesmo que ligeiramente pode resultar numa inibição ou mesmo alteração da cultura microbiana quando substratos tóxicos são utilizados (KONAKOVSKY et al., 2016; UNREAN; KHAJEERAM, 2016).

Walker et al, (2009) relatam que fatores, como mudanças do meio de cultivo, temperatura, pH, presença de tóxicos, tempo de cultivo, falta de nutrientes (N_2 e C), presença ou ausência de oxigênio e biodisponibilidade de íons (Mg^{2+}), podem induzir à alteração morfológica na levedura.

De acordo com Mareš et al. (2016), várias abordagens estão disponíveis para controle do processo descontínuo alimentado, métodos de controle incluem estratégias de alimentação. Contudo, os indicadores de desempenho como a produtividade e o rendimento são significativamente influenciados pelo tipo de metabolismo utilizado pelo microrganismo cultivado para o tratamento de substratos. Portanto, a concepção de estratégias de controle de bioprocessos não deve ser limitada apenas para a questão do controle ambiente celular, mas devem, idealmente, também visam o controle da própria fisiologia celular.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- Os efeitos da suplementação nutricional (0,50 g/L) extrato de levedura, (2,00 g/L) peptona, (0,50 g/L) fosfato de potássio, (0,5 g/L) sulfato de magnésio, (0,01 g/L) sulfato de zinco, permitiram, além do aumento da produtividade de etanol por *S. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana, reduzir a adição de nutrientes ao meio de fermentação, o que pode resultar em maior simplicidade da composição do meio e redução de custos do processo.
- A produtividade em etanol foi influenciada pelos parâmetros fermentativos agitação 225 rpm, aeração 0,45 vvm e pH_{inicial} 6,0, no processo descontínuo de produção de etanol a partir bagaço de cana-de-açúcar por *Scheffersomyces stipitis* em fermentador de 1L.
- Ao aumentar a escala de 1:2 a performance da levedura *Scheffersomyces stipitis* se conservou estável sem alteração de sua produtividade, podendo manter-se em escalas maiores.
- O desempenho da levedura *Scheffersomyces stipitis* na fermentação no modo descontínuo alimentado de produção de etanol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar mostrou ser uma boa estratégia nas condições realizadas com volume inicial de meio de 500 mL e vazão de alimentação constante (0,0833 L/h).
- Em comparação com o processo descontínuo, a fermentação em batelada alimentada para a produção de etanol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar apresentou potencial para ser explorado proporcionando um aumento de 75% na produtividade.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar as condições otimizadas deste trabalho no processo de fermentação pela levedura *Scheffersomyces stipitis* para a produção de etanol de segunda geração em maiores escalas de trabalho.
- Avaliar o efeito sobre a produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, analisando outras variáveis do processo como temperatura, concentração celular com a cinética de formação de coprodutos em biorreator agitado.
- Avaliar o desempenho da levedura *Scheffersomyces stipitis* no processo contínuo de produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos utilizando as condições ótimas de suplementação que favoreçam a produtividade em etanol.

REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Journal Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.
- ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Appl Environ Microbiol.**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996.
- ALBUQUERQUE, T.L.D.; DA SILVA JR, I.J.; DE MACEDO, G.R.; ROCHA, M.V.P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1779-1789, 2014.
- ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, I.; CHARPENTIER, C. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 20, p. 173-183, 1994.
- ALVES, L.; FELIPE, M.A.; SILVA, J.A.; SILVA, S.; PRATA, A.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 89-98, 1998.
- AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-Xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 211-214, 1994.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, p. 56-62, 2007.
- ARSLAN, Y.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8664-8670, 2010.
- AVELINO GONÇALVES, F.; DOS SANTOS, E.S.; DE MACEDO, G.R. Use of cultivars of low cost, agroindustrial and urban waste in the production of cellulosic ethanol in Brazil: A proposal to utilization of microdistillery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1287-1303, 2015.
- BABOUKANI, B.S.; VOSSOUGH, M.; ALEMZADEH, I. Optimisation of dilute-acid pretreatment conditions for enhancement sugar recovery and enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biosystems Engineering**, v. 111, n. 2, p. 166-174, 2012.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo**. In: Amorim, H.V. (Ed.). Processos de produção de álcool. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. Cap.4. p. 38-85.

