

Fabrcia Farias de Menezes

SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DA INDÚSTRIA DA PASTA E PAPEL PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Coimbra 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Fabília Farias de Menezes

Sacarificação e fermentação simultâneas de resíduos lignocelulósicos da indústria da pasta e papel para a produção de bioetanol

Dissertação na área científica da Engenharia Química submetida ao Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra e inserida no projeto "Energy and Mobility for Sustainable Regions - EMSURE (CENTRO-07-0224-FEDER-002004)"

Supervisor:

Prof. Dr. Jorge Manuel dos Santos Rocha

Instituições:

CIEPQPF - Centro de Investigação de Engenharia de Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, DEQ/FCTUC - Portugal

DEQ - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra - Portugal

Coimbra
2013

• U •



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais,
Helenise e Luiz (*In memoriam*),
que nunca mediram esforços para me ajudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela força necessária concedida para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial, minha mãe Helenise e meu pai Luiz (*In memorian*) por todo amor e por sempre me terem incentivado aos estudos e meu querido irmão Gabriel. A vitória de concluir mais esta etapa também é vossa!

Ao meu orientador professor Doutor Jorge Rocha por ter-me dado a oportunidade de estar na Universidade de Coimbra. Foi uma imensa satisfação participar deste intercâmbio, algo tão diferente e novo para mim. Os meus sinceros agradecimentos, muito obrigada por tudo!

Aos amigos e equipa de trabalho do Laboratório B27 (Cátia, Liliana, Renan e Ivo). Foi uma imensa alegria e satisfação tê-los como amigos e colegas de trabalho. Agradeço de forma toda especial à Cátia que sempre esteve disponível a ajudar. Uma única palavra que a resume - espetacular!

A todos os funcionários e docentes da UC que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de Coimbra, em especial, Alexandra, Karina, Manuela, Paulo e Wendell e também aos meus amigos Adam, Ana, Andréa, Janaína, Monik e Sonaia que mesmo longe me apoiaram. Muito obrigada!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa/Brasil (CNPq) a concessão de bolsa de graduação sanduíche que me atribuiu.

Este trabalho está inserido no projeto Energy and Mobility for Sustainable Regions - EMSURE (CENTRO-07-0224-FEDER-002004).

RESUMO

Durante o século passado a produção de dióxido de carbono (CO₂) cresceu de forma exponencial devido à grande expansão no setor dos transportes. O primeiro passo para prevenir mudanças irreversíveis e reduzir os impactos dos gases com efeito estufa no clima seria utilizar combustíveis alternativos, como o bioetanol, derivados de biomassa. A estratégia mais promissora para a obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica é a sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* – SSF). No entanto, o problema crítico da SSF é a diferença existente entre as temperaturas ótimas de atuação do extrato enzimático (45-50°C) e do microrganismo fermentativo (30-37°C). Uma possível solução para este problema seria utilizar microrganismos termotolerantes que cresçam a uma temperatura mais elevada. Entre as espécies de leveduras etanólicas, a que se destaca pela sua termotolerância é a espécie *Kluyveromyces marxianus*. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal valorizar os resíduos lignocelulósicos, nomeadamente lamas primárias provenientes da indústria de pasta e papel, como matéria-prima para a produção de bioetanol por SSF. Foi realizado um estudo prévio para avaliar o crescimento celular de duas estirpes, *S. cerevisiae* (comercial) e *K. marxianus* NCYC 1426, para as temperaturas de 30, 38 e 42°C. Mediante os resultados obtidos, optou-se por utilizar a temperatura de 38°C nos ensaios SSF para *S. cerevisiae* (comercial) e as temperaturas de 38 e 42°C para *K. marxianus* NCYC 1426. Foram realizados diversos ensaios SSF com as estirpes *S. cerevisiae* (comercial) a 38°C e *K. marxianus* NCYC a 38 e 42°C em regime descontínuo ou semi-descontínuo. Como fonte de carbono utilizou-se a fracção de hidratos de carbono (HC) da pasta crua (referência) e da lama primária (não tratada ou pré-tratada com HCl), com concentrações iniciais de 25 ou 50 g/L em regime descontínuo e concentrações totais até 100 ou 200 g/L em regime semi-descontínuo. Dentro dos ensaios SSF realizados com a *S. cerevisiae* (comercial), as concentrações máximas de etanol alcançadas foram 47,5 g/L no ensaio da pasta crua (200 g/L de HC), 43 g/L no ensaio da lama primária (200 g/L de HC) e 28,1 g/L no ensaio da lama primária pré-tratada (100 g/L de HC) em semi-descontínuo. Dentro dos ensaios SSF realizados com a *K. marxianus* NCYC 1426, as maiores concentrações de etanol obtidas foram de 33,2 g/L e 29,9 g/L nos ensaios da pasta crua e lama primária, respectivamente, em regime semi-descontínuo com carga de hidratos de carbono de 200 g/L a 42°C. Em resumo, os ensaios SSF com a lama primária (não tratada e pré-tratada) utilizando a *S. cerevisiae* (comercial) ou a *K. marxianus* NCYC 1426 demonstraram ser

promissores para a produção de bioetanol. No entanto, há necessidade de realizar estudos adicionais a fim de melhorar/otimizar a performance das estirpes para a obtenção de bioetanol.

ABSTRACT

During the last century the production of carbon dioxide (CO₂) has grown exponentially due to the big expansion in the transport sector. The first step to prevent irreversible changes and reduce the impacts of greenhouse gases on climate would be to use alternative fuels, such as bioethanol, derived from biomass. The strategy with great potential for obtaining bioethanol from lignocellulosic biomass is the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). However, the critical problem of SSF is the difference between the optimal temperature of the enzymatic extract (45-50°C) and of the fermentative microorganism (30-37°C). A possible solution to this problem would be to use thermotolerant organisms that grow at higher temperatures. Among the species of ethanolic yeasts, the one which stands out for its thermotolerance is the species *Kluyveromyces marxianus*. In this context, the present study had as the main objective the valorisation of lignocellulosic wastes, such as primary sludge from pulp and paper industries, as raw material for bioethanol production by SSF. We performed preliminary studies to evaluate the cell growth of two strains, *S. cerevisiae* (commercial) and *K. marxianus* NCYC 1426, at temperatures of 30, 38 and 42°C. According to the results obtained, we chose to use the temperature of 38°C in SSF experiments for *S. cerevisiae* (commercial) and temperatures of 38 to 42°C for *K. marxianus* NCYC 1426. Various SSF experiments were performed with strains *S. cerevisiae* (commercial) at 38°C and *K. marxianus*, NCYC at 38 and 42°C under batch or fed-batch operation conditions. The fraction of the carbohydrate (HC) of unbleached pulp (reference) and of primary sludge (untreated or pretreated with HCl) was used as carbon source, with initial concentrations of 25 or 50 g/L in batch systems and total concentrations until 100 to 200 g/L in fed-batch assays. Among the SSF experiments performed with *S. cerevisiae* (commercial), maximum ethanol concentrations of 47.5 g/L in the unbleached pulp assay (200 g/L HC), 43 g/L in the primary sludge assay (200 g/L HC) and 28.1 g/L in the pretreated primary sludge assay (100 g/L HC) were obtained in fed-batch conditions. *K. marxianus*, NCYC 1426 produced ethanol concentrations of 33.2 g/L and 29.9 g/L, in SSF experiments of unbleached pulp and primary sludge, respectively, in fed-batch conditions (200 g/L HC at 42°C). In summary, the SSF experiments with primary sludge (untreated and pretreated) using *S. cerevisiae* (commercial) or *K. marxianus* NCYC 1426 demonstrated to be promising for the production of bioethanol. However, there is a need to perform further studies to improve/optimize the performance of the strains for obtaining bioethanol.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Contexto energético.....	4
2.2 Biorrefinaria.....	7
2.3 Biomassa.....	9
2.4 Produção de papel.....	12
2.5 Produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica.....	15
2.5.1 Hidrólise.....	15
2.5.2 Fermentação etanólica.....	16
2.6 Estratégias de produção de bioetanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas.....	18
2.6.1 Hidrólise e fermentação em separado (SHF).....	18
2.6.2 Sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF).....	19
2.6.3 Sacarificação e Co-fermentação Simultânea.....	21
2.6.4 Bioprocesso consolidado.....	21
2.7 Microrganismos termotolerantes.....	21
2.7.1 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	22
2.8 Biobutanol.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Leveduras para reações SSF.....	24
3.1.1 Ativação da <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1426.....	24
3.1.2 Adaptação das leveduras à temperatura mais elevada.....	25
3.1.3 Avaliação do crescimento das leveduras em diferentes temperaturas.....	25
3.2 Matérias-primas lignocelulósicas.....	26
3.3 Extrato enzimático.....	27
3.4 Procedimento SSF.....	28

3.4.1 Métodos analíticos	30
3.4.2 Parâmetros SSF.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Seleção de uma estirpe termotolerante adequada ao processo SSF.....	32
4.2 Avaliação do crescimento das estirpes a diferentes temperaturas.....	34
4.3 Ensaio SSF com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.3.1 Ensaio SSF em regime descontínuo	37
4.3.2 Ensaio SSF em regime semi-descontínuo.....	44
4.3.3 Avaliação da agitação e da taxa de oxigenação.....	52
4.4 Ensaio SSF com <i>K. marxianus</i> NCYC 1426	54
4.4.1 Regime descontínuo (38°C)	54
4.4.2 Regime semi-descontínuo (38°C).....	58
4.4.3 Regime descontínuo (42°C)	60
4.4.4 Regime semi-descontínuo (42°C).....	61
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO	67
6. REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	77
Anexo 1 - Folhetos das especificações	78
Anexo 2 - Determinação quantitativa dos açúcares redutores e preparo da solução tampão citrato de sódio.	87
Anexo 3 - Tratamento de lamas primárias.....	90
Anexo 4 - Determinação da atividade enzimática do extrato enzimático	91
Anexo 5 - Tempo de retenção e quantificação dos compostos por HPLC	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação fisiológica das leveduras com base na ocorrência de fermentação alcoólica do açúcar.	17
Tabela 2 - Comparação entre várias espécies de <i>K. marxianus</i> e a <i>S. cerevisiae</i>	22
Tabela 3 - Composição das matérias-primas lignocelulósicas.....	27
Tabela 4 - Quantidades de HC e MPL e volume de solução tampão.....	28
Tabela 5 - Massa total de HC e MPL adicionada nos ensaios em regime semi-descontínuo...29	
Tabela 6 - Produção de bioetanol segundo o processo SSF para diferentes matérias-primas, microrganismos e temperaturas.....	33
Tabela 7 - Diferentes estirpes da <i>K. marxianus</i> , temperatura máxima de tolerância ($T_{máxima}$) e aplicações.....	34
Tabela 8 - Taxa específica de crescimento (μ) e densidades óticas ($D.O_{.540\text{ nm}}$) correspondentes a 24 h e 30 h de crescimento nas temperaturas (T) de 30, 38 e 42°C.....	36
Tabela 9 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em descontínuo de 25 g/L de HC da pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada.....	39
Tabela 10 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em descontínuo de 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária.....	43
Tabela 11 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em semi-descontínuo de 25 g/L de HC da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada).....	46
Tabela 12 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em semi-descontínuo de 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária.....	49
Tabela 13 - Comparação entre os resultados dos ensaios SSF obtidos com a <i>S. cerevisiae</i> neste trabalho e no trabalho realizado por Kang <i>et al.</i> (2010).....	51
Tabela 14 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em descontínuo com 25 ou 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária (não tratada ou pré-tratada).	56
Tabela 15 - Concentrações máximas de ácido acético (regime semi-descontínuo a 38°C).	59
Tabela 16 - Concentrações máximas de ácido acético (regime semi-descontínuo a 38°C).	62
Tabela 17 - Quadro resumo dos principais resultados dos ensaios SSF com <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 realizados neste trabalho.....	62
Tabela 18 - Concentração máxima de etanol dos ensaios SSF encontrados na literatura.	64
Tabela 19 - Tempo de retenção dos compostos analisados por HPLC.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição das reservas comprovadas de petróleo bruto em 1992, 2002 e 2012.5	5
Figura 2 - Dependência energética na UE desde 1990 até 2008.5	5
Figura 3 - Quota de energia de fontes renováveis para Portugal.6	6
Figura 4 - Esquema de uma biorrefinaria.8	8
Figura 5 - Fontes de biomassa.9	9
Figura 6 - Conversão de matérias-primas agrícolas para biocombustíveis líquidos.10	10
Figura 7 - Esquema representativo da ETAR de uma fábrica de pasta papelreira.14	14
Figura 8 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulases) sobre celulose com geração de glucose.16	16
Figura 9 - Vias metabólicas de açúcares nas células de leveduras.17	17
Figura 10 - Fluxograma do processo SHF.18	18
Figura 11 - Fluxograma do processo SSF.20	20
Figura 12 - Representação da <i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 1426 liofilizada.25	25
Figura 13 - Matérias-primas lignocelulósicas.26	26
Figura 14 - Esquema do procedimento SSF.28	28
Figura 15 - Curvas de crescimento da (a) <i>S. cerevisiae</i> (comercial) e da (b) <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 em meio líquido YM a 30, 38 e 42°C.35	35
Figura 16 - Conjunto de ensaios efetuados com a <i>S. cerevisiae</i>37	37
Figura 17 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol no processo de SSF com 25 g/L de HC em regime descontínuo utilizando pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada com a <i>S. cerevisiae</i>38	38
Figura 18 - Ensaios SSF da pasta crua e lama primária (não tratada) após 6 h de reação.40	40
Figura 19 - Evolução do pH no processo de SSF de 25 g/L de HC em regime descontínuo utilizando pasta crua, lama primária (com e sem pré-tratamento) com a <i>S. cerevisiae</i>40	40
Figura 20 - Evolução da concentração dos açúcares (a) e etanol (b) no processo de SSF de 50 g/L de HC em regime descontínuo utilizando pasta crua e lama primária com a <i>S. cerevisiae</i>42	42
Figura 21 - Ensaios SSF da pasta crua e lama primária (25 e 50 g/L de HC) no início da reação (t=0).43	43

Figura 22 - Evolução da concentração dos açúcares e etanol com cargas de 25 g/L de HC da pasta crua (a), lama primária (b) e lama primária pré-tratada (c) em regime semi-descontínuo com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
Figura 23 - Evolução do pH no processo SSF com 25 g/L de hidratos de carbono da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) em regime semi-descontínuo com <i>S. cerevisiae</i> ...	47
Figura 24 - Cromatograma da reação SSF da pasta crua em 78 h.	47
Figura 25 - Evolução da concentração dos açúcares (a) e etanol (b) no processo de SSF com cargas de 50 g/L de HC, em regime semi-descontínuo utilizando pasta crua e lama primária com a <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 26 - Cromatograma do ensaio de pasta crua em regime semi-descontínuo (50 g/L de HC) com <i>S. cerevisiae</i> em 144 h de reação.	50
Figura 27 - Evolução da concentração dos açúcares e etanol dos ensaios SSF realizados em balões de 500 mL utilizando lama primária (50 g/L de HC) com a <i>S. cerevisiae</i> em (a) regime descontínuo e (b) regime semi-descontínuo.	53
Figura 28 - Conjunto de ensaios efetuados com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426.....	54
Figura 29 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada (25 g/L de HC) em regime descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 38°C.	55
Figura 30 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada (50 g/L de HC) em regime descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 38°C.	55
Figura 31 - Evolução do pH nos ensaios SSF da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) em regime descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 38°C.....	57
Figura 32 - Cromatogramas do ensaio da lama primária (50 g/L de HC) em regime descontínuo com <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 em 30 h (a) e 96 h (b).	57
Figura 33 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com adições de 25 g/L de HC da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) em regime semi-descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 38°C.....	58
Figura 34 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com adições de 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária em regime semi-descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 38°C.....	58
Figura 35 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com 25 ou 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária em regime descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 42°C.....	60

Figura 36 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com 25 ou 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária em regime semi-descontínuo com a <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 42°C.....	61
Figura 37 - Comparação entre as concentrações máximas de etanol obtidas pelas estirpes <i>S. cerevisiae</i> (comercial) a 38°C e <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 38°C. PC: pasta crua; LP: lama primária; LPPT: lama primária pré-tratada.....	65
Figura 38 - Comparação entre as concentrações máximas de etanol obtidas pelas estirpes <i>S. cerevisiae</i> (comercial) a 38°C e <i>K. marxianus</i> NCYC 1426 a 42°C. PC: pasta crua; LP: lama primária.....	65
Figura 39 - Relação entre concentração de glucose e absorvância (curva de calibração).....	88
Figura 40 - Relação entre concentração de glucose e absorvância (curva de calibração - DNS modificado).....	89
Figura 40- Curva de calibração da glucose (HPLC).	93
Figura 41- Curva de calibração da Xilose (HPLC).	94
Figura 42 - Curva de calibração do Ácido Acético (HPLC).....	94
Figura 43 - Curva de calibração do Etanol (HPLC).....	95

SIMBOLOGIAS E ABREVIATURAS

- μ - Taxa específica de crescimento (h^{-1});
- ABE - Acetona Butanol Etanol;
- CME - Concentração máxima de etanol;
- D.O. - Densidade ótica;
- DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico;
- DQO - Demanda Química de Oxigênio;
- ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais;
- Eurostat - Gabinete de Estatísticas da União Europeia;
- FER - Fontes de Energia Renováveis;
- FPU - Unidade de papel de filtro (*Filter Paper Activity*);
- GEE - Gases com Efeito de Estufa;
- HC - Hidratos de carbono;
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*);
- MPL - Matéria-prima lignocelulósica;
- NREL - Laboratório Nacional de Energia Renovável (*National Renewable Energy Laboratory*);
- Prod. - Produtividade de etanol ($\text{g}/(\text{L h})$);
- R_{EtOH} - Rendimento em Etanol (%);
- rpm - Rotação por minuto;
- SHF - Sacarificação e fermentação em separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation*);
- SSF - Sacarificação e fermentação em simultâneo (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*);
- UE - União Europeia;
- YM - Meio líquido universal para leveduras (*Yeast Medium*).