BASTOS, V.D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. In: SETORIAL, B. (Ed.). Rio de Janeiro: Editora. 2007. p. 5-38.

BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M.T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 133, n. 0, p. 51-58, 2013.

BELTRAN, G.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 996-1002, 2005.

BELY, M.; RINALDI, A.; DUBOURDIEU, D. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 507-512, 2003.

BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: Part II: Hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 14-15, 2010.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 678-687, 2000.

BISWAS, R.; UELLEND AHL, H.; AHRING, B. Conversion of C6 and C5 sugars in undetoxified wet exploded bagasse hydrolysates using *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS6054. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 42, 2013.

BLOOMBERG. Cellulosic ethanol heads for cost competitiveness by 2013. Disponível em: <<http://bnef.com/Downloads/pressreleases/284/pdf/files/>>. Acesso em: 04 nov 2014

BORGES, P.C.S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. 2008. 141 f. (Mestrado) - Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BUCKERIDGE, M.; SANTOS, W.D.; DE SOUZA, A.P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. . In: CORTEZ, L.a.B.C.; (Eds.), E.B.. **Etanol: Pesquisa & Desenvolvimento**, 2010.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomannan from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, p. 109-112 1990.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSSÁN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.-A.; ROSA, C.A. Diversity and physiological characterization of D-Xylose-Fermenting yeasts isolated from the brazilian amazonian forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012.

CAMPOS, L.F.A.; AMORIM, L.V.; FERREIRA, H.C. Utilização do planejamento experimental no estudo do efeito da composição de misturas de bentonitas na reologia de fluidos de perfuração. Parte II: composições ternárias. **Cerâmica**, v. 53, p. 68-73, 2007.

CANETTIERI, E.V.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de Cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; DE ALMEIDA FELIPE, M.; DE ALMEIDA E SILVA, J.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 84-92, 2010.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARMOUZE, J.P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. Sao Paulo: Editora Edgard Blücher - FAPESP, 1994. 254 p.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; LIDÉN, G. fermentation of the straw material paja brava by the yeast *Pichia stipitis* in a simultaneous saccharification and fermentation process. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 03, n.02, p. 8, 2013.

CARVALHO, D.M.D.; SEVASTYANOVA, O.; PENNA, L.S.; SILVA, B.P.D.; LINDSTRÖM, M.E.; COLODETTE, J.L. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.D. Semi- continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 47-53, 2007.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

CGEE. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil In: CGEE (Ed.). Brasília 2009. p. 536.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S.R.D.; SINGH, O.V. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production In: BERNARDES, M.a.D.S. (Ed.). Biofuel Production-Recent **developments and prospects**:Brasil InTech, 2011. Cap.10. p. 606

CHAUD, L.C.S.; SILVA, D.D.V.D.; MATTOS, R.T.D.; FELIPE, M.D.G.D.A. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipitis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, p. 771-777, 2012.

CHEN, H.; LI, G. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 74, n. 0, p. 121-126, 2013.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; LING, H.; ZHOU, Y.; GE, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.

CHENG, N.G.; HASAN, M.; KUMORO, A.C.; LING, C.F.; THAM, M. Production of ethanol by fed-batch fermentation. **Journal Science and Technology Pertanika**, v. 17, n. 2, p. 399-408, 2009.

CHO, D.H.; SHIN, S.-J.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y.H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4947-4951, 2010.

CINELLI, B.A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 183 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Engenharia Química /COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CLAASSEN, M.P.A.; VAN LIER, B.J.; LOPEZ CONTRERAS, M.A.; VAN NIEL, J.E.W.; SIJTSMA, L.; STAMS, M.A.J.; DE VRIES, S.S.; WEUSTHUIS, A.R. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 741-755, 1999.

CNPEM. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais Futuro brilhante do etanol celulósico está ameaçado. Disponível em:<<http://cnpem.br/futuro-brilhante-etanol-celulosico-esta-ameacado/#top>>. Acesso em: 04/06/2016

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de cana de açúcar. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_12_12_10_34_43_boletim_cana_portugues_12_2012.pdf>. Acesso em: dez 2013

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_18_12_03_30_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf>. Acesso em: agosto 2016

CONVERSE, A.O.; WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. **IEA/Biofor Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems** 1994.