1. INTRODUÇÃO

Durante o século passado a produção de dióxido de carbono (CO₂) cresceu de forma exponencial devido à grande expansão no setor dos transportes, resultando em notáveis mudanças no ecossistema da Terra. Para prevenir mudanças irreversíveis e reduzir os impactos dos gases com efeito estufa no clima da Terra é necessária a colaboração internacional (Kádár *et al.*, 2004). O primeiro passo bastante efetivo neste processo seria utilizar combustíveis alternativos derivados de biomassa, uma vez que grande parte do CO₂ é gerado no setor dos transportes. Um possível candidato para substituir/alternar o combustível fóssil é o bioetanol.

A redução do custo de produção do bioetanol passa, entre outros fatores, pela utilização de matérias-primas baratas, como os resíduos industriais. Por exemplo, os resíduos da indústria de pasta e papel têm sido considerados como uma biomassa promissora na produção de bioetanol (Lynd *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2008). Os resíduos sólidos da indústria de pasta e papel são obtidos no clarificador primário da ETAR (Estação de Tratamento de Águas Residuais) da própria fábrica e denominados de "lama primária". Esta é recolhida e geralmente depositada em aterros ou aplicada em compostagem. Cerca de 400 ton/ano de lama primária são produzidas pelas fábricas portuguesas de pasta e papel (Celpa, 2011). As indústrias de pasta e papel podem gerar lamas primárias com variadas composições. No caso das fábricas portuguesas, estas lamas são geralmente constituídas por 45-60% (m/m) de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose), 5-20% (m/m) de lignina e 35-50% (m/m) de matéria inorgânica - cinzas (principalmente CaCO₃), em base de matéria seca. O seu elevado teor de hidratos de carbono torna as lamas primárias uma matéria-prima com elevado potencial para a produção de bioetanol (Kang, 2010; Mendes *et al.*, 2012), embora o seu elevado pH causado pela presença de CaCO₃ necessite, em geral, de um pré-tratamento.

As lamas primárias oferecem dois benefícios económicos significativos. Primeiro, o custo da lama é essencialmente zero e pode ser considerado até negativo se levar em conta o custo associado a gestão deste resíduo. Segundo, não há necessidade de um tratamento prévio para retirar a lignina devido ao seu baixo teor (Kang, 2010). Para obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, a fermentação é o processo mais aplicado. Porém, antes disso, é necessário submetê-la à hidrólise enzimática. Existem muitas tecnologias disponíveis para a conversão de matérias-primas lignocelulósicas em etanol. As duas principais são hidrólise e fermentação em separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation* – SHF) e

Introdução

sacarificação e fermentação em simultâneo (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* – SSF) (Ogeda & Petri, 2010; Zhang & Lynd, 2004).

Na estratégia SHF, primeiramente realiza-se a etapa de hidrólise que consiste em transformar os hidratos de carbono (celulose e hemicelulose) em monossacarídeos (maioritariamente glucose e alguma xilose) através da atuação do extrato enzimático, geralmente constituído por uma mistura de celulases. Posteriormente, os produtos da reação (açúcares fermentáveis) são encaminhados para o biorreator, onde ocorrerá a fermentação dos açúcares a etanol utilizando um microrganismo fermentativo. No processo SSF, a hidrólise enzimática dos hidratos de carbono e a fermentação dos monossacarídeos ocorre em simultâneo, ou seja, numa única etapa no mesmo reator. Este processo pode tornar-se mais vantajoso do que o SHF (Mosier *et al.*, 2005).

O processo SSF tem como principais vantagens a redução da inibição pelo produto, a diminuição dos riscos de contaminação devido ao consumo imediato dos açúcares pelo microrganismo e uma maior economia no processo global, pois ocorre num único reator e apresenta menor tempo total de operação. Apesar da vantagem económica do SSF sobre o SHF, o problema crítico com o SSF é a diferença existente entre as temperaturas ótimas de atuação do extrato enzimático (45 - 50°C) e do microrganismo fermentativo (30 - 37°C). Os microrganismos mais bem conhecidos como produtores de etanol são as leveduras do género *Saccharomyces*, mas a maioria das espécies dentro deste género requer temperaturas de 35°C (Alfani *et al.*, 2000; Stenberg *et al.*, 2000; Sánchez & Cardona, 2008; Tomás-Pejó *et al.*, 2009).

O processo SSF é desfavorável quando ocorre a temperaturas inferiores a 38°C devido às baixas velocidades da hidrólise, resultando no incremento do tempo do processo, ou à necessidade de aplicar uma maior carga enzimática, incrementando o custo do processo. Uma possível solução para este problema é utilizar microrganismos termotolerantes que cresçam e fermentem a uma temperatura mais elevada. Entre as espécies de leveduras etanólicas, a que se destaca pela sua termotolerância é a espécie *Kluyveromyces marxianus* (Shaw *et al.*, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo principal valorizar os resíduos lignocelulósicos, nomeadamente lamas primárias provenientes da indústria de pasta e papel, como matéria-prima para a produção de bioetanol por SSF. Para a concretização deste objetivo traçaram-se os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Seleção de uma estirpemicrobiana termotolerante para aplicação no processo SSF;
- ✓ Avaliar o crescimento celular da *Kluyveromyces marxianus* e da *Saccharomyces cerevisiae* a 30, 38 e 42°C;

Introdução

- ✓ Avaliar e comparar o potencial da lama primária e da pasta crua (usada como referência), provenientes de uma fábrica de pasta (Portugal), como matérias-primas para a produção de bioetanol por SSF;
- ✓ Comparar o desempenho no processo SSF da lama primária não tratada e da lama primária pré-tratada;
- ✓ Avaliar a influência da concentração de hidratos de carbono sobre os rendimentos de etanol;
- ✓ Avaliar dois tipos de regime de alimentação no processo SSF: descontínuo e semi-descontínuo;
- ✓ Avaliar o efeito qualitativo da taxa de oxigenação sobre o processo SSF na obtenção de bioetanol;
- ✓ Comparar o desempenho da *K. marxianus* para obtenção de bioetanol no processo SSF a 38 e 42°C;
- ✓ Comparar a performance da estirpe não termotolerante, *S. cerevisiae*, com a termotolerante *K. marxianus*.

Para tal foi efetuado um trabalho laboratorial que decorreu no Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta (CIEPQPF) do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – Portugal.

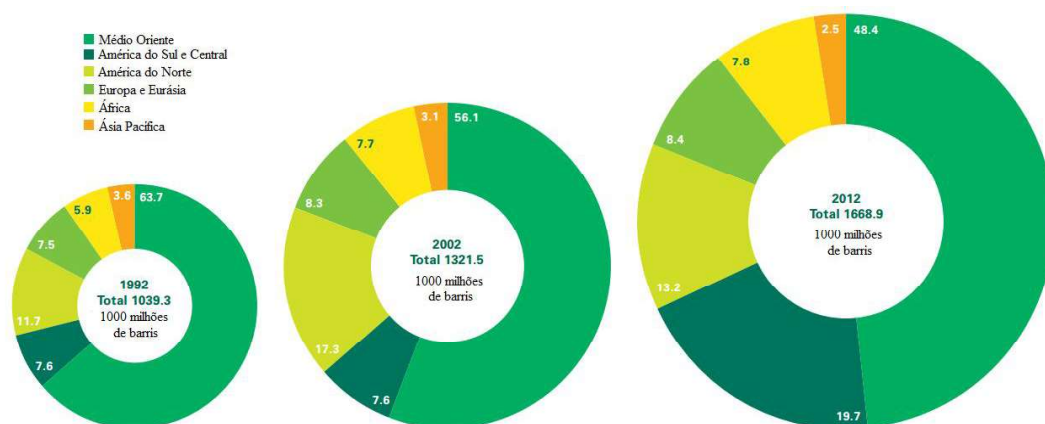
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contexto energético

Um dos maiores desafios para a sociedade do século 21 é atender a crescente demanda de energia para o transporte, os processos industriais e térmicos e também fornecer matéria-prima para a indústria de forma sustentável. Durante o século 20, o desenvolvimento industrial e social foi essencialmente impulsionado pelo crescimento do setor petroquímico e ainda hoje o petróleo apresenta-se como principal fonte de energia do desenvolvimento industrial (Hahn hagerdal *et al.*, 2006; Van maris *et al.*, 2006).

A exploração e utilização das reservas de recursos fósseis asseguraram por muito anos a disponibilidade de matéria-prima para a indústria e combustíveis para transporte e geração de energia. No entanto, a formação destes recursos é um processo cíclico que leva muito tempo para se completar, enquanto a exploração destes recursos é feita pela humanidade de forma exponencial. A dependência dos recursos fósseis e a preocupação com a questão ecológica são fatores que instigam a procura e o desenvolvimento de alternativas energéticas. Um debate muito forte na substituição gradual do petróleo pelo uso de alternativas renováveis domina todo a agenda política e económica do mundo (Demain, 2009; Hahn hagerdal *et al.*, 2006).

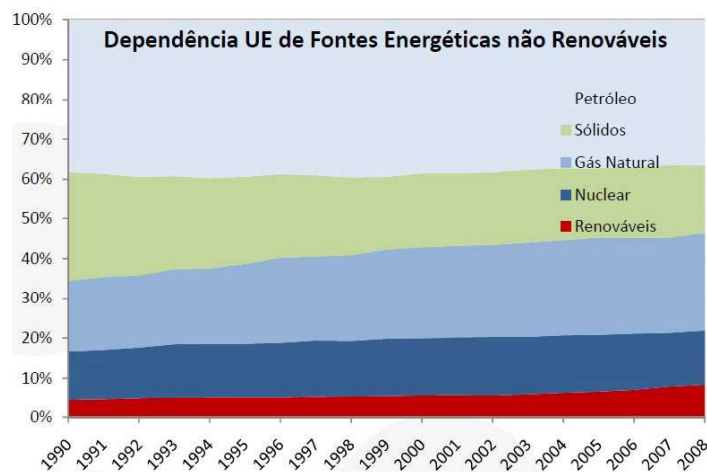
A história relata que durante muito tempo a humanidade se baseou em fontes de energia renováveis simples, tais como: lenha, moinhos de vento, rodas de água e animais. No século 19, quando Rudolf Diesel concebeu a sua invenção (motor de combustão interna a diesel) visava a utilização de combustíveis derivados de fontes vegetais. No entanto, no século 20, as fontes renováveis utilizadas até o momento foram substituídas pelo petróleo. A produção e utilização de combustíveis oriundos de fontes renováveis ressurgiram na década de 1970, na sequência dos dois primeiros choques petrolíferos e devido à tomada de consciência da necessidade de diversificar as fontes energéticas (Galbe & Zacchi, 2002). Na **Figura 1** estão representadas as distribuições das reservas de petróleo no mundo em 1992, 2002 e 2012.



Fonte: BP Statistical Review of World Energy(2013).

Figura 1 - Distribuição das reservas comprovadas de petróleo bruto em 1992, 2002 e 2012.

Como se observa na **Figura 1**, as maiores reservas petrolíferas (cerca de 50%) encontram-se no Médio Oriente enquanto a Europa e Eurásia possuem cerca de 9%. Em 2008, o Gabinete de Estatísticas da União Europeia (Eurostat) indicou que apenas 8% do consumo de energia da União Europeia (UE) provinha de fontes renováveis. Percebe-se na **Figura 2** uma forte dependência da União Europeia por fontes energéticas não renováveis.



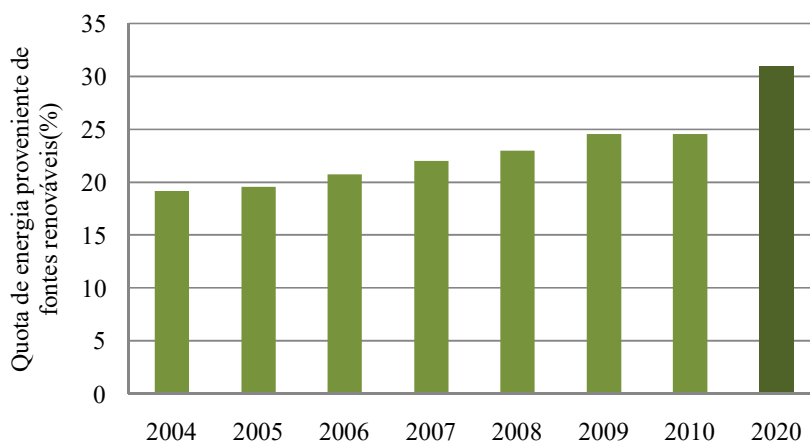
Fonte: Matos *et al.* (2011).

Figura 2 - Dependência energética na UE desde 1990 até 2008.

A fim de amenizar esta situação, os Estados-Membros da UE estão vinculados a compromissos internacionais e directivas europeias, como o Protocolo de Quioto, para reduzir emissões de GEE (Gases com Efeito de Estufa) e a directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas

2001/77/CE e 2003/30/CE. A directiva 2009/28/CE definiu metas individuais para todos os Estados-Membros, com vista a alcançar o objetivo global da UE de uma quota de 20% do consumo total de energia de fontes renováveis até 2020.

De forma a cumprir estas metas e contornar a dependência energética é necessário alterar o perfil das fontes energéticas, nomeadamente no sector dos transportes, através do uso de combustíveis alternativos (biocombustíveis), sendo os mais comuns o biodiesel e o bioetanol. Na Europa, a produção de biocombustíveis tem crescido desde o início de 2000 como consequência do aumento dos preços do petróleo e da existência de legislações favoráveis adotadas. A **Figura 3** apresenta a quota de energia proveniente de fontes renováveis no consumo final bruto de energia em Portugal nos anos de 2004 a 2010 e a meta para 2020 conforme a directiva 2009/28/CE.



Fonte: Directiva CE/28/2009.

Figura 3 - Quota de energia de fontes renováveis para Portugal.

Segundo a Eurostat, a diferença entre a quota de Portugal em 2005 e a meta de 2020 é de 11,3%. Este aumento corresponderá em 2020 às seguintes quotas por setor: cerca de 30% de Fontes de Energia Renováveis (FER) em aquecimento e arrefecimento, cerca de 55% de FER em eletricidade e 10% de FER em transportes. A quota dos transportes deverá ser atingida através da incorporação de biocombustíveis, que cumpram os critérios de sustentabilidade, na gasolina e no gasóleo (Directiva CE/28/2009; Eurostat, 2013).

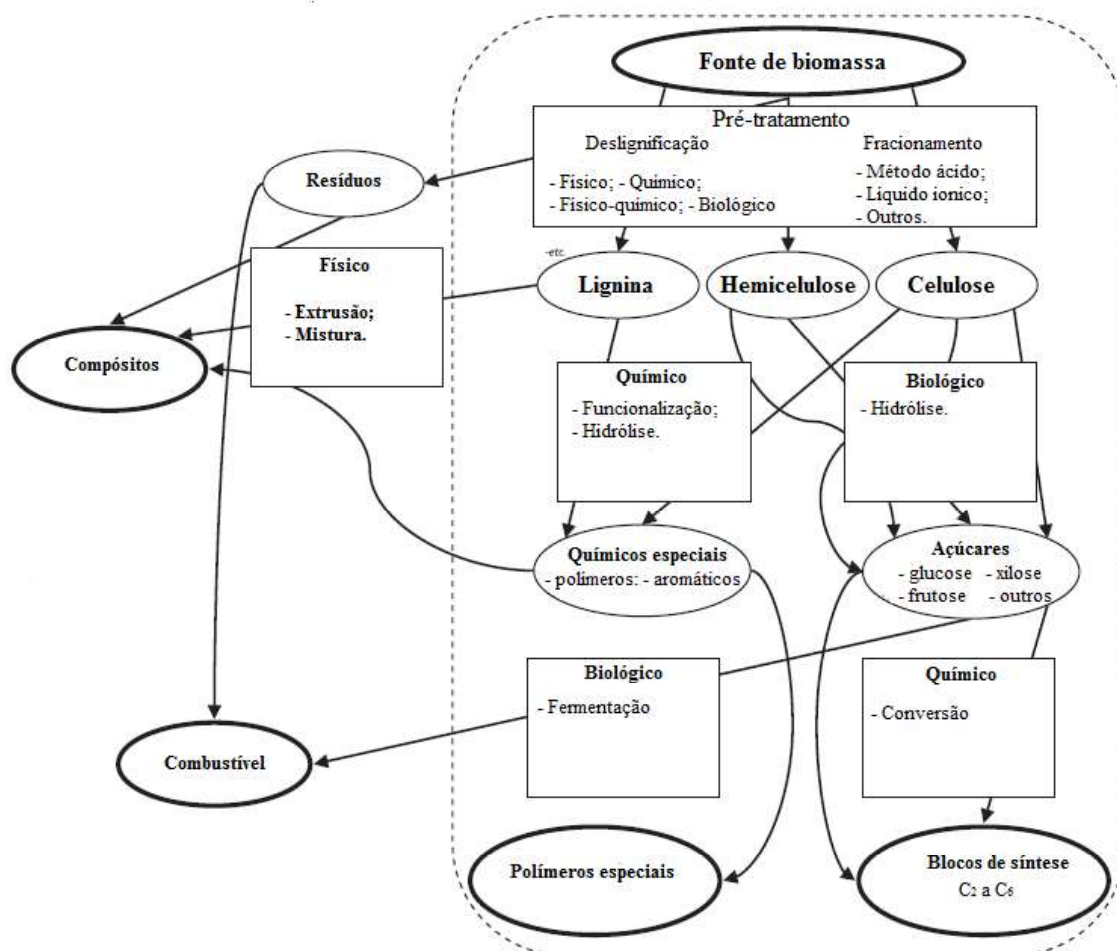
A produção e comercialização de biocombustíveis em Portugal têm sido práticas consolidadas nos últimos anos e centra-se na produção de biodiesel. No entanto, devido à existência de uma importante indústria de celulose, há também interesse em estudar diagramas processuais alternativos que levem à produção de novos subprodutos no fabrico da celulose, nomeadamente o bioetanol, desenvolvendo o conceito de biorrefinaria.

2.2 Biorrefinaria

O termo biorrefinaria é derivado tanto da matéria-prima (biomassa renovável), como também dos processos de bioconversão que são frequentemente aplicados no tratamento e processamento das matérias-primas. Segundo o *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), uma biorrefinaria é “uma instalação que integra processos de conversão e equipamentos para a produção de combustíveis, energia e produtos químicos a partir de biomassa” (Fernando *et al.*, 2006; Lynd *et al.*, 2002; NREL, 2013).

Uma biorrefinaria pode aplicar tecnologias de diferentes áreas, incluindo a química de polímeros, bioengenharia e agricultura. Atualmente, a maioria dos produtos petroquímicos são produzidos em refinarias a partir de petróleo bruto, ao passo que, no futuro, espera-se que muitos destes produtos sejam produzidos em biorrefinarias a partir de biomassa. Isto permite o desenvolvimento de sistemas que idealmente tentam substituir o termo "resíduos " por “subprodutos” a nível industrial (Kamm & Kamm, 2004; Ohara *et al.*, 2003).

A **Figura 4** exemplifica uma biorrefinaria em que as principais matérias-primas são os resíduos da indústria de celulose. Após a seleção das matérias-primas, estas são submetidas a um pré-tratamento, onde os componentes de biomassa são sujeitos a uma combinação de tratamentos biológicos e/ou químicos. Os produtos deste pré-tratamento (açúcares redutores) podem ser ainda convertidos para obtenção de outros bioprodutos (Fitzpatrick *et al.*, 2010).



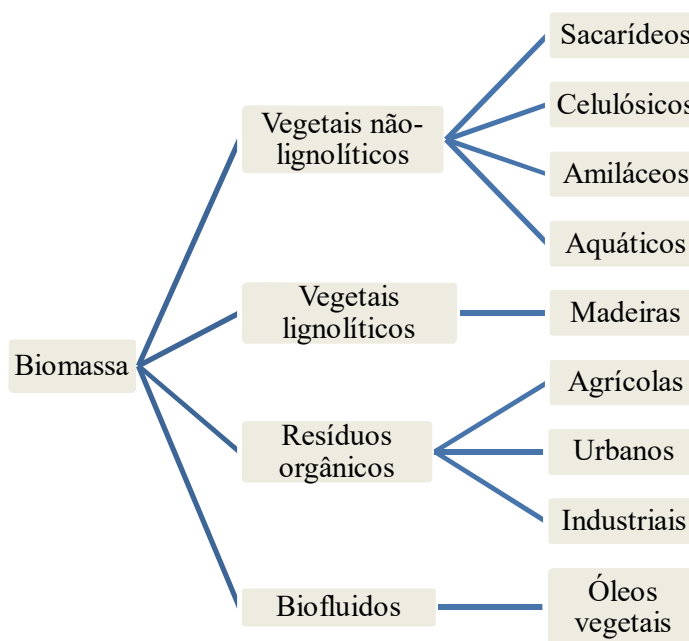
Fonte: Fitzpatrick *et al.* (2010).

Figura 4 - Esquema de uma biorrefinaria.

Este trabalho visa estender o conceito de biorrefinaria aplicado à indústria papelreira, transformando os resíduos gerados em matérias-primas que alimentem novos processos para a obtenção de produtos de valor acrescentado. Sendo assim, aplicando-se um pré-tratamento adequado a estes resíduos e uma hidrólise, obtêm-se monómeros de glucose a partir da desfragmentação da celulose, que por sua vez podem ser biologicamente convertidos em bioetanol, ácidos orgânicos, glicerol, sorbitol, manitol, frutose, enzimas, polímeros, entre outras substâncias. O bioetanol, produto de interesse neste trabalho, apresenta inúmeras aplicações, como combustível veicular ou aditivo, na produção de moléculas como butadieno, ésteres e etileno e na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (FAO, 2008).

2.3 Biomassa

A biomassa é definida como toda a matéria orgânica (vegetal, terrestre ou aquática) formada pelo processo de fotossíntese e que pode ser obtida a partir de vegetais não-lignolíticos, de vegetais lignolíticos (madeira e seus resíduos), resíduos orgânicos (agrícolas, urbanos e industriais) e biofluidos, como óleos vegetais (mamona, soja, entre outros) (Directiva 2003/30/CE; McKendry, 2002). A **Figura 5** apresenta um esquema das fontes de biomassa.

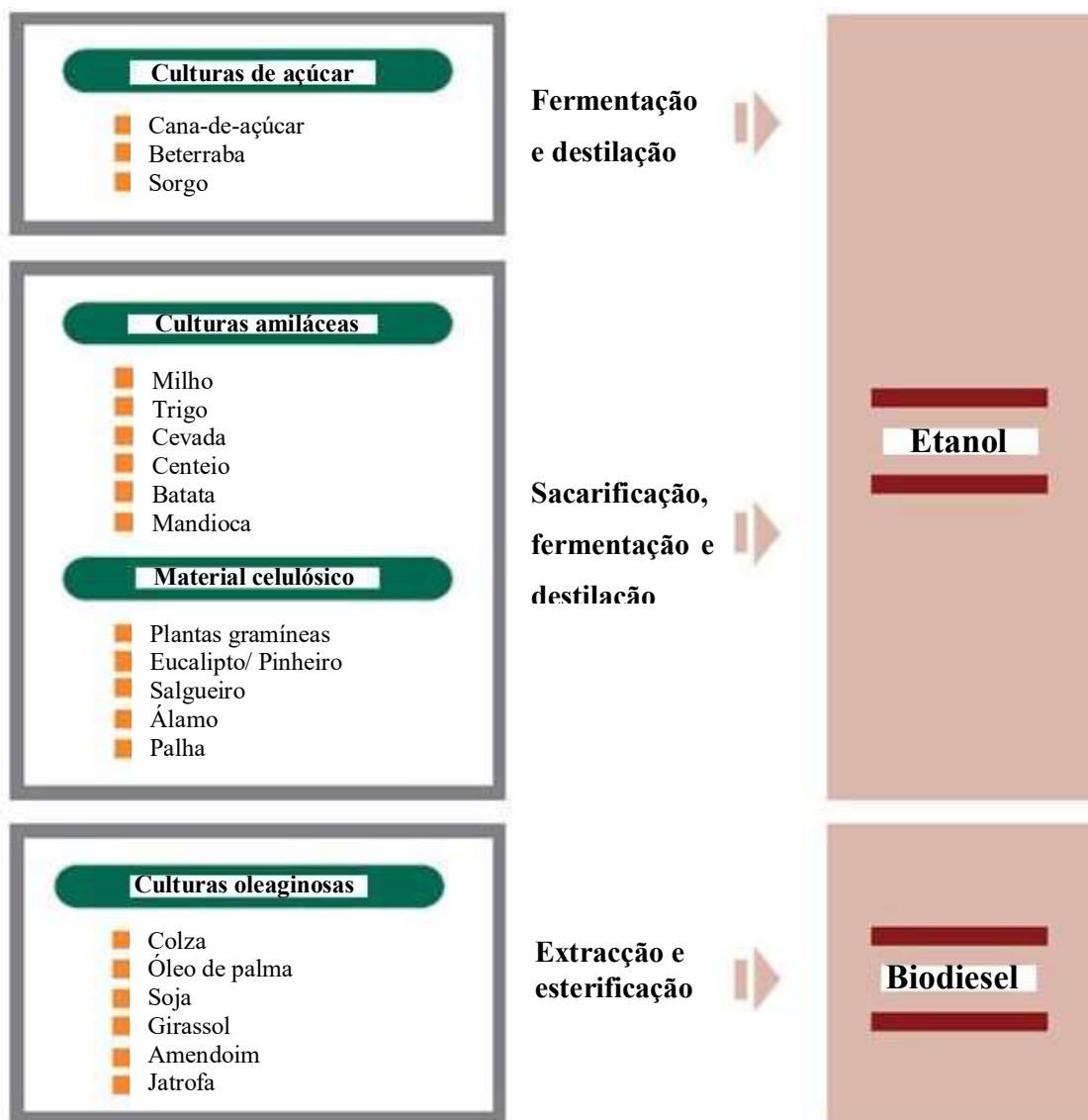


Fonte: FAO(2008).

Figura 5 - Fontes de biomassa.

Existem muitas fontes de biomassa para fins energéticos que estão espalhadas por grandes e diversas áreas geográficas. Ainda hoje, a maior parte da energia derivada da biomassa provém de subprodutos ou co-produtos de alimentos, forragens e fibras. Por exemplo, os principais subprodutos do setor da madeira são usados para a produção de lenha e carvão, e o licor negro, proveniente das fábricas de pasta, é uma importante fonte de combustível para a geração de bioeletricidade em países como Brasil, Canadá, Finlândia, Suécia e Estados Unidos da América. Em termos de bioenergia, o grande crescimento nos últimos anos tem sido na produção de biocombustíveis líquidos que utilizam culturas agrícolas como matéria-prima (**Figura 6**). A maior parte desta bioenergia tem tomado a forma

de etanol, com base nas culturas, quer de açúcar ou culturas de amido, ou biodiesel com base em culturas de oleaginosas (FAO, 2008).



Fonte: FAO (2008).

Figura 6 - Conversão de matérias-primas agrícolas para biocombustíveis líquidos.

De acordo com a **Figura 6**, pode ser usada uma grande variedade de culturas diferentes como matéria-prima para a produção de bioetanol e biodiesel. No entanto, a produção de etanol mais global é derivada de cana-de-açúcar (Brasil) ou milho (Estados Unidos da América). Outras culturas importantes incluem a mandioca, arroz, beterraba e trigo. Para o biodiesel, as matérias-primas mais populares são a colza na União Europeia, a soja nos Estados Unidos da América, a palma de coco ou mamona no Brasil e óleos em países tropicais e subtropicais, com um crescente interesse em pinhão-manso.

Como não há milho nem cana-de-açúcar disponível suficiente para fazer uma diferença significativa na dependência do petróleo para a energia, é essencial para o setor de biocombustíveis afastar-se de culturas alimentares e incidir-se sobre alternativas de matérias-primas renováveis, como a biomassa não alimentar lignocelulósica. Além disso, no balanço energético, o etanol lignocelulósico (bioetanol de 2ª geração) é cinco vezes melhor do que o etanol proveniente do milho (bioetanol de 1ª geração) (Demain, 2009).

2.3.1 Biomassa lignocelulósica

Biomassa lignocelulósica, conhecida também por biomassa celulósica, é composta por celulose, hemiceluloses e lignina. É abundante, renovável e relativamente barata. Celulose e hemiceluloses (hidratos de carbono constituintes da madeira) são matérias-primas renováveis e podem ser aplicadas na produção de bioetanol (Demain, 2009).

A celulose, principal constituinte da madeira (40-50% da massa total), é uma molécula linear, cuja fórmula geral é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde n é o grau de polimerização. É composta por unidades repetidas de celobiose (dissacarídeos) unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1,4). A associação de moléculas de celulose formam fibrilas, que por sua vez se associam para construir a parede da fibra, e possui um grau de polimerização elevado. Quando hidrolisada obtém-se glucose como monómero. Outro constituinte da madeira, as hemiceluloses (cerca de 20-25% da massa total) são macromoléculas caracterizadas por uma cadeia principal, longa e linear com cadeias laterais curtas e ramificadas. Por hidrólise obtém-se uma variedade de monómeros como glucose, manose, galactose, xilose e arabinose. A presença e o teor destes açúcares na cadeia hemicelulósica variam muito, consoante o tipo de árvore. A indústria papeleira portuguesa usa maioritariamente a madeira de *Eucalyptus globulus* como matéria-prima, cujas hemiceluloses são principalmente xilanas, cujo monómero principal é a xilose (Duff & Murray, 1996).

Existem vários relatórios que indicam que o etanol a partir de biomassa lignocelulósica reduz as emissões de gases de efeito estufa em cerca de 80% em relação à gasolina, enquanto reduz em 20-30% em relação ao etanol a partir do milho. Existem várias fontes de resíduos de lignocelulósicos, provenientes dos processos industriais e agrícolas, que incluem, por exemplo, resíduos de casca de citrinos, serragem, resíduos industriais, resíduos sólidos urbanos e resíduos das indústrias de pasta de papel, denominadas por lamas de papel. Estes podem ser utilizados como matérias-primas para a obtenção de diversos produtos com valor acrescentado (Demain, 2009).

2.4 Produção de pasta para papel

O papel é resultante do entrelaçamento de fibras celulósicas ligadas entre si. Estas fibras são encontradas na madeira, onde estão unidas por macromoléculas de lignina. Para produzir o papel é necessário retirar a lignina, pois esta limita a capacidade de ligação entre as fibras. O produto fibroso resultante desta separação é denominado de pasta celulósica (Carvalho, 1999; Sjöström, 1993). As etapas de produção da pasta celulósica constitui-se basicamente em quatro etapas apresentadas a seguir:

✓ Seleção e preparação da matéria-prima

A espécie de madeira a ser selecionada como matéria-prima dependerá do tipo de papel que se pretende produzir. A espécie mais utilizada para a produção de papel em Portugal é o *Eucalyptus globulus*, pois, é uma espécie de rápido crescimento com rotações curtas, por volta de 12 anos, com qualidade da madeira adequada para diferentes usos. O preparo da matéria-prima consiste em receber os toros de madeira na fábrica, retirar as cascas pois são ricas em lignina e extratáveis e possuem muito baixo teor de fibras. As cascas são encaminhadas para o forno de recuperação de energia e os toros descascados são encaminhados ao destrocador a fim de transformá-los em aparas com dimensões adequadas para a obtenção de pasta. As aparas são selecionadas através da operação de crivagem, as sobredimensionadas são reintroduzidas ao destrocador e as com menores dimensões são encaminhadas ao forno de queima para a geração de energia (Carvalho, 1999; Sjöström, 1993).

✓ Obtenção da pasta crua

O processo mais utilizado pela indústria para o fabrico de pasta crua é o processo Kraft, também conhecido por processo ao Sulfato. Este consiste em adicionar a um digestor as aparas e o licor de reagentes (licor branco), constituído por uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na₂S). O objetivo desta etapa é retirar a máxima quantidade de lignina possível. Porém, além da degradação da lignina, ocorre também solubilização de parte dos compostos celulósicos (cerca de 10% da celulose e 50% das hemiceluloses), proporcionando rendimentos cerca de 50%. O grau de deslignificação

dependerá das condições aplicadas neste processo, como temperatura, tempo, quantidade de reagentes e entre outras. Dentro do digestor, sob altas temperaturas e pressões, ocorrerá o cozimento das aparas, resultando na degradação da lignina e os produtos desta reação são dissolvidos no licor. Ao fim do tempo de cozimento, as aparas cozidas seguem para uma zona de descompressão a qual provoca a individualização das fibras, dando origem à denominada pasta crua, enquanto o licor (licor negro) é encaminhado à caldeira de recuperação (Sjöström, 1993).