CORREIA, M.F. **Produção de bioetanol a partir de licor de cozimento ao sulfito ácido**. 2008. 98 f. (Mestrado) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

CORTEZ, L.A.B.; JUNIOR, R.B.; ALMEIDA, E. Energia da cana-de-açúcar. In: SANTOS, F.C., J.; QUEIROZ, J. H. (Ed.). **Bioenergia e biorrefinaria- cana-de-açúcar e Espécies Florestais** -. Viçosa, 2013. p. 17-58.

CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. **Biomassa para bioenergia**. Campinas: UNICAMP, 2008. p.

D'ALMEIDA, M.L.O. Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. **Escola SENAI**, 1988.

DALE, B.E.; KIM, S. **Biomass refining global impact—the biobased economy of the 21st century**. In: BIOREFINERIES-industrial processes and products: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p. 41-66.

DAMASO, M.C.T.; MACHADO, C.M.M.; RODRIGUES, D.D.S.; BELEM, S.G.; SALUM, T.F.C. Bioprocesses for biofuels: an overview of the Brazilian case. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2014.

DAUBERMANN, E.C.; CHAGAS, L.S.; GURGEL, A.C.; SAKURAI, S.N. Expansão da área agrícola e produtividade das culturas no Brasil: testando hipóteses da legislação californiana de biocombustíveis. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, p. 81-98, 2014.

DE OLIVEIRA, D. **Uso de um sensor de compostos voláteis para o controle de uma fermentação batelada alimentada de *Sacharomyces cerevisiae***. 1995. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico., 1995.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 12, p. 897-900, 1986.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 11, p. 2782-2801, 2009.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: a solution to pollution problems. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3541-3547, 2011.

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

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting Dxylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 16, p. 944-952, 1994b.

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

DUSSÁN, K.J. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético**. 2013. 172 f. (Doutora em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2013.

DUSSÁN, K.J.; SILVA, D.D.V.; PEREZ, V.H.; DA SILVA, S.S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, v. 87, Part 1, p. 703-710, 2016.

EKEN-SARAÇOGLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 855-858, 2000.

ELLISTON, A.; COLLINS, S.R.A.; WILSON, D.R.; ROBERTS, I.N.; WALDRON, K.W. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 117-126, 2013.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE,. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**. Brasília . 2013.

ESCOBAR, J.C.; LORA, E.S.; VENTURINI, O.J.; YÁÑEZ, E.E.; CASTILLO, E.F.; ALMAZAN, O. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1275-1287, 2009.

FAULON, J.-L.; CARLSON, G.A.; HATCHER, P.G. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. **Organic Geochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1169-1179, 1994.

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 171-177, 1995.

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

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood and cellulosic chemistry**, 1991 p. 189-200,.

FERREIRA, A.D.; DUSSÁN, K.; CHANDEL, A.K.; RODRIGUES, R.C.L.B.; DA SILVA, S.S. Influence of the Yeast Extract as Nitrogen Source on Bioethanol Production by a new xylose fermenting yeast *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* UFMG-IMH 43.2 *The World Congress on Industrial Biotechnology & Bioprocessing*, 2011. Toronto, Ontario, Canada.

FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. 7, p. 547-554, 2011.

FRANÇA, F.P.; RODRIGUES, M.C.S. Fermentação alcoólica desenvolvida por *Zymomonas mobilis* CP3. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 27, p. 55-60, 1985.

FURLAN, S.A.; DELIA-DUPUY, M.L.; STREHAIANO, P. Xylitol production in repeated fed batch cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-592, 1997.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. .In: CORTEZ, L.A.B. (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 697-716.

GAO, H.; TAN, T. Fed-batch fermentation for ergosterol production. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 345-350, 2003.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GÓMEZ, E.O.; SOUZA, R.T.G.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA, E.; CORTEZ, L.A.B. A palha de cana-de-açúcar como matéria-prima para processos de segunda geração. In: CORTEZ (Ed.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: PeD para produtividade sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 637-659.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GREEN, D.W.; PERRY, R.H. **Perry's chemical engineers' handbook**. 7th. ed. New York: McGraw-Hill, 1977. 2700 p.