✓ Branqueamento

A pasta crua obtida, após lavagem e crivagem, apresenta uma coloração castanha devido à presença de grupos cromóforos, na sua maioria provenientes da lignina residual. Quando o objetivo é produzir papeis brancos é necessário submetê-la a uma etapa de branqueamento. Esta etapa consiste em utilizar reagentes químicos mais seletivos do que os do cozimento para oxidar os grupos cromóforos remanescentes ou degradar a lignina residual. A fim de atingir um maior nível de brancura realizam-se vários estágios de branqueamento alternados com estágios de extração/lavagem. Após este processo a pasta está pronta para ser enviada para as máquinas de papel, caso seja uma fábrica integrada, ou para as unidades de secagem (Carvalho, 1999; Sjöström, 1993).

✓ Secagem

A operação de secagem consiste na evaporação da água residual da pasta branqueada até atingir o ponto de equilíbrio com a umidade relativa do ambiente (90% de fibras e 10% de água). Depois de seca, é cortada e embalada em fardos para serem transportadas para as fábricas de papel, sendo denominadas por “pasta de mercado” (Sjöström, 1993).

2.4.1 Resíduos gerados na produção da pasta papelreira

Dentro dos resíduos da indústria de pasta papelreira estão os resíduos celulósicos, resíduos florestais, lama de cal, lama biológica e cinzas. As águas residuais geradas nas diferentes etapas do processo, como a depuração e o branqueamento, são encaminhadas a Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) (**Figura 7**).

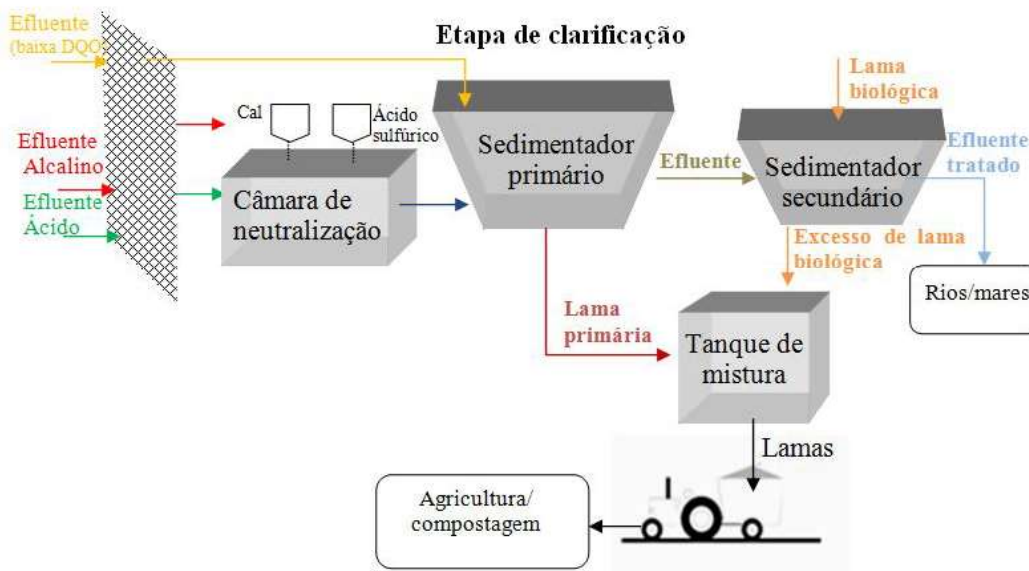


Figura 7 - Esquema representativo da ETAR de uma fábrica de pasta papelreira.

Antes de serem encaminhados ao sedimentador primário, os efluentes gerados nos processos da fábrica de pasta passam através de uma grelha para a retirada dos materiais grosseiros. Em seguida, os efluentes alcalinos e ácidos são misturados numa câmara de neutralização; caso necessário, ajusta-se o pH para neutro com ácido ou base. Na etapa de clarificação, o efluente líquido é separado dos sólidos. Estes sólidos são denominados de "lama primária", composta principalmente por fibras (celulose e hemicelulose), cinzas e lignina residual. As fábricas de pasta e papel de Portugal geram lamas primárias com uma composição de cerca de 45-60% (m/m) de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose), 5-20% (m/m) de lignina e 35-50% (m/m) de matéria inorgânica - cinzas (principalmente CaCO_3), em base seca. O efluente líquido do clarificador é encaminhado para o tratamento secundário, onde se realiza o tratamento biológico. No fim deste tratamento, o efluente líquido é adequado para o despejo em rios e os resíduos sólidos (lama secundária) são

misturados com a lama primária e encaminhados para a agricultura e compostagem (Celpa, 2011; Kang *et al.*, 2010; Kádár *et al.*, 2004).

A lama primária é uma biomassa lignocelulósica, composta maioritariamente por celulose e hemicelulose, que poderia ser aproveitada como matéria-prima na produção de inúmeros produtos de interesse industrial, conferindo assim, um maior valor agregado. Dentro desses produtos encontram-se polímeros, ácidos (acético, succínico, urónico, entre outros), monossacarídeos, fenol, xilitol, sorbitol, etanol e produtos químicos em geral. Assim, a lama primária deixaria de ser considerada um resíduo e passaria a ser matéria-prima, excluindo assim, um componente do cenário de resíduos gerados pelas indústrias de pasta papelreira (Pereira *et al.*, 2008).

2.5 Produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica

Para obtenção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, a fermentação é o processo mais aplicado. Porém, antes disso, é necessário submetê-la a um processo de hidrólise.

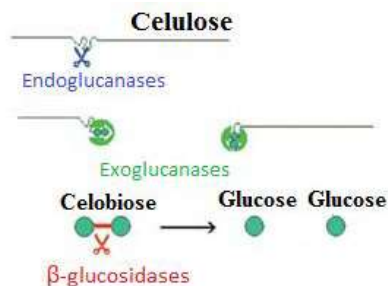
2.5.1 Hidrólise

Para obter monossacarídeos, como glucose e xilose, a partir dos hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses) contidos nas matérias-primas lignocelulósicas, é necessário que estes sejam submetidos a uma reação de hidrólise. Há dois tipos principais de hidrólise, ácida e enzimática.

A hidrólise ácida foi a primeira alternativa utilizada para a transformação de compostos celulósicos em açúcares. Porém, há alguns inconvenientes, como a produção de compostos derivados do furfural (inibidores da fermentação) e a degradação de açúcares devido ao tempo prolongado de reação. Desta forma, atualmente a hidrólise enzimática tem sido a mais usual. Esta é geralmente conduzida em condições relativamente mais brandas quando comparada com as condições de hidrólise ácida, a um pH 4,8 e temperaturas entre 45 e 50°C. Além disso, não provoca corrosão e permite maiores rendimentos de conversão dos polissacarídeos em monossacarídeos (Zhang & Lynd, 2004).

A hidrólise enzimática é catalisada por um complexo enzimático composto principalmente por três grandes grupos de celulasas: 1) endoglucanases, responsáveis pela quebra das ligações internas da cadeia celulósica; 2) exoglucanases, atuam na quebra da

cadeia celulósica nas extremidades libertando moléculas de celobiose; 3) β -glucosidases, promovem a hidrólise da celobiose para moléculas de glucose (**Figura 8**) (Ogeda & Petri, 2010).



Fonte: Ogeda & Petri (2010).

Figura 8 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulases) sobre celulose com geração de glucose.

As celulases podem ser produzidas tanto por fungos como bactérias. Fungos do género *Trichoderma* têm sido os mais utilizados devido aos seus elevados níveis de celulase secretada. A maioria dos complexos enzimáticos de celulases comerciais são obtidos a partir de espécies de *Trichoderma* e uma pequena parte a partir de *Aspergillus niger* (Esterbauer *et al.*, 1991; Nieves *et al.*, 1998; Zhang & Lynd, 2004).

No entanto, uma desvantagem da aplicação das celulases é que os seus produtos de hidrólises inibem a atuação das mesmas. Para melhorar os rendimentos e a velocidade de hidrólise é necessário levar em conta diversos fatores: a concentração e composição do substrato, a atividade enzimática da celulase e as condições da reação, como temperatura, pH e interação entre o extrato enzimático e os hidratos de carbono (Lynd *et al.*, 2002; Mosier *et al.*, 2005).

2.5.2 Fermentação etanólica

A fermentação de açúcar a etanol por leveduras tem aplicação em vários processos industriais e é o processo mais importante na obtenção de bioetanol, tanto de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar ou milho, como também de segunda geração, a partir de biomassa lignocelulósica (FAO, 2008). *Saccharomyces cerevisiae* e espécies relacionadas são particularmente bem conhecidas devido à sua importância na produção de bebidas fermentáveis (cerveja, vinho, cidra), mas existe uma ampla diversidade de género de leveduras que podem ser usadas, como por exemplo *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debarromyces* e *Yarrowia*. Estas leveduras são capazes de utilizar uma ampla variedade de açúcares. Em geral, crescem e fermentam eficientemente a valores de pH entre 3,5 e 6,0 e temperaturas de 28 a

35°C, com exceção da espécie *Kluyveromyces marxianus* que pode crescer em maiores temperaturas (Sánchez & Cardona, 2008).

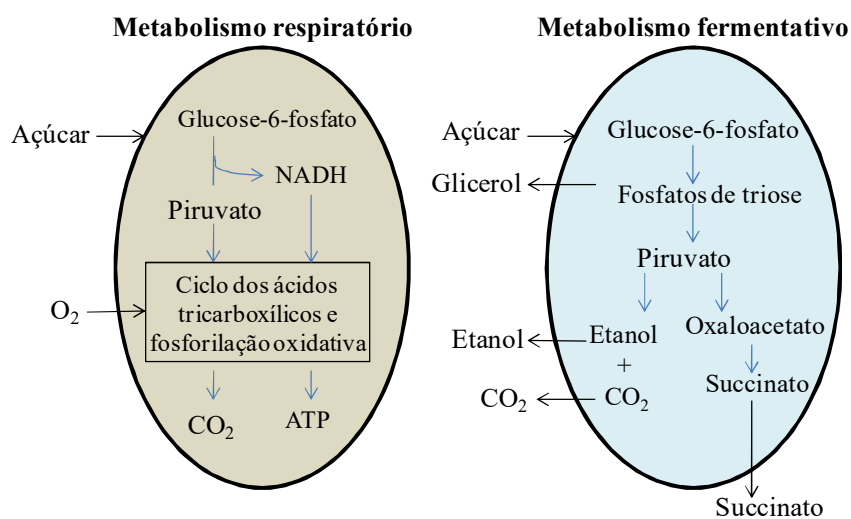
As leveduras podem ser divididas em três grupos de acordo com as suas capacidades fermentativas: obrigatórias, facultativas e não fermentativas (**Tabela 1**). As leveduras fermentativas facultativas possuem metabolismo misto, ou seja, respiratório e fermentativo. Estas, por sua vez, podem ser divididas em dois sub-grupos: leveduras sensíveis à glucose (Crabtree positivas), como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*; e leveduras não sensíveis à glucose (Crabtree negativas), como é o caso da levedura *Candida utilis* e da levedura *Kluyveromyces marxianus* (Boze & Galzy, 1992).

Tabela 1 - Classificação fisiológica das leveduras com base na ocorrência de fermentação alcoólica do açúcar.

Classificação	Exemplos
Não fermentativas	<i>Rhodotorula rubra</i>
Fermentativas facultativas	Crabtree positiva: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Crabtree negativas: <i>Kluyveromyces marxianus</i> e <i>Candida utilis</i>
Fermentativas obrigatórias	<i>Candida slooffii</i>

Fonte: Boze & Galzy, 1992.

O metabolismo das leveduras refere-se à assimilação e dissimilação bioquímica dos nutrientes pelas células, o que por sua vez engloba todos os passos das reações enzimáticas, assim como a sua regulação. Ambos os processos metabólicos, fermentativo e respiratório, são muito importantes em processos industriais. A fermentação é essencial para a produção de dióxido de carbono e etanol, enquanto a respiração favorece a produção de biomassa (Atkinson, 1983). A **Figura 9** resume as principais sequências de reações destas duas importantes vias metabólicas da glucose.



Fonte: Atkinson (1983).

Figura 9 - Vias metabólicas de açúcares nas células de leveduras.

Juntamente com o etanol e o CO₂, o metabolismo das leveduras pode levar também à formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (acético, láctico, succínico, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros componentes de menor significado quantitativo (Atkinson, 1983).

2.6 Estratégias de produção de bioetanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas

Em geral, existem quatro estratégias para a obtenção do etanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas: hidrólise e fermentação em separado, sacarificação e fermentação em silmutâneo, sacarificação e co-fermentação simultânea e bioprocessamento consolidado.

2.6.1 Hidrólise e fermentação em separado (SHF)

A hidrólise da celulose ocorre num estágio separado da fermentação e da produção de enzimas celulases. Geralmente é necessário realizar um pré-tratamento e dependendo do tipo de tratamento, ocorrerá a solubilização das hemiceluloses. As celulases podem ser produzidas num reator separado ou adquiridas no mercado (Pereira *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2009). O fluxograma representado na **Figura 10** descreve esta estratégia.

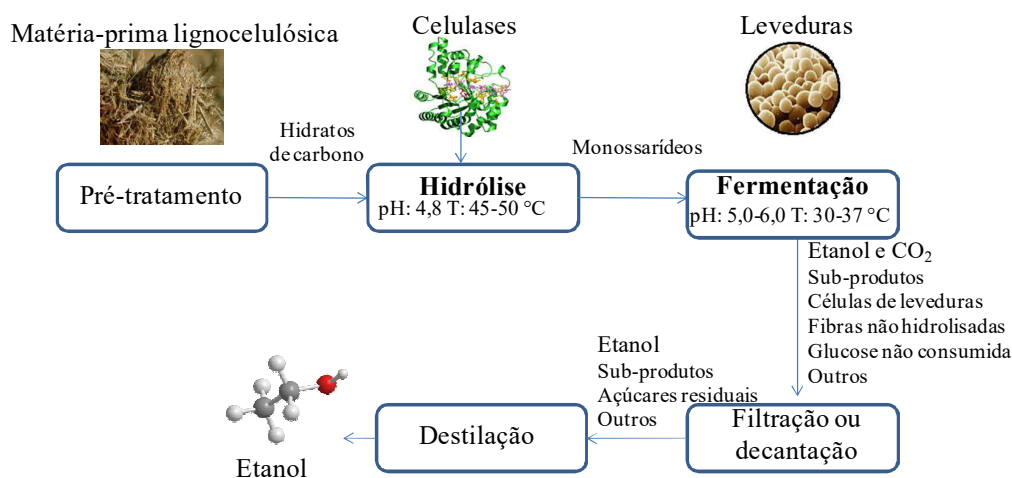


Figura 10- Fluxograma do processo SHF.

A principal vantagem dessa estratégia é permitir que tanto a hidrólise da celulose como a fermentação da glucose ocorra em suas condições ótimas. O extrato enzimático das

celulases tem atividade máxima entre as temperaturas de 45 e 50°C. A maioria dos microrganismos produtores de etanol cresce entre 30 e 37°C (Oloson *et al.*, 2006). No entanto, a estratégia SHF apresenta algumas desvantagens:

- ✓ Inibição do extrato enzimático: este sofre inibição pelo produto da hidrólise, ou seja, os açúcares formados na reação de hidrólise acumulam-se no meio, interferindo assim na atuação eficaz das enzimas. Isto resulta em rendimentos de açúcares mais baixos;
- ✓ Possível contaminação: isto é devido às altas concentrações de açúcares disponíveis no meio que são propícias ao crescimento de microrganismos indesejados. Além disso, o próprio extrato enzimático pode ser uma fonte de contaminação, pois o mesmo não pode submeter-se ao processo de esterilização via térmica, apenas à filtração;
- ✓ Necessidade de arrefecimento: nesta estratégia é necessário haver uma etapa de arrefecimento entre as etapas de hidrólise e de fermentação, incrementando, assim, um custo ao processo (Ask *et al.*, 2012; Alfani *et al.*, 2000; Brethauer *et al.*, 2010; Eklund & Zacchi, 1995; Shen *et al.*, 2011; Taherzadeh & Karimi, 2007; Wingren *et al.*, 2005).

2.6.2 Sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF)

Nesta estratégia, a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação da glucose ocorrem em simultâneo, ou seja, numa única etapa no mesmo reator. As celulases são produzidas em um reator separado ou adquiridas no mercado. Podem ser obtidos rendimentos mais elevados em etanol por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), em comparação com o processo de hidrólise e fermentação separadas (SHF) (Alfani *et al.*, 2000; Stenberg *et al.*, 2000; Tomás-Pejó *et al.*, 2009). O fluxograma representado na **Figura 11** apresenta esta estratégia.