HAGHIGHI MOOD, S.; HOSSEIN GOLFESHAN, A.; TABATABAEI, M.; SALEHI JOUZANI, G.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, n. 0, p. 77-93, 2013.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 16, p. 933-942, 1994.

HARMSSEN, P.F.H.; HUIJGEN, W.J.J.; BERMÚDEZ LÓPEZ, L.M.; BAKKER, R.R.C. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Wageningen: Food & Biobased Research, 2009. 54 p.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

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

HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. **BioEnergy Research**, v. 4, n. 4, p. 225-245, 2011.

IEL. Instituto Euvaldo Lodi – **Álcool combustível**. Disponível em: <http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_24/2012/07/06/125/20121101182425435007o.pdf>. Acesso em: 07 dez 2015

INGLEDEW, W.M. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: JACQUES, K. A., .P.L.a.N.K. (Ed.). **The alcohol textbook**. 3rd. ed. UK: Nottingham University Press, 1999.

INLOES, D.S.; TAYLOR, D.P.; COHEN, S.N.; MICHAELS, A.S.; ROBERTSON, C.R. Ethanol production by *S. cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 264-278, 1983.

JEFFRIES, T. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: PENTOSEs and lignin. Berlin: Heidelberg, 1983. p. 1-32.

JIN, Y.-S.; JEFFRIES, T.W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 6, n. 3, p. 229-238, 2004.

JONES, R.P.; GADD, G.M. Ionic nutrition of yeast—physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 6, p. 402-418, 1990.

JONSSON, L.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

JØRGENSEN, H. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, n. 1-3, p. 44-57, 2009.

KADAM, K.L.; SCHMIDT, S.L. Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 6, p. 709-713, 1997.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M.J. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 653-658, 2006.

KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of chemical technology**. New York: John Wiley & Sons, 2001. 1087 p.

KONAKOVSKY, V.; CLEMENS, C.; MÜLLER, M.; BECHMANN, J.; BERGER, M.; SCHLATTER, S.; HERWIG, C. Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness. **Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 5, 2016.

KRAHULEC, S.; KRATZER, R.; LONGUS, K.; NIDETZKY, B. Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation. **MicrobiologyOpen**, v. 1, n. 1, p. 64-70, 2012.

KRÄSSIG, H.; SCHURZ, J.; STEADMAN, R.G.; SCHLIEFER, K.; ALBRECHT, W.; MOHRING, M.; SCHLOSSER, H. ULLMANN'S **Encyclopedia of industrial chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151 - 172, 1993.

KURTZMAN, C.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2-14, 2010.

LAMERS, P.; HAMELINCK, C.; JUNGINGER, M.; FAAIJ, A. International bioenergy trade a review of past developments in the liquid biofuel market. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 2655-2676, 2011.

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4176-4182, 2009.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1036-1043, 2010.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; KWON, S.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H₂/CO₂ supply and glucose concentration. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, p. 549-554, 1999b.

LEE, P.C.; LEE, W.G.; LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. **Proc. Biochem**, v. 35, p. 49-55, 1999a.

LIGTHELM, M.E.; PRIOR, B.A.; PREEZ, J.C. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of d-xylose and d-glucose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 63-68, 1988.

LIMA, A.O.S.; RODRIGUES, A.L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de ciências ambientais**, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LIN, T.-H.; HUANG, C.-F.; GUO, G.-L.; HWANG, W.-S.; HUANG, S.-L. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 116, n. 0, p. 314-319, 2012.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts **Journal of Industrial Microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 75-81, 1998.

LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro:Editora Interciencia , 2012.

MAREŠ, J.; KUKAL, J.; HRNČIŘÍK, P.; NÁHLÍK, J. Process state classification of fed-batch fermentation based on process variables analysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 178-185, 2016.

MARQUES, S.; ALVES, L.; ROSEIRO, J.C.; GÍRIO, F.M. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 5, p. 400-406, 2008.

MARTINS, L.H.D.S.; RABELO, S.C.; COSTA, A.C.D. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 312-321, 2015.

MAYALAGU, S.; PATTURAJAN, M.; CHATTERJI, D. The presence of two tightly bound Zn²⁺ ions is essential for the structural and functional integrity of yeast RNA polymerase II1. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 77-85, 1997.

MESA, L.; SANTOS, J.C.; FORTE, M.B.S.; SILVA, S.S. Efeito do pré-tratamento com líquido iônico [Bmim]Cl sobre a hidrólise enzimática e a estrutura da celulose de bagaço de cana-de-açúcar. XX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS (SINAFERM 2015), XI SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (SHEB 2015) 11, 2015 Fortaleza.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: treatment, disposal, and reuse**. 3rd. ed. Boston: McGraw-Hill, 1991. 1334 p.

MILANEZ, A.Y.; NYKO, D.; VALENTE, M.S.; SOUSA, L.C.; BONOMI, A.M.F.L.J.; JESUS, C.D.F.D.; WATANABE, M.D.B.; CHAGAS, M.F.; REZENDE, M.C.A.F.; CAVALETT, O. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar: uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial**, n. 41, 2015.

MILESSI, T.S.S.; ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 373-379, 2013a.

MILESSI, T.S.S.; CHANDEL, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; SILVA, S.S.D. Immobilization of *Scheffersomyces stipitis* cells with calcium alginate beads: A sustainable method for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioethanol**, v. 1, n. 1, 2013b.

MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004.

MME - MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA . Resenha Energética Brasileira. Disponível em:<<http://www.mme.gov.br/documents/1138787/1732840/Resenha+Energ%C3%A9tica+-+Brasil+2015.pdf/4e6b9a34-6b2e-48fa-9ef8-dc7008470bf2>>. Acesso em: 25/10/2015

MONCADA, J.; TAMAYO, J.; CARDONA, C.A. Evolution from biofuels to integrated biorefineries: techno-economic and environmental assessment of oil palm in Colombia. **Journal of Cleaner Production**, v. 81, n. 0, p. 51-59, 2014.

MORA-PALE, M.; MELI, L.; DOHERTY, T.V.; LINHARDT, R.J.; DORDICK, J.S. Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1229-1245, 2011.

MORO, M.K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química.) - Pós-graduação em Engenharia Química UFRJ/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro Rio de Janeiro, 2015.

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

MUSSATTO, S.I.; MACHADO, E.M.S.; CARNEIRO, L.M.; TEIXEIRA, J.A. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. **Applied Energy**, v. 92, n. 0, p. 763-768, 2012.

MUSSATTO, S.I.; MONCADA, J.; ROBERTO, I.C.; CARDONA, C.A. Techno-economic analysis for brewer's spent grains use on a biorefinery concept: the brazilian case. **Bioresource Technology**, v. 148, n. 0, p. 302-310, 2013.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; KU ISMAIL, K.S. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *S. cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 251-260, 2004.

NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, p. 586-592, 2001.

NGHIEM, N.P.; DAVISON, B.H.; SUTTLE, B.E.; RICHARDSON, G.R. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. **Appl. Biochem. Biotechnol**, p. 565-576, 1997.

NIGAM, J.N. Continuous alcoholic fermentation of glucose xylose mixtures by co-immobilized *S. cerevisiae* and *C. shehatae*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p. 189-193, 2000.

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001.

NIGAM, J.N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xilose-fermenting yeast. **Journal of Biotechnology Progress**, v. 97, p. 107-116, 2002.

NREL.National Renewable Energy Laboratory **What Is a Biorefinery**. Disponível em:<<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acesso em: 24 out 2015

O'CONNOR, R.P.; WOOLEY, R.; KOLSTAD, J.J.; KEAN, R.T.; GLASSNER, D.A.; MASTEL, B.; RITZENTHALER, J.M.; BIRK, R.H.; WARWICK, J.; HETTENHAUS, J.R.; BROOKS, R.K. **Process for fractionating lignocellulosic biomass into liquid and solid products**. U.S. Patent n. 20,090,176,286, 9 jul. 2009.