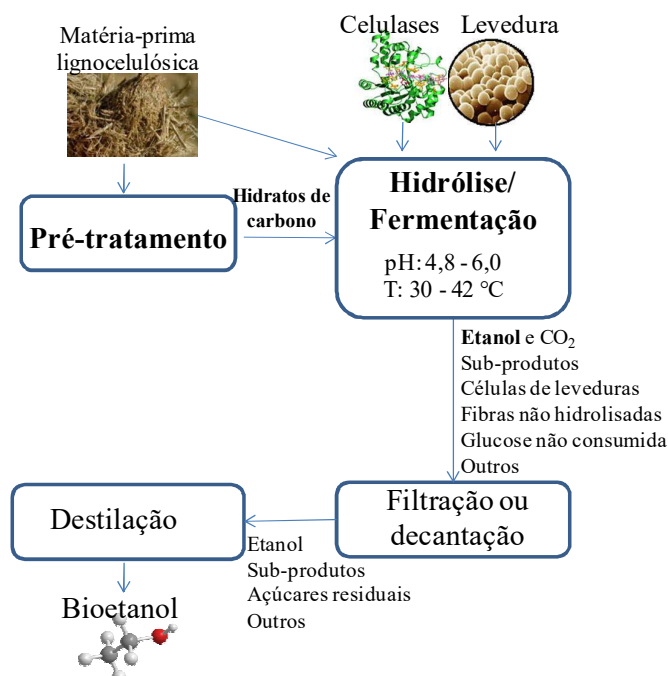


Figura 11 - Fluxograma do processo SSF.

Esta estratégia apresenta diversas vantagens:

- ✓ Redução da inibição pelo produto e os riscos de contaminação: isto é devido ao consumo imediato dos açúcares, provenientes da reação de hidrólise, pelo microrganismo fermentador;
- ✓ Maior economia no processo global: quando comparada à estratégia SHF, esta é mais simples e de menor custo, pois ocorre num único reator e não há necessidade de uma unidade de arrefecimento entre as etapas de hidrólise e de fermentação;
- ✓ Proporciona um pré-aquecimento para a destilação;
- ✓ Maiores rendimentos;
- ✓ Menor tempo total do processo (Babiker *et al.*, 2010; Hägerdal *et al.*, 2006; Sun & Chieng, 2002; Wingren *et al.*, 2005).

No entanto, esta estratégia apresenta uma desvantagem, o desfavorecimento da cinética das reações, pois como dito anteriormente o extrato enzimático das celulases responsável pela hidrólise dos hidratos de carbono da matéria-prima lignocelulósica atua com maior eficiência nas temperaturas entre 45 e 50°C. Em contrapartida, a maioria dos microrganismos cresce entre 30 e 37°C. O uso de temperaturas abaixo da atividade ótima da enzima aumenta o tempo de SSF e/ou a quantidade de enzimas necessária (Suryawati *et al.*, 2008). Uma alternativa para este problema é utilizar microrganismos que sejam termotolerantes, ou seja, que crescem em temperaturas superiores a 38°C.

2.6.3 Sacarificação e Co-fermentação Simultânea

Esta estratégia assemelha-se à do SSF, porém o microrganismo aplicado neste processo tem a capacidade de fermentar tanto as hexoses, provenientes da celulose, como também as pentoses, provenientes das hemiceluloses (Kang *et al.*, 2010).

2.6.4 Bioprocesso consolidado

Nas três estratégias descritas anteriormente era necessária uma unidade separada para a produção das celulasas, ou estas eram adquiridas de um produtor externo. Na estratégia do bioprocessos consolidado, a produção de celulasas e de etanol a partir da celulose e hemicelulose são realizadas num único reator através de apenas uma espécie de microrganismo.

Dentro das quatro estratégias referidas acima, o processo SSF é o mais utilizado. De seguida será explicado quais são os microrganismos termotolerantes mais aplicados no processo SSF.

2.7 Microrganismos termotolerantes

A utilização de microrganismos termotolerantes no processo SSF permite que este seja realizado sob temperaturas mais altas. Isto reduz a quantidade de extrato enzimático de celulasas e/ou o tempo necessário para completar a etapa de hidrólise no SSF (Shaw *et al.*, 2008). Entre as espécies de leveduras etanólicas, a que se destaca mais pela sua termotolerância e é uma das mais utilizadas no processo SSF é a espécie *Kluyveromyces marxianus* (Abdel-Fattah *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 1991; Fonseca *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2007; Kádár *et al.*, 2004; Nonklang *et al.*, 2008; Lane & Morrissey, 2010; Souza, 2011; Singh *et al.*, 1998).

2.7.1 *Kluyveromyces marxianus*

A *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura de particular interesse industrial devido à sua diversidade metabólica. Têm sido investigadas as aplicações biotecnológicas desta levedura:

- ✓ Produção de enzimas (β -galactosidase, β -glicosidase, e poligalacturonases, entre outras);
- ✓ Produção de proteína para alimentação animal ou humana;
- ✓ Produção de aromas;
- ✓ Produção de etanol (incluindo processos SSF a temperaturas superiores a 37°C);
- ✓ Produção de bioingredientes de soro de queijo;
- ✓ Biorremediação.

Existem diversas características da *K. marxianus* que a tornam especialmente adequada para aplicação industrial: crescimento celular rápido, tolerância térmica, capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares, secreção de enzimas líticas e produção de etanol por fermentação (Fonseca *et al.*, 2008; Lane & Morrissey, 2010). A **Tabela 2** apresenta algumas características de interesse na produção de etanol por SSF da *K. marxianus* em relação às características de outras espécies da *Kluyveromyces* e da *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 2 - Comparação entre várias espécies de *Kluyveromyces marxianus* e a *Saccharomyces cerevisiae*.

Levedura	Assimilação				Fermentação			
	Glucose	Xilose	Galactose	Celobiose	Glucose	Xilose	μ_{\max} (h ⁻¹)	T _{máxima} (°C)
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-,+	-	+	-	0,37	35
<i>K. aestuarii</i>	+	-	+	+	+	-	N.E*	35
<i>K. nonfermentans</i>	+	-	+	-,+	-	-	N.E	42
<i>K. wickerhamii</i>	+	+	+	+	+	-	0,43	37
<i>K. lactis</i> var <i>lactis</i>	+	-,+	+	+	+	-	0,50	37
<i>K. marxianus</i>	+	-,+	+	-,+	+	-	0,60	52
<i>K. dozhanskii</i>	+	-	+	+	+	-	N.E	35

* N.E: Informação não encontrada.

Fonte: CSB (2013); Lane & Morrissey (2010).

Os valores da **Tabela 2** foram encontrados na base de dados da coleção de leveduras da CSB (Centaalbureau voor Schimmelcultures), com exceção dos valores de taxa específica máxima de crescimento e de temperatura máxima, retirados da revisão realizada por Lane & Morrissey, 2010. Não foram encontrados valores da taxa específica máxima de crescimento

para as espécies *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* e *K. dobzhanskii*. Observa-se na **Tabela 2** que a *K.marxianus* tem a capacidade de assimilar glucose e galactose e algumas estirpes assimilam também xilose e celobiose, porém não havia informação na base de dados da CSB sobre a fermentação dos outros açúcares, além de glucose e xilose . Entre todas as espécies da *Kluyveromyces*, a *K. marxianus* apresenta a maior taxa específica de crescimento e suporta uma maior temperatura.

2.8 Biobutanol

Em comparação com bioetanol, biobutanol tem várias vantagens, como ser menos higroscópico, menos volátil e miscível com a gasolina/diesel. Biobutanol pode ser produzido a partir das fermentações de hidratos de carbono provenientes de biomassas lignocelulósicas num processo muitas vezes referido como a fermentação ABE (acetona butanol etanol). Os microrganismos mais aplicados neste processo são bactérias da espécie *Clostridium* (Qureshi & Ezeji, 2008).

No processo ABE, a fase inicial é chamada acidogênese, durante a qual ocorre um crescimento celular exponencial com produção concomitante de dióxido de carbono, hidrogênio, ácido acético (acetato) e ácido butírico (butirato). Devido a produção dos ácidos orgânicos, observa-se uma progressiva diminuição do pH do meio de cultura. Quando a concentração de ácidos for suficientemente alta, o crescimento celular se torna estacionário e se inicia a segunda fase chamada solventogênese. Durante esta fase, os ácidos passam a ser consumidos juntamente com a fonte de carbono formando, então, acetona, butanol e etanol (Li *et al.*, 2012).

No entanto, uma grande desvantagem da fermentação ABE é a inibição do crescimento microbiano pelo butanol. Para superar este problema, seria necessária uma extração *in situ* do butanol. Mediante as dificuldades deste processo, no presente trabalho optou-se somente pela produção de bioetanol a partir dos resíduos da indústria pasta papeleira.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo descreve as metodologias seguidas neste trabalho. Encontra-se em anexo a descrição mais pormenorizada de alguns métodos analíticos.

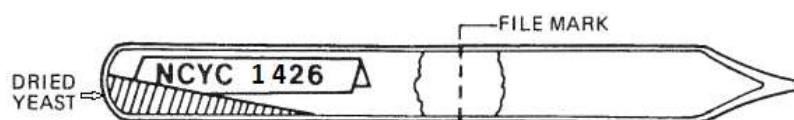
3.1 Leveduras para reações SSF

Neste trabalho utilizaram-se duas estirpes de leveduras para as reações de Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF): *Saccharomyces cerevisiae* tipo levedura seca, oferecida por uma empresa Vitivinícola da região e a *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426. Foi ainda testada uma terceira estirpe de levedura, *Pichia stipitis*, que apresenta a vantagem de fermentar xilose para além de glucose. No entanto, verificou-se que o crescimento da *Pichia stipitis* a 38 °C foi muito reduzido devido a esta temperatura estar afastada da temperatura ótima de 30 °C para esta levedura. Não sendo aconselhável operar o biorreator em SSF a uma temperatura inferior a 38 °C por ser desfavorável a hidrólise enzimática, optou-se por não usar neste trabalho a *Pichia stipitis*.

3.1.1 Ativação da *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426

A *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 foi adquirida na sua forma liofilizada em vácuo armazenada numa ampola de vidro (**Figura 12**). A ativação da levedura foi feita da seguinte maneira, conforme o folheto das especificações (**Anexo 1-A**): cortou-se a ampola na linha tracejada e adicionou-se à levedura liofilizada 1 mL de meio líquido universal para leveduras (YM) com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona e 10 g/L de glucose. Agitou-se e transferiu-se para um balão Erlenmeyerde 150 mL contendo 50 mL de meio YM. Em seguida colocou-se o balão na incubadora orbital (Stuart) sob agitação de 150 rpm, a 30°C por 4 dias. Após os 4 dias, a levedura foi transferida para placas de Petri e tubos de McCartney com meio sólido (meio YM acrescido com ágar (15g/L)) e mantidos a 4°C e -18°C, respectivamente.

Materiais e métodos



Fonte: Folheto das especificações da *K. marxianus* NCYC 1426.

Figura 12 - Representação da *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 liofilizada.

3.1.2 Adaptação das leveduras à temperatura mais elevada

Sabendo que a temperatura ótima de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* é de 30°C, antes de iniciar as reações SSF fez-se um estudo prévio para verificar se a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Kluyveromyces marxianus* suportariam temperaturas mais elevadas. Foram testadas as temperaturas de 38°C (*Saccharomyces cerevisiae*) e de 38°C e 42°C (*Kluyveromyces marxianus*). As adaptações foram feitas em três etapas através de cultivos sucessivos em 50 mL de meio líquido YM com aumento gradativo da temperatura (30, 34 e 38°C para a *Saccharomyces cerevisiae* e 30, 38 e 42°C para a *Kluyveromyces marxianus*). Após estas adaptações constatou-se que a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Kluyveromyces marxianus* seriam capazes de atuar no processo SSF, já que o mesmo é mais eficiente para temperaturas mais elevadas. A seguir está descrita a metodologia da obtenção das curvas de crescimento dessas leveduras que permitem calcular as suas velocidades de crescimento.

3.1.3 Avaliação do crescimento das leveduras em diferentes temperaturas

Esta etapa teve por objetivo avaliar o crescimento celular da *Saccharomyces cerevisiae* e da *Kluyveromyces marxianus* ao longo do tempo. Para isso, foram feitos ensaios de crescimento microbiano (absorvância 540 nm *versus* tempo) a três temperaturas (30, 38 e 42°C) para a *Kluyveromyces marxianus* e a duas temperaturas (30 e 38°C) para a *Saccharomyces cerevisiae*. Primeiramente, inoculou-se o meio líquido YM (50 mL em balões de 125 mL) com leveduras do meio sólido e foi posto a incubar durante 12 h a 30°C, 38°C ou 42°C (150 rpm). Após 12 h, um determinado volume de cada cultura serviu de inóculo e foi transferido para um balão de 250 mL contendo 100 mL de meio YM. Os volumes de inóculos transferidos foram determinados de tal forma que correspondessem a uma densidade ótica (540 nm) de 0,3 no volume total da nova cultura no início do crescimento. Foram retiradas amostras de 1 mL em duplicado, em intervalos de 30 min até às 6 h de crescimento e após 24 h. Uma de cada par de amostras retirada foi centrifugada por 5

Materiais e métodos

min a 3000 rpm, aproveitando-se o sobrenadante (meio de cultura sem células). A densidade ótica das amostras foi analisada a 540 nm num espectrofotómetro UV-Vis. O branco utilizado foi o sobrenadante resultante da centrifugação efectuada. Procedeu-se à diluição das amostras (e do branco) sempre que a leitura direta da densidade ótica excedia 0,6. O sobrenadante foi utilizado também para quantificar os açúcares redutores ainda existentes no meio de cultura, através do método do DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico), de acordo com Miller (1959) (Anexo 2-A) e o etanol produzido pela levedura, através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC).

3.2 Matérias-primas lignocelulósicas

As matérias-primas lignocelulósicas (**Figura 13**), pasta crua e lama primária, utilizadas nas reações SSF foram cedidas por uma fábrica de pasta papelreira da região.



Figura 13 - Matérias-primas lignocelulósicas.

Como a lama primária é um resíduo da produção da pasta, possui uma maior variabilidade na sua composição, comparativamente à pasta crua. A presença de alguns compostos, principalmente o carbonato de cálcio, pode influenciar o rendimento total do processo SSF. Desta forma, alguns ensaios SSF utilizaram lama primária pré-tratada. O pré-tratamento consistiu em neutralizar o carbonato de cálcio com ácido clorídrico (HCl) a 37%. Tendo em conta a reação estequiométrica, foi necessário adicionar 0,729 g de HCl (~1,67 mL de HCl a 37%) por grama de carbonato de cálcio (Anexo 3). A **Tabela 3** apresenta a composição das matérias-primas lignocelulósicas (MPL) utilizadas no presente trabalho.

Tabela 3 - Composição das matérias-primas lignocelulósicas.

Constituintes Matérias-primas Celulósicas	Humidade (%)	HC (% em massa seca)	Lignina (% em massa seca)	Cinzas (% em massa seca)	CaCO ₃ (% em massa seca)
Pasta crua	75,4	93,8	5,1	1,1	0,9
Lama primária	80,2	60,4	4,8	34,8	26,7
Lama primária pré-tratada	83,7	91,6	7,4	1,0	-

Fonte: Mendes *et al.* (2012).

A caracterização das matérias-primas lignocelulósicas já havia sido feita anteriormente pela equipa do laboratório onde se realizou a parte experimental deste trabalho. Realizaram a determinação dos seguintes parâmetros: humidade (% de água presente na matéria-prima), teor de hidratos de carbono (HC) constituídos por celulose e hemicelulose, lignina total (solúvel e insolúvel) e cinzas. Dentro das cinzas existentes, foi ainda determinado o teor de carbonato de cálcio (CaCO₃). A humidade e o teor, em base seca, dos diferentes compostos foram determinados através de métodos de gravimetria e espectrofotometria de acordo com os protocolos LAP-001 "Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass", LAP-003 "Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass", LAP-004 "Determination of Acid- Soluble Lignin in Biomass" e LAP-005 "Standart method for ash in biomass" elaborados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (*National Renewable Energy Laboratory* - NREL) (NREL-LAP 001, 1994; NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996; NREL-LAP 005, 1994).

3.3 Extrato enzimático

O extrato enzimático utilizado nas reações SSF para hidrolisar os hidratos de carbono (HC) em açúcares fermentáveis foi Cellic[®] CTec2 fornecida pela Novozymes. Este extrato é constituído por celulasas, β-glucosidasas e hemicelulasas e a sua atividade enzimática é ótima no intervalo de temperaturas 45-50°C e pH 5,0-5,5. Como as reações SSF ocorreram a temperaturas entre 38°C e 42°C, determinou-se experimentalmente a atividade enzimática deste extrato para essas temperaturas, 45 FPU/mL e 59 FPU/mL de extrato enzimático, respectivamente, de acordo com o protocolo LAP-006 "Measurement of Cellulase Activities", elaborado pelo NREL (NREL-LAP 006, 1996) (Anexo 4). A unidade de FPU (*Filter Paper Activity*) corresponde à velocidade de produção de dois miligramas de glucose a partir da hidrólise de 50 mg de papel de filtro durante 1 h de reação. A carga enzimática utilizada nas reações SSF para hidrolisar os hidratos de carbono dos materiais foi 35 FPU/g_{HC}, de acordo com as recomendações da ficha técnica do produto (Anexo 1-B).

3.4 Procedimento SSF

Os ensaios SSF foram realizados de acordo com o protocolo LAP-008 "SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation", elaborado pelo NREL (NREL-LAP 008, 1995). O procedimento dos ensaios SSF está representado na **Figura 14**.