ODUMERO, J.A.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Effect of heat and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Jornal of Industrial Microbiology**, v. 10, p. 111-116, 1992.

OLIVEIRA, F.D.C. **Oxidação de lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos agroindustriais para obtenção de compostos químicos aromáticos de maior valor agregado**. 2015. 199 f. Doutorado (Tese) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

OLIVEIRA, F.P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysate. **Process Biochemistry** v. 28, p. 249-257, 1993.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

OLSSON, L.; LINDÉN, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Performance of microorganisms in spent sulfite liquor and enzymatic hydrolysate of steam-pretreated. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 359-368, 1992.

PACHECO, T.F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Circular técnica**. In: Embrapa, 2011.

PAES, B.; ALMEIDA, J. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2014.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000a.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. Part I. Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PAPINI, M.; NOOKAEW, I.; UHLÉN, M.; NIELSEN, J. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 136-136, 2012.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 3, p. 191-201, 1998a.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998b.

PELCZAR, M.J.; CHANG, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA JR., N. **Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D.** 1991. - Department of Chemistry, The University of Manchester, U.K., 1991.

PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p. Séries em Biotecnologia - Tecnologia de Bioprocessos.

PEREIRA, S.C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C.M.M.; FARINAS, C.S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, p. 44, 2015.

PIRT, J.S. **Principles of microbe and cell cultivation**. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.

PORTO, L.M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. 2005. 139 f. Doutorado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

POSADA, J.A.; PATEL, A.D.; ROES, A.; BLOK, K.; FAAIJ, A.P.C.; PATEL, M.K. Potential of bioethanol as a chemical building block for biorefineries: Preliminary sustainability assessment of 12 bioethanol-based products. **Bioresource Technology**, v. 135, n. 0, p. 490-499, 2013.

QUINTERO, J.A.; RINCÓN, L.E.; CARDONA, C.A. Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks. In: **BIOFUELS**. Amsterdam: Academic Press, 2011. p. 251-285.

RAGAUSKAS, A.J.; WILLIAMS, C.K.; DAVISON, B.H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C.A.; FREDERICK, W.J., JR.; HALLETT, J.P.; LEAK,

D.J.; LIOTTA, C.L.; MIELENZ, J.R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

RANZAN, C. **Fermentação contínua de *Zymomonas mobilis*: Modelagem, ajuste de parâmetros e inferências a partir do consumo de hidróxido de sódio**. 2010. 151 f. Mestrado (Mestre) - Departamento de Engenharia Química, Universidad Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**. New York: W.H. Freeman & Company, 1992.

REES, E.M.R.; STEWART, G.G. The effects of magnesium and calcium on yeast fermentation performance in high gravity worts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 103, n. 5, p. 287-291, 1997.

RENÓ, M.L.G.; OLMO, O.A.D.; PALACIO, J.C.E.; LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. Sugarcane biorefineries: Case studies applied to the Brazilian sugar–alcohol industry. **Energy Conversion and Management**, v. 86, n. 0, p. 981-991, 2014.

REYES-ORTIZ, V.; HEINS, R.A.; CHENG, G.; KIM, E.Y.; VERNON, B.C.; ELANDT, R.B.; ADAMS, P.D.; SALE, K.L.; HADI, M.Z.; SIMMONS, B.A.; KENT, M.S.; TULLMAN-ERCEK, D. Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 93-93, 2013.

REZENDE, C.A.; DE LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 54-54, 2011.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15-21, 1991.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SOUZA, C.M.A.; FELIPE, M.G.A.; SATO, S.; CASTRO, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 11, p. 1211-1216, 1994.

ROCHA, G.J.D.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONÇALVES, A.R.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

ROCHA, G.J.M.; MARTÍN, C.; DA SILVA, V.F.N.; GÓMEZ, E.O.; GONÇALVES, A.R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447-452, 2012.

RODMUI, A.; KONGKIATTIKAJORN, J.; DANDUSITAPUN, Y. Optimization of agitation conditions for maximum ethanol production by coculture. **Kasetsart J**, v. 42, p. 285-293, 2008.