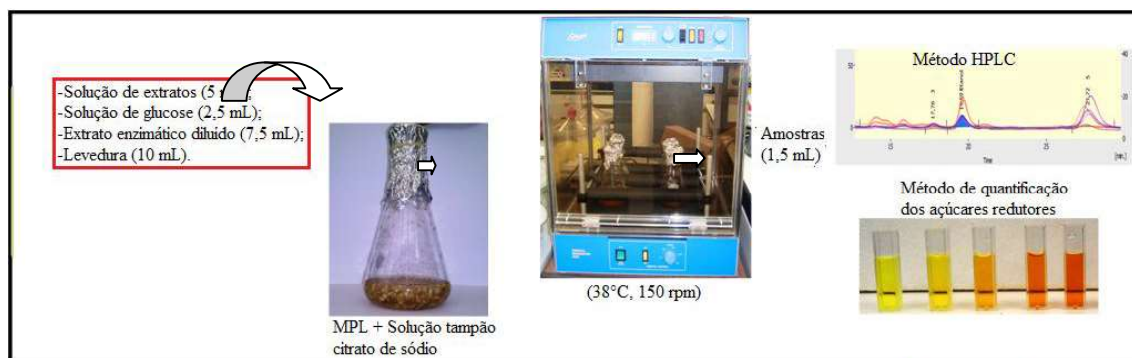


Figura 14 - Esquema do procedimento SSF.

Em balões de Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados, primeiramente, matéria-prima lignocelulósica (MPL) e solução tampão citrato de sódio (pH 5; 0,05M) (Anexo 2-B). A **Tabela 4** apresenta as quantidades de MPL e solução tampão inicialmente adicionadas.

Tabela 4 - Quantidades de HC e MPL e volume de solução tampão.

Matéria-prima lignocelulósica (MPL)	Massa de HC (g)	Massa _{MPL} (g)	Volume Solução tampão (mL)
Pasta crua	2,5 g	10,8	64,2
	5,0 g	21,6	53,4
Lama primária não tratada	2,5 g	20,9	54,1
	5,0 g	41,9	33,1
Lama primária tratada com HCl	2,5 g	17,0	58,0

Os balões, com MPL e solução tampão, foram autoclavados a 121°C por 30 min. Depois de arrefecidos, adicionou-se na seguinte ordem:

- 5 mL de solução de extratos (peptona (100 g/L), extrato de malte (60 g/L) e extrato de levedura (60 g/L));
- 2,5 mL de solução de glicose (200 g/L);
- 7,5 mL extrato enzimático diluído, de modo a dar uma atividade de 35 FPU/g de hidratos de carbono adicionados inicialmente);
- 10 mL de inóculo de levedura.

Materiais e métodos

Os balões foram tapados com papel de alumínio (para limitar a entrada de oxigênio no balão) e colocados em incubadoras orbitais a 38°C e 150 rpm. Foram retiradas amostras periódicas de 1,5 mL a fim de realizar as análises dos açúcares redutores, etanol e pH. A solução de glucose adicionada no início da reação SSF permitia que o microrganismo continuasse na sua fase de crescimento. Contudo, além da solução de glucose, existiam outras fontes contributivas de açúcares: a solução de extratos e o extrato enzimático.

Os ensaios SSF foram realizados em dois tipos de processos: descontínuo e semi-descontínuo. Nos ensaios em descontínuo, as matérias-primas lignocelulósicas foram adicionadas apenas no início das reações e amostras foram retiradas ao longo do tempo de reação.

A seguir será exemplificado um procedimento SSF em descontínuo, com lama primária não-tratada, com concentração de hidratos de carbono igual a 25 g/L e a 38°C:

Lama primária -----	20,9 g
Solução de extratos -----	5,0 mL
Solução de glucose -----	2,5 mL
Extrato enzimático diluído ---	1,9 mL de extrato enzimático + 5,6 mL de solução tampão citrato de sódio
Levedura -----	10,0 mL
Solução tampão -----	54,1 mL
<hr/>	
Total -----	100,0 mL

Nota: A massa específica destes constituintes foi considerada igual a 1g/mL.

No processo semi-descontínuo, foram feitas mais três adições de matéria-prima além da carga inicial em 24, 48 e 72 h de reação. Na **Tabela 5** encontra-se a massa total de hidratos de carbono e de matéria-prima utilizada nos ensaios para um volume reacional de 100 mL. Foram retiradas amostras ao longo do tempo de reação.

Tabela 5 - Massa total de HC e MPL adicionada nos ensaios em regime semi-descontínuo.

Matéria-prima lignocelulósica (MPL)	Massa de HC (g)	Massa _{MPL} (g)
Pasta crua	10 g	43,2
	20 g	86,4
Lama primária	10 g	83,6
	20 g	167,6
Lama primária pré-tratada	10 g	68,0

Foram feitas algumas mudanças nas condições do SSF descritas anteriormente a fim de analisar alguns fatores:

Materiais e métodos

- ✓ Influência do aumento da área de transferência

Realizaram-se ensaios SSF em balões de 500 mL com o mesmo volume reacional descrito anteriormente. Estes ensaios foram realizados para a *S. cerevisiae* com 50 g/L de hidratos de carbono provenientes da lama primária em descontínuo e semi-descontínuo.

- ✓ Efeito da temperatura

Sabendo que a *Kluyveromyces marxianus* cresce em temperaturas superiores a 40°C, realizaram-se ensaios SSF também a 42°C.

3.4.1 Métodos analíticos

A quantificação de etanol nos experimentos em SSF foi feita através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para a determinação quantitativa dos açúcares redutores foi utilizado um método espectrofotométrico baseado na formação de um composto de cor castanha por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico por ação dos açúcares redutores (método colorimétrico do DNS modificado) (Anexo 2-C). A seguir estão descritos esses métodos quantitativos.

- Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Conforme dito anteriormente, aplicou-se a técnica HPLC para quantificar o etanol das reações SSF. Utilizou-se o equipamento Knauer modelo K-301 com a coluna PL Hi-Plex Ca 8 µm e 300 mm (Varian) mantida a 80°C. A coluna foi acoplada ao detector de índice de refração (Knauer). O eluente foi água ultra pura desgaseificada debitado a 0,6 mL/min. O etanol foi identificado pelo seu tempo de retenção na coluna utilizada e a sua concentração foi determinada através de uma curva de calibração previamente construída. Foram igualmente efectuadas as curvas de calibração para glucose e xilose (NREL-LAP 015, 1996) (Anexo 5).

- Determinação dos açúcares redutores através do método DNS modificado

Transferiu-se 0,5 mL das amostras, diluídas quando necessário, para tubos de ensaio. Adicionou-se 1 mL de solução tampão citrato 0,05 M e 3 mL de reagente DNS modificado. A mistura foi colocada num banho de água a ferver por 5 minutos, seguido de arrefecimento

Materiais e métodos

num banho de água com gelo por 5 minutos. Após o arrefecimento, pipetou-se 0,2 mL da mistura para uma cuvete e adicionou-se 2,5 mL de água destilada. A absorvância da mistura foi medida no espectrofotómetro num comprimento de onda de 540 nm, contra um branco de solução tampão citrato 0,05 M que sofreu o mesmo tratamento das amostras. A quantidade dos açúcares redutores existente foi determinada através da aplicação da equação da curva de calibração do DNS modificado, que relaciona absorvância com concentração de glucose, para soluções padrão de concentração conhecida (NREL-LAP 006, 1996).

3.4.2 Parâmetros SSF

Foram calculados dois parâmetros a partir dos resultados obtidos neste trabalho, o rendimento etanólico (%) e a produtividade (g / (L h)). O cálculo do rendimento etanólico em % do rendimento teórico foi obtido pela Equação 1 retirada do protocolo LAP-008.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{[\text{Etanol}]_f - [\text{Etanol}]_i}{0,568 [\text{HC}]} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

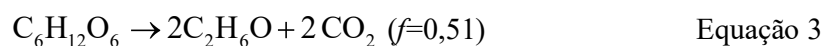
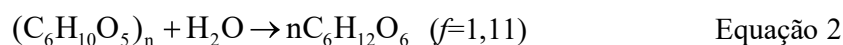
$[\text{Etanol}]_f$ - Concentração final de etanol (g/L);

$[\text{Etanol}]_i$ - Concentração inicial de etanol (g/L) - aproximadamente zero;

[HC] - Concentração de hidratos de carbono (g/L);

0,568 - Fator de conversão mássica da celulose para etanol (f).

O fator de conversão mássica 0,568 é resultante da multiplicação dos fatores de conversão mássica da reação de hidrólise da celulose (Equação 2) e da reação de fermentação da glucose (Equação 3).



A produtividade, que relaciona a concentração de etanol obtida no respectivo tempo t de reação, foi avaliada pela Equação 4.

$$\text{produtividade} = \frac{[\text{Etanol}]_t}{t} \left(\frac{\text{g}}{\text{L h}} \right) \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

$[\text{Etanol}]_t$ - Concentração de etanol no tempo t (g/L);

t - tempo reacional (h).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos neste trabalho pela seguinte ordem:

- Seleção de uma estirpe termotolerante adequada ao processo SSF
- Avaliação do crescimento das estirpes selecionadas a diferentes temperaturas;
- Ensaio SSF
 - ✓ *Saccharomyces cerevisiae* (comercial);
 - ✓ *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426.

4.1 Seleção de uma estirpe termotolerante adequada ao processo SSF

A primeira etapa deste trabalho consistiu em selecionar uma estirpe termotolerante, capaz de atuar sobre as lamas primárias da indústria de pasta papelreira, num processo SSF, e proceder à sua aquisição. Para isso, foi feita uma pesquisa na literatura com o intuito de listar as estirpes mais utilizadas para a produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas lignocelulósicas por SSF. Na **Tabela 6** estão reunidas informações de 20 trabalhos científicos, tais como o tipo de matéria-prima residual (lignocelulósica ou agro-industrial), a estirpe microbiana usada e a temperatura a que a reação de SSF foi realizada.

Os critérios pré-definidos neste trabalho para a seleção da estirpe foram os seguintes: i) optar preferencialmente por uma levedura, e não por uma bactéria, devido a um mais fácil controlo de contaminação (por exemplo por ajuste de pH) e ainda pelo fato do pH ótimo das leveduras ser mais baixo do que o das bactérias, e mais próximo do pH ótimo dos extratos enzimáticos hidrolíticos que se pretendem utilizar; ii) e uma estirpe que tolerasse temperaturas iguais ou superiores a 40°C. Na **Tabela 6**, a maioria das estirpes são leveduras, exceto a *Escherichia coli* e a *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* que são bactérias. Os valores que estão em negrito correspondem a temperaturas $\geq 40^\circ\text{C}$. Aplicando os critérios pré-definidos mencionados acima, as espécies mais adequadas para o trabalho proposto foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces fragilis*.

Resultados e discussão

Tabela 6 - Produção de bioetanol segundo o processo SSF para diferentes matérias-primas, microrganismos e temperaturas.

Autor (ano)	Matéria-prima	Microrganismo	Temperatura (°C)
Shao <i>et al.</i> (2011)	Avicel e palha de milho	<i>S. cerevisiae</i> D5A	37
Kang <i>et al.</i> (2010)	Lamas de papel kraft	<i>S. cerevisiae</i> ATCC-200062 <i>Escherichia coli</i> ATCC-55124	37
Nikolic <i>et al.</i> (2010)	Farinha de milho	<i>S. cerevisiae</i>	30
Park <i>et al.</i> (2010)	Resíduos de papel de jornal	<i>S. cerevisiae</i> KNU5377	30/37/40
Li <i>et al.</i> (2009)	Resíduos lignocelulósicos	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 24858	38
Srichuwong <i>et al.</i> (2009)	Mistura de batata	<i>S. cerevisiae</i> NBRC 0224	30
Shaw <i>et al.</i> (2008)	Avicel PH-105	a) <i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> ALK2; b) <i>S. cerevisiae</i> D5A	a) 50; b) 37
Chen <i>et al.</i> (2008)	Palha de trigo	<i>S. cerevisiae</i>	40
Marques <i>et al.</i> (2008)	Lamas de papel reciclado	<i>P. stipitis</i> CBS 5773	30
Ohgren <i>et al.</i> (2006)	Palha de milho	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	35
Alkasrawi <i>et al.</i> (2006)	Aparas de Abeto	Levedura de padeiro comercial (<i>S. cerevisiae</i>)	37
Sassner <i>et al.</i> (2006)	Aparas de madeira (<i>Salix schwerinii</i> x <i>Salix viminalis</i>)	<i>S. cerevisiae</i>	37
Rudolf <i>et al.</i> (2005)	Aparas de Abeto	Levedura de padeiro comercial (<i>S. cerevisiae</i>)	30
Kádár <i>et al.</i> (2004)	Papelão velho ondulado e lamas de papel	<i>K. marxianus</i> Y01070	40
Ballesteros <i>et al.</i> (2004)	Biomassa de <i>Populus nigra</i> e de <i>Eucaliptus globulus</i> , palha de trigo, bagaço de sorgo doce	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42
Fan <i>et al.</i> (2003)	Lama de papel	<i>S. cerevisiae</i> D5A	36
Krishna <i>et al.</i> (2001)	Folhas de <i>A. leptopus</i> e folhas de cana-de-açúcar	a) <i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y-132; b) <i>K. fragilis</i> NCIM 3358	a) 40 b) 43
Ballesteros <i>et al.</i> (1991)	Solka-Floc	a) <i>K. fragilis</i> b) <i>K. marxianus</i>	a) 42 b) 45
Souza (2011)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>K. marxianus</i> UFV3/ <i>S. cerevisiae</i> LBM1	37/42
Ferreira <i>et al.</i> (2009)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>S. cerevisiae</i>	37

A espécie selecionada para aquisição foi a *Kluyveromyces marxianus*, pois entre as duas espécies da *Kluyveromyces* é a que mais favorece a fermentação etanólica. A *Saccharomyces cerevisiae* foi também selecionada, porém não foi necessária a sua aquisição, pois no laboratório, onde se realizou a parte experimental deste trabalho, já existiam algumas estirpes desta levedura, quer na forma de levedura seca ativa, usada nas indústrias de panificação e vitivinícola, quer estirpes provenientes de coleção de cultura.

Após a escolha da espécie a ser adquirida, foram recolhidas informações sobre as diferentes estirpes dentro desta espécie, através do acesso ao catálogo da coleção britânica de

Resultados e discussão

alguns microrganismos *National Collection of Yeast Cultures* (NCYC). A **Tabela 7** apresenta algumas estirpes do catálogo da NCYC, com as respectivas temperaturas máximas e aplicações preferenciais.

Tabela 7 - Diferentes estirpes da *Kluyveromyces marxianus*, temperatura máxima de tolerância ($T_{máxima}$) e aplicações.

NCYC	$T_{máxima}$ (°C)	Aplicações
100	41	Produção de etanol, UDP-4-galactose epimerase
111	43	Altas temperaturas
151	42	Altas temperaturas
179	44	Altas temperaturas
426	44	Altas temperaturas
587	47	Degradação de soro de leite
		Produção de beta-galactosidase
		Produção de biomassa
		Produção de inulinase
		Produção de toxinas
		Estirpe termofílica
1426	42	Produção de biomassa
		Degradação de glucose
		Degradação de permeado de soro
		Fermentação de pentose
		Produção de acetodehidrogenase
		Produção de beta-galactosidase
		Produção de butanedioldehidrogenase
		Produção de etanol
		Produção de glicerol
		Produção de lactase

Fonte: NCYC (2012).

A estirpe escolhida para a compra foi a *Kluyveromyces marxianus* termotolerante NCYC 1426 devido às informações a ela associadas. Na **Tabela 7** é possível observar que esta estirpe possui aplicações adequadas ao objetivo deste trabalho, em particular a degradação de glucose, a fermentação de pentose e a produção de etanol, para além de suportar temperaturas até 42°C.

4.2 Avaliação do crescimento das estirpes a diferentes temperaturas

Antes de iniciar os ensaios SSF realizou-se um estudo para avaliar o crescimento celular da *S. cerevisiae* (comercial) e da *K. marxianus* NCYC 1426 para as temperaturas de 30, 38 e 42°C. Este estudo teve por objetivo determinar a que temperaturas os ensaios SSF poderiam ser submetidos. As estirpes foram inoculadas em meio líquido YM (20 g/L de glucose) e retiraram-se amostras em intervalos de 30 min até às 8 h de crescimento e depois às 24 e 30 h.

Resultados e discussão

A densidade ótica destas amostras foi medida a 540 nm num espectrofotómetro UV-Vis, que permitiu obter as curvas de crescimento destas estirpes. Na **Figura 15**, estão apresentadas as curvas de crescimento (densidade ótica (540 nm) versus tempo (h)) da *S. cerevisiae* e da *K. marxianus* NCYC 1426 a 30, 38 e 42°C.

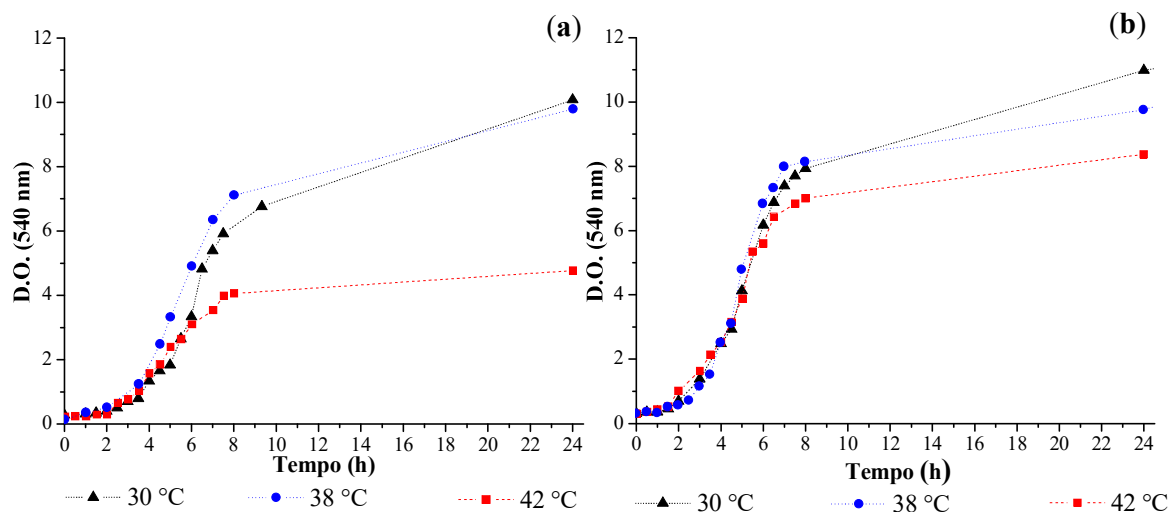


Figura 15 - Curvas de crescimento da (a) *S. cerevisiae* (comercial) e da (b) *K. marxianus* NCYC 1426 em meio líquido YM a 30, 38 e 42°C.

Como pode ser observado na **Figura 15**, as duas estirpes cresceram nas temperaturas de 30, 38 e 42°C. Analisando essas curvas de crescimento, observam-se, em geral, três estágios de crescimento:

- Fase de adaptação - das 0 às 2 horas;
- Fase exponencial - das 2 às 6,5 horas;
- Fase estacionária - das 6,5 às 24 horas.

A fase de adaptação foi semelhante para ambas as estirpes nas temperaturas testadas, com um tempo igual a 2 horas, a partir do qual se iniciou a fase exponencial de crescimento. Com o objetivo de avaliar a taxa específica de crescimento, μ , procedeu-se à regressão linear do logaritmo neperiano da densidade ótica ($\ln(D.O.)$) em função do tempo de cultura, na fase de crescimento exponencial, entre as 2,0 e as 6,5 horas.

Para verificar a capacidade termotolerante das estirpes e escolher quais as temperaturas a serem aplicadas no processo SSF, foram analisados dois parâmetros: a taxa específica de crescimento (μ) e as densidades óticas (D.O.) obtidas ao fim das 24 h e 30 h de crescimento. A **Tabela 8** apresenta estes parâmetros.

Resultados e discussão

Tabela 8- Taxa específica de crescimento (μ) e densidades óticas (D.O._{540 nm}) correspondentes a 24 h e 30 h de crescimento nas temperaturas (T) de 30, 38 e 42°C.

T (°C)	<i>S. cerevisiae</i> (comercial)			<i>K. marxianus</i> NCYC 1426		
	μ (h ⁻¹)	D.O. _{540 nm} (24 h)	D.O. _{540 nm} (30 h)	μ (h ⁻¹)	D.O. _{540 nm} (24 h)	D.O. _{540 nm} (30 h)
30	0,54	10,1	11,0	0,51	10,9	11,7
38	0,56	9,8	11,5	0,68	9,7	10,9
42	0,42	4,8	5,3	0,46	8,1	9,0

As maiores taxas de crescimento foram observadas para a incubação *S. cerevisiae* (comercial) e da *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C. O desempenho de crescimento da *S. cerevisiae* (comercial) foi baixo a 42°C, pois apresentou a menor taxa específica de crescimento e após as 24 h obtiveram-se densidades óticas equivalentes a metade das densidades óticas obtidas no crescimento da *K. marxianus* NCYC 1426 à mesma temperatura (42 °C). A *K. marxianus* NCYC 1426 apresentou um maior crescimento a 42°C e uma maior taxa de crescimento tanto a 38°C como a 42°C em relação à *S. cerevisiae*, comprovando a sua termotolerância. Esta termotolerância é de extrema importância para viabilizar o processo SSF. Mediante os resultados obtidos, optou-se por utilizar a temperatura de 38°C nos ensaios SSF para *S.cerevisiae* (comercial) e as temperaturas de 38 e 42°C para *K. marxianus* NCYC 1426.

4.3 Ensaios SSF com *Saccharomyces cerevisiae*

Foram realizados diversos ensaios de SSF com a *S. cerevisiae* a 38°C, em regime descontínuo ou semi-descontínuo. Como fonte de carbono utilizou-se a fracção de hidratos de carbono da pasta crua e da lama primária (não tratada ou pré-tratada com HCl), com concentrações iniciais de 25 ou 50 g/L. No regime semi-descontínuo, para além da carga inicial de hidratos de carbono, foi sendo periodicamente adicionada uma carga de valor igual à inicial. Todos os ensaios foram realizados em balões de Erlenmeyer de 250 mL (volume de cultura de 100 mL), com exceção de alguns ensaios nos quais se utilizaram balões de 500 mL, para observar efeitos de agitação e de aumento da superfície livre para a oxigenação do meio. O conjunto de ensaios realizados com a *S. cerevisiae* encontra-se esquematizado na **Figura 16**.

Descontínuo	Semi-descontínuo
Pasta crua • [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L	Pasta crua • [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L
Lama primária • [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L	Lama primária • [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L
Lama primária (pré-tratada) • [HC] = 25g/L	Lama primária (pré-tratada) • [HC] = 25g/L
Lama primária (balão 500 mL) • [HC] = 50g/L	Lama primária (balão 500 mL) • [HC] = 50g/L

Figura 16 - Conjunto de ensaios efetuados com a *S. cerevisiae*.

4.3.1 Ensaios SSF em regime descontínuo

Neste regime não houve adição de matéria-prima para além da que foi colocada inicialmente. Foram realizados ensaios de SSF com concentrações de 25 g/L ou 50 g/L de hidratos de carbono da pasta crua ou lama primária (não tratada ou pré-tratada com HCl). As duas concentrações de hidratos de carbono avaliadas nestes ensaios influenciam diretamente nas concentrações máximas de etanol que podem ser obtidas. Segundo a estequiometria das reações de hidrólise e fermentação, os ensaios com concentração de hidratos de carbono de 25 g/L podem obter até 14,4 g/L de etanol e os ensaios com concentração de hidratos de carbono de 50 g/L podem obter até 28,8 g/L de etanol.

- Carga inicial de 25 g/L de hidratos de carbono

De seguida, apresentam-se os resultados dos ensaios com 25g/L de hidratos de carbono. A evolução da concentração de açúcares e de etanol encontra-se representada na **Figura 17**.

Resultados e discussão

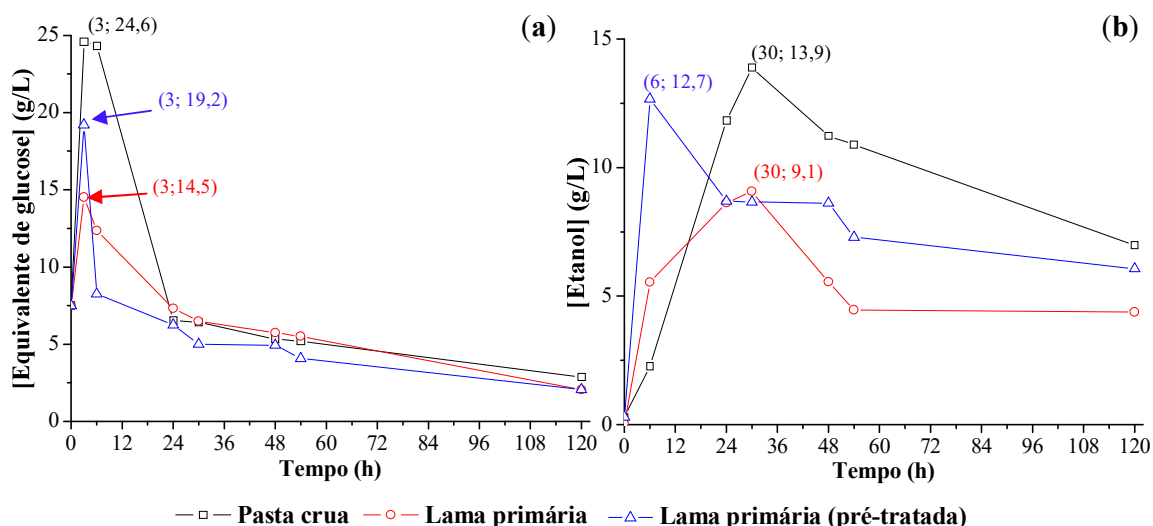


Figura 17 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol no processo de SSF com 25 g/L de HC em regime descontínuo utilizando pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada com a *S. cerevisiae*.

Na **Figura 17 (a)** observa-se no início dos ensaios SSF ($t=0$) que a concentração de açúcares é igual a 7,5 g/L. Este valor é resultante das somas contributivas de açúcares adicionadas inicialmente ao processo SSF: 5 g/L proveniente da solução de glucose, 2,3 g/L proveniente da solução de extratos e 0,2g/L proveniente do extrato enzimático. Esta concentração de açúcares avaliada (7,5 g/L) foi a mesma para todos ensaios SSF com carga de HC igual a 25 g/L.

Nos ensaios da **Figura 17 (a)** observa-se que houve um período de produção de açúcar até às 3 h, onde os níveis de açúcar foram máximos. Posteriormente, os níveis de açúcar diminuíram e atingiram valores menores que 5g/L em 120 h. Isto pode ser explicado devido à reação de hidrólise ocorrer nas primeiras 3 h de reação, ou seja, o extrato enzimático atuou sobre as cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose presentes nas matérias-primas, transformando-as nos respectivos monossacarídeos (maioritariamente glucose e alguma xilose) e proporcionando assim, um aumento na concentração destes. Simultaneamente, à medida que a glucose vai sendo produzida a partir da hidrólise enzimática da celulose, ocorre também o seu consumo pela levedura, que a utiliza tanto para o seu crescimento celular, como para a produção de bioetanol.

As concentrações máximas de açúcares obtidas nos ensaios da pasta crua, lama primária pré-tratada e lama primária foram, respectivamente, 24,6 g/L, 19,2 g/L e 14,5 g/L em 3 h. Apesar de se ter adicionado a mesma carga de hidratos de carbono em todos os ensaios da **Figura 17**, a concentração máxima de açúcares obtida foi relativamente baixa quando se utilizou a lama primária como matéria-prima lignocelulósica. Tal pode dever-se a uma maior

Resultados e discussão

resistência ao ataque enzimático sobre a celulose e as hemiceluloses, provocada pela presença do carbonato de cálcio na lama primária. Por outro lado, para a mesma carga inicial de hidratos de carbono usadas nos ensaios, foi necessário adicionar quase o dobro da massa de lama relativamente à pasta. A suspensão de lama é assim mais consistente, dificultando a mistura desta reacção heterogénea através de agitação orbital e a interacção entre o extracto enzimático e as fibras celulósicas.

Na **Figura 17 (b)** observa-se que houve um período de produção de etanol até às 30 h nos ensaios da pasta crua e lama primária e até às 6 h no ensaio da lama primária pré-tratada. Posteriormente, houve um período de consumo de etanol. Acredita-se que este consumo de etanol ocorreu devido às baixas concentrações de açúcares a partir das 24 h. A maior parte dos açúcares ainda disponíveis muito provavelmente era xilose, não utilizada pela levedura. A literatura descreve muito firmemente que a *S. cerevisiae* metaboliza apenas os monossacarídeos de glucose (Kang *et al.*, 2010). Segundo Ballesteros *et al.* (2004), a performance das leveduras pode ser afetada em baixa concentração de glucose. A partir do momento em que a glucose se esgotou, verificou-se um decréscimo na concentração de etanol, que passava a ser consumido pelas células de leveduras, não sendo por isso vantajoso prolongar o tempo de reacção. Os valores de rendimento em etanol (com base na totalidade dos hidratos de carbono adicionados) e de produtividade são apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9- Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em descontinuo de 25 g/L de HC da pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada.

Tempo (h)	Pasta crua		Lama primária		Lama primária pré-tratada	
	R _{EiOH} (%)	Prod. g/(L h)	R _{EiOH} (%)	Prod g/(L h)	R _{EiOH} (%)	Prod g/(L h)
6	16	0,38	39	0,92	87	2,11
24	83	0,49	61	0,36	59	0,36
30	98	0,46	64	0,30	59	0,29
48	77	0,23	31	0,09	49	0,15
54	79	0,21	39	0,10	59	0,16
120	49	0,06	31	0,04	41	0,05

Os valores destacados na **Tabela 9** são os rendimentos e produtividades correspondentes às concentrações máximas de etanol obtidas nestes ensaios. Observa-se que o ensaio da pasta crua apresentou maior rendimento de etanol, 97,8% em 30 h, correspondendo a uma concentração de etanol de 13,9 g/L. No entanto, observa-se que ao longo do tempo os rendimentos de etanol diminuíram consideravelmente, de 97,8% (30 h) para 49,1% (120 h) no ensaio da pasta crua, de 63,6% (30 h) para 30,5% (120 h) no da lama primária e de 59,1% (24 h) para 40,6% (120 h) no da lama primária pré-tratada. Esta diminuição está diretamente relacionada com o consumo de etanol observado na **Figura 17 (b)**.

Resultados e discussão

Dentro dos ensaios da lama primária, os ensaios que usaram lama primária pré-tratada foram os que mais se aproximaram dos ensaios de pasta crua. O ensaio de lama primária pré-tratada apresentou a maior velocidade de produção de etanol, 2,11 g/(L h) com 12,7 g/L de etanol em 6 h. A diferença dos resultados dos ensaios da lama primária pré-tratada e não tratada pode ser explicada devido à presença do carbonato de cálcio na lama não tratada. Constatou-se que os sistemas reacionais eram heterogêneos nas horas iniciais e após três horas de reação estavam quase totalmente homogêneos, ou seja, somente fase líquida, com exceção das cinzas presentes na lama primária que se depositaram no fundo do reator, conforme pode ser observado na **Figura 18**.

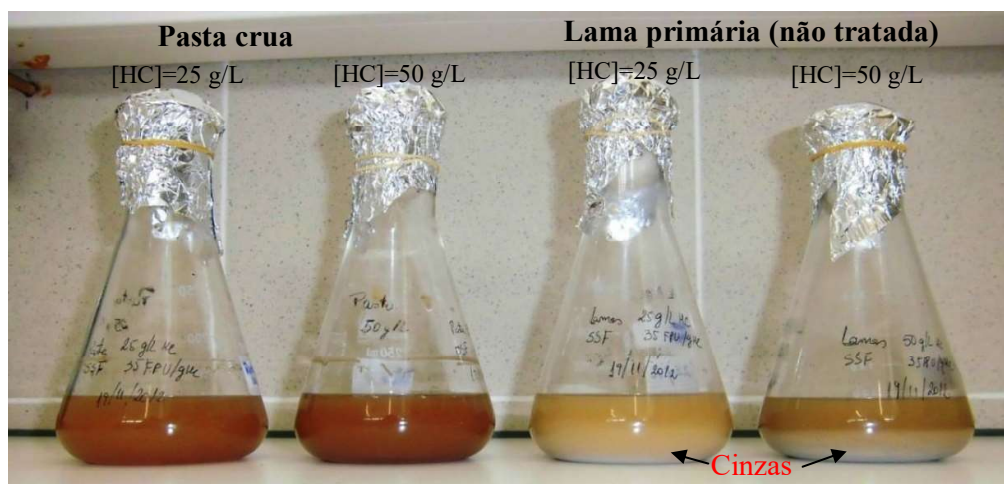


Figura 18 - Ensaios SSF da pasta crua e lama primária (não tratada) após 6 h de reação.

A existência do carbonato de cálcio confere inicialmente um pH 7,8 à lama, superior ao pH ótimo da atuação da enzima Cellic[®] CTec2 (5,0), no entanto ao longo da reação o pH diminuiu (**Figura 19**).