RODRIGUES, B.; LIMA-COSTA, M.E.; CONSTANTINO, A.; RAPOSO, S.; FELIZARDO, C.; GONÇALVES, D.; FERNANDES, T.; DIONÍSIO, L.; PEINADO, J.M. Growth kinetics and physiological behavior of co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, fermenting carob sugars extracted with whey. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 92, p. 41-48, 2016.

RODRIGUES, D.C.G.A.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate. **Journal of Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 73-77, 1998.

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

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 2, p. 103-107, 2003.

ROEPCKE, C.B.S. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de biomassa de levedura rica em zinco orgânico**. 2007. 133 f. Dissertação (Mestrado) - Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RUSSELL, I. Understanding yeast fundamentals. In: TEXTBOOK, H.A. (Ed.). **A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. UK: Nottingham University Press, 2003.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALES, B.B. **Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses**. 2010. 30 f. Mestrado (Mestre) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SAMUELOV, N.S.; R., L.; S., L.; J.G., Z. Influence of CO₂ HCO₃-level and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. . **Appl Environ Microbiol**, v. 57, p. 3013, 1991.

SÁNCHEZ, Ó.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANT'ANA DA SILVA, A.; LEE, S.-H.; ENDO, T.; P.S. BON, E. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim] [Ac]). **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10505-10509, 2011.

SANTOS, D.D.S.D. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. 218 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, F.A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2013. 94 f. (Tese (doutorado)) - Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H.D.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J.S. **Desenvolvimento e Otimização de metodologias para a determinação de nitrogênio**. 2007. 84 f. (Mestrado) - Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SANTOS, S.C.; DE SOUSA, A.S.; DIONÍSIO, S.R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F.M.; VAZ ROSSELL, C.E.; DA COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 319-329, 2016.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U.A. et al (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. . São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 179-192.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.D.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: BIOTECNOLOGIA industrial. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 123-178.

SCORDIA, D.; COSENTINO, S.L.; LEE, J.-W.; JEFFRIES, T.W. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, n. 0, p. 296-305, 2012.

SEABRA, J.E.A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações** 2008. 298 f. (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SILVA, D.D.V.; ARRUDA, P.V.; DUSSÁN, K.J.; FELIPE, M.D.G.D.A. Adaptation of *Scheffersomyces stipitis* Cells as a strategy to the improvement of ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 427-432, 2014.

SILVA, D.D.V.; DUSSÁN, K.J.; HERNÁNDEZ, V.; SILVA, S.S.D.; CARDONA, C.A.; FELIPE, M.D.G.D.A. Effect of volumetric oxygen transfer coefficient (kLa) on ethanol production performance by *Scheffersomyces stipitis* on hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 249-257, 2016.

SILVA, D.D.V.D.; CANDIDO, E.J.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Fermentative performance of *P. stipitis* and *C. guilliermondii* yeasts grown in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with different nutrients. In: BRAZILIAN BIOENERGY SCIENCE AND TECHNOLOGY CONFERENCE. 2011 Campos do Jordão - SP.

SILVA, J.P.A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 151-156, 2011.

SILVA, J.P.A.; 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, n. 1, p. 259-265, 2012.

SILVA, L.D.A.F.E. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2010.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-667, 2009.

SILVA, S.S.; MATOS, Z.R.; CARVALHO, W. Effects of sulfuric acid loading and residence time on the composition of sugarcane bagasse hydrolysate and its use as a source of xylose for xylitol bioproduction. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 5, p. 1449-1452, 2005.

SILVA, S.S.; VITOLO, M.; PESSOA JR, A.; FELIPE, M.G.A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 187-191, 1996.

SILVA, V.F.N. **Avaliação de parâmetros experimentais do fracionamento do bagaço de cana-de-açúcar na obtenção de etanol celulósico e lignina**. 2014. 145 f. (Doutorado em Ciências) - Escola de engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N.R. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, v. 116, n. 0, p. 699-702, 2014.

SINGH, L.K.; MAJUMDER, C.B.; GHOSH, S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, n. 0, p. 150-157, 2014.

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3389-3394, 1990.

SKOOG, K.; JEPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 369-375, 1992.

SLININGER, P.; DIEN, B.; GORSICH, S.; LIU, Z. Nitrogen source and mineral optimization enhance d-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1285-1296, 2006.