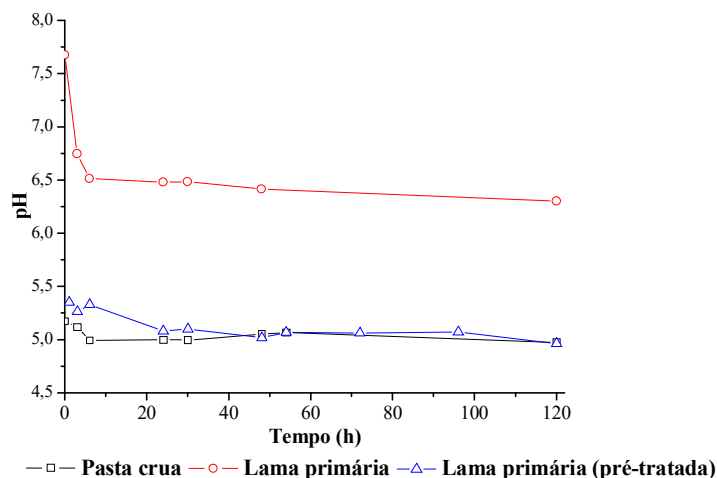


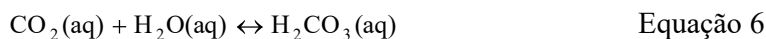
Figura 19 - Evolução do pH no processo de SSF de 25 g/L de HC em regime descontínuo utilizando pasta crua, lama primária (com e sem pré-tratamento) com a *S. cerevisiae*.

Resultados e discussão

As faixas de pH no decorrer do tempo compreenderam entre 5,2 - 5,0 (pasta crua), 5,3 - 5,0 (lama pré-tratada) e 7,7 - 6,3 (lama não tratada). Percebe-se que os valores de pH dos ensaios da pasta crua e lama pré-tratada praticamente não variaram, indicando que a solução tampão citrato de sódio (pH 5,0) estabilizou o pH destas reações. Em contrapartida, o pH do ensaio da lama não tratada variou significativamente. É sugerido que a queda do pH foi devida a duas razões: formação de ácidos orgânicos e dióxido de carbono (CO₂).

Juntamente com o etanol e o CO₂, o metabolismo das leveduras pode levar também a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (acético, láctico, succínico, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros componentes de menor significado quantitativo. No ensaio da lama não tratada, através das análises de HPLC, detectou-se a formação de ácido acético. Foram feitas curvas de calibração no cromatógrafo a fim de determinar as concentrações deste ácido. A máxima concentração de ácido acético no ensaio da lama não tratada foi 1 g/L. Percebe-se que a produção deste ácido não foi a única causa da queda do pH, pois foi produzido em pequena quantidade.

Outra razão seria o dióxido de carbono produzido pelas leveduras que é um componente importante no metabolismo destes microrganismos. O dióxido de carbono é produzido em larga quantidade, aproximadamente a mesma quantidade de etanol. Este dissolve-se no meio reacional em condições de super saturação, formando ácido carbónico pelas reações de associação e dissociação evidenciadas pelas equações 5, 6, 7 e 8.



Segundo Kang *et al.* (2010), os ácidos orgânicos e o ácido carbónico podem interagir resultando num efeito adicional para a queda observada do pH. Contudo, apesar da diminuição do pH no ensaio da lama não tratada, este ainda permaneceu distante uma unidade do pH ideal para o processo SSF.

- Carga inicial de 50 g/L de hidratos de carbono

De seguida apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios SSF de cargas iniciais de 50 g/L de hidratos de carbono da pasta crua e lama primária (não tratada) em regime descontínuo. A evolução da concentração dos açúcares e etanol encontra-se representada na **Figura 20**.

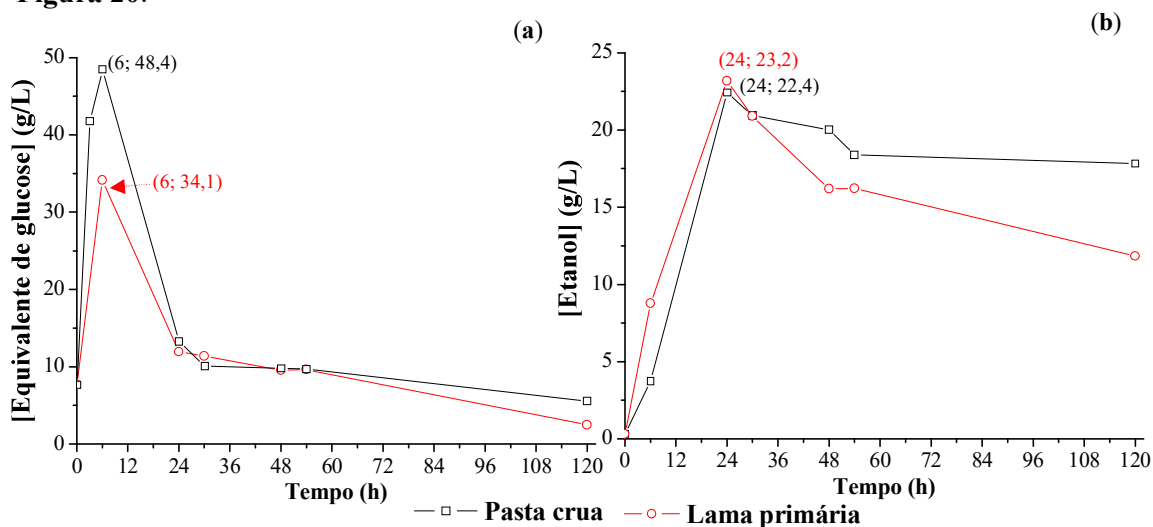


Figura 20 - Evolução da concentração dos açúcares (a) e etanol (b) no processo de SSF de 50 g/L de HC em regime descontínuo utilizando pasta crua e lama primária com a *S. cerevisiae*.

Na **Figura 20 (a)** observa-se no início dos ensaios SSF ($t=0$) a concentração de açúcares é igual a 7,7 g/L. Este valor é resultante das somas contributivas de açúcares adicionadas inicialmente ao processo SSF: 5 g/L proveniente da solução de glucose, 2,3 g/L proveniente da solução de extratos e 0,4 g/L proveniente do extrato enzimático. Esta concentração de açúcares avaliada (7,7 g/L) foi a mesma para todos ensaios SSF com carga de HC igual a 50 g/L. As maiores concentrações de açúcares observadas na **Figura 20 (a)** dos ensaios da pasta crua e lama primária foram 48,4 e 34,1 g/L em 6 h, respectivamente. Quando se comparam com os ensaios de cargas iniciais de 25 g/L hidratos de carbono, percebe-se que foi necessário maior tempo para atingir as concentrações máximas de açúcar, cerca de 3 h adicionais. Isto pode ser explicado devido às suspensões de lama primária e de pasta com 50 g/L de hidratos de carbono serem relativamente mais consistentes (**Figura 21**), dificultando assim a mistura destas reações heterogéneas através de agitação orbital e a interação entre o extracto enzimático e as fibras celulósicas.

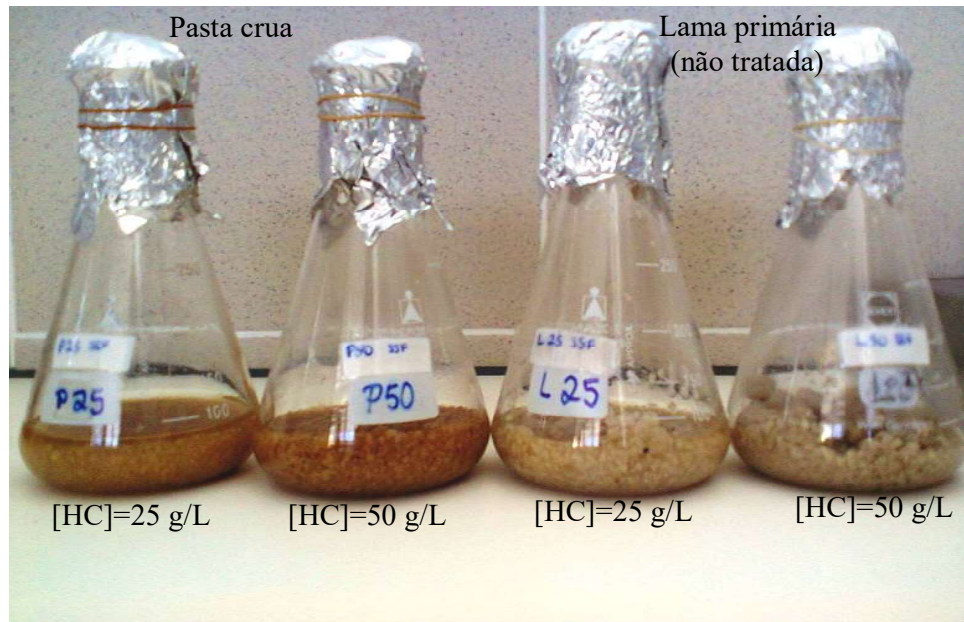


Figura 21 - Ensaios SSF da pasta crua e lama primária (25 e 50 g/L de HC) no início da reação (t=0).

Nos ensaios da pasta crua e lama primária com 50 g/L de HC não foi possível retirar amostras no início da reação devido às suas consistências elevadas. A primeira amostra coletada no ensaio da pasta crua foi em 3 h e da lama primária em 6 h. A partir das 6 h de reação, as velocidades de consumo dos açúcares foram superiores às velocidades de hidrólise. As concentrações de açúcares às 120 h foram aproximadamente 5 g/L.

Na **Figura 20 (b)** nota-se que o ensaio da lama primária obteve relativamente maior concentração de etanol, 23,2 g/L em 24 h, correspondendo a um rendimento de 80,5 % (**Tabela 10**) e a uma velocidade de produção de 0,97g/(L h). No ensaio da pasta crua, a concentração máxima de etanol foi 22,4 g/L em 24 h, correspondendo a um rendimento de 78% e a uma velocidade de produção de 0,94g/(L h). Os resultados sugerem que a lama primária (não tratada) é uma matéria-prima promissora no processo SSF para produção de bioetanol.

Tabela 10 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em descontínuo de 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária.

Tempo (h)	Pasta crua		Lama primária (não tratada)	
	R _{EtOH} (%)	Prod. g/(L h)	R _{EtOH} (%)	Prod g/(L h)
6	12	0,62	30	1,46
24	78	0,94	81	0,97
30	73	0,70	73	0,70
48	70	0,42	56	0,34
54	64	0,34	56	0,30
120	62	0,15	41	0,10

Observa-se na **Tabela 10** que os rendimentos de etanol são máximos em 24 h. Após este tempo os rendimentos diminuem consideravelmente. No ensaio da lama primária diminui cerca de 50% e no ensaio da pasta crua diminui cerca de 25%. As quedas dos rendimentos devem-se ao consumo do etanol, observadas anteriormente na Figura 5 (b), não sendo por isso vantajoso prolongar o tempo de reação além das 24 h.

O valor de pH registado ao longo do tempo manteve-se entre 5,2-5,0 (pasta crua) e 7,7-6,3 (lama primária). Como nos ensaios anteriores, o pH do ensaio da pasta crua praticamente não variou, enquanto no da lama primária o pH desceu 1,4 unidades. A concentração de ácido acético máxima obtida no ensaio da lama primária foi 1,0 g/L. Após a realização dos ensaios SSF com *S. cerevisiae* em regime descontínuo, foram feitos ensaios SSF em regime semi-descontínuo.

4.3.2 Ensaio SSF em regime semi-descontínuo

Na operação em semi-descontínuo, as matérias-primas lignocelulósicas foram alimentadas intermitentemente, sem remoção do meio de cultura. O objetivo destes ensaios foi obter maiores concentrações de etanol a partir do incremento de matéria-prima no biorreator, sem prejudicar a agitação e a interação entre o extrato enzimático e os hidratos de carbono, evitar a inibição do extrato enzimático pelo excesso de açúcar e uma possível contaminação com microrganismos indesejado, economizar o extrato enzimático aplicado ao processo e ter menor consistência inicial do meio de reacional.

Durante a realização dos ensaios SSF em descontínuo, constatou-se que seria desfavorável para a reação de hidrólise utilizar concentrações de hidratos de carbono superiores a 50 g/L, principalmente tendo como matéria-prima a lama primária não tratada, devido aos fatores anteriormente mencionados, como o aumento da consistência do meio reacional (menor relação líquido-sólido), dificultando assim a agitação e a interação entre o extrato enzimático e os hidratos de carbono.

- Adições de 25 g/L de hidratos de carbono (até 100 g/L)

De seguida estão apresentados os resultados dos ensaios com 25 g/L de hidratos de carbono a cada adição, totalizando 100 g/L de hidratos de carbono disponibilizados do início ao fim das reações. Caso estes fossem realizados em descontínuo, a quantidade adicionada de

Resultados e discussão

pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada no início dos ensaios SSF seria 43,3, 83,7 e 68,2 g, respectivamente.

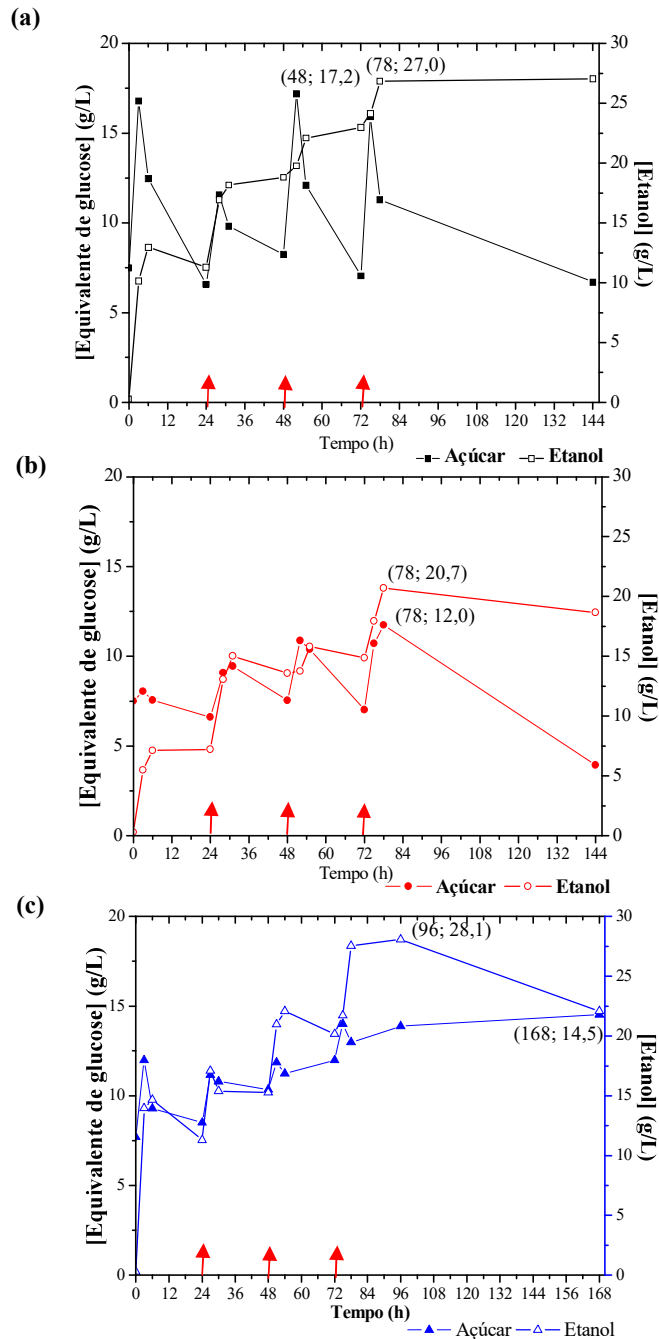


Figura 22 - Evolução da concentração dos açúcares e etanol com cargas de 25 g/L de HC da (a) pasta crua, (b) lama primária e (c) lama primária pré-tratada, em regime semi-descontínuo com *Saccharomyces cerevisiae*.

Nos ensaios da **Figura 22** foram feitas adições de matéria-prima às 24, 48 e 72 h de reação, além da carga inicial. As amostras dos tempos 24, 48 e 72 h foram recolhidas antes das adições de matéria-prima, pois esta por ser sólida, não afetava a diluição do meio reacional nem contribuía no incremento da quantidade de açúcares, somente após a hidrólise.

Resultados e discussão

Nota-se que as concentrações de açúcares apresentaram quatro picos nos seguintes tempos: 3, 27, 51 e 75 h, indicador de que as hidrólises ocorreram em aproximadamente 3 h após a adição de matéria-prima. Observa-se que as concentrações de açúcar obtidas nos ensaios em regime semi-descontínuo mantiveram-se superiores às obtidas nos ensaios em regime descontínuo. Constatou-se nos cromatogramas destes ensaios que ainda havia glucose às 144 h, indicando que muito provavelmente a levedura ainda optava pelo consumo da glucose e não do etanol.

A concentração máxima de etanol obtida no ensaio da lama primária pré-tratada foi superior às obtidas nos restantes ensaios. Produziu-se 28,1 g/L de etanol em 96 h, correspondendo a um rendimento de 49% e uma velocidade de produção de etanol de 0,29g/(L h). Observa-se que o perfil de concentração de etanol do ensaio da lama pré-tratada foi similar ao do ensaio da pasta crua. Os maiores rendimentos de etanol dos ensaios da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) foram 90% (6 h), 52% (30 h) e > 99% (6 h), respectivamente (**Tabela 11**), porém estes não corresponderam às concentrações máximas de etanol e como este trabalho visa a produção de bioetanol em condições economicamente viáveis, não seria vantajoso parar a reação nos tempos equivalentes aos maiores rendimentos.

Tabela 11 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em semi-descontínuo de 25 g/L de HC da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada).

Tempo (h)	Pasta crua		Lama não tratada		Lama pré