SLININGER, P.J.; BRANSTRATOR, L.E.; BOTHAST, R.J.; OKOS, M.R.; LADISCH, M.R. Growth, death, and oxygen uptake kinetics of *Pichia stipitis* on xylose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 10, p. 973-980, 1991.

SLININGER, P.J.; GORSICH, S.W.; LIU, Z.L. Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 778-790, 2009.

SOARES, P.A.; ROSSELL, C.E.V. Conversão de celulose pela tecnologia Organosolv. **NAIPPE - USP**, v. 3, 2007.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.D.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; SILVA BON, E.P.D.; MORAES,

L.M.P.D.; ARAÚJO, J.D.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SORDA, G.; BANSE, M.; KEMFERT, C. An overview of biofuel policies across the world. **Energy Policy**, v. 38, n. 11, p. 6977-6988, 2010.

SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 3, p. 253-260, 2000.

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

TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 3, p. 330-338, 2000.

TEIXEIRA, J.A.; DA FONSECA, M.M. **Reactores biológicos: fundamentos e aplicações**. Lisboa: LIDEL, 2007.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2162-2169, 2008.

THERMOWOOD. **ThermoWood® Handbook**. Helsinki, Finland: Finnish Thermowood Association, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920 p.

UNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR **Associados da Unica mais próximas de produzir etanol celulósico**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/na-midia/29810917920337549416/associadas-da-unica-mais-proximas-de-produzir-etanol-celulosico/>>. Acesso em: 10 julh. de 2014

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S. Optimization and techno-economic assessment of high-solid fed-batch saccharification and ethanol fermentation by *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* consortium. **Renewable Energy**, v. 99, p. 1062-1072, 2016.

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S.; LAOTENG, K. Systematic optimization of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high-solid loading based on enzymatic hydrolysis and dynamic metabolic modeling of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2459-2470, 2016.

UNREAN, P.; NGUYEN, N.A. Optimized fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 6, p. 1895-1909, 2013.

VAN'T RIET, K.; TRAMPER, J. **Basic bioreactor design**. New York: CRC Press, 1991. p.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VAZ JUNIOR, S. Biorrefinarias cenários e perspectivas Disponível em:<http://www.sifloresta.ufv.br/bitstream/handle/123456789/10778/EMBRAPA_Biorrefinarias-Cen%C3%A1rios-e-Perspectivas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 out 2015

VELASCO, J. Improving Brazil's sugarcane ethanol: sustainable energy & climate change, 2009. Disponível em:<www.oecd.org/dataoecd/29/1/43457520.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2014

VIEGAS, A. Com etanol celulósico, produtividade de canaviais em litros por hectare pode crescer 35%. Disponível em:<Disponível em:<<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticia&cod+1101445#nc/>>>. Acesso em: 20 maio 2013

WALKER, G.M. Yeasts. In:MOSELIO, S. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology** (3rd ed). Oxford: Academic Press, 2009. p. 478-491.

WANG, X.D.; BOHLSCHEID, J.C.; EDWARDS, C.G. Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 349-359, 2003.

WILSON, D.K.; KAVANAGH, K.L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo-keto reductases and opportunities for protein engineering. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143-144, p. 515-521, 2003.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of -xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

WOOD, T.M.; SADDLER, J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 3-11, 1998.

WYMAN, C.E. Special issue: biotechnology for the conversion of lignocellulosics Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 3-15, 1994.

XIROS, C.; OLSSON, L. Comparison of strategies to overcome the inhibitory effects in high-gravity fermentation of lignocellulosic hydrolysates. **Biomass and Bioenergy**, v. 65, n. 0, p. 79-90, 2014.

YOSHIDA, F.; YAMANE, T.; NAKAMOTO, K.I. Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 2, p. 257-270, 1973.

ZENG, Y.; WEI, N.; LOU, M.; FU, L.; XIONG, P.; WANG, H. Calcium chloride improve ethanol production in recombinant *Zymomonas mobilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 45, p. 7687-7691, 2010.

ZHANG, M.; WANG, F.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4959-4964, 2010.

ZHAO, X.; DONG, L.; CHEN, L.; LIU, D. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 350-356, 2013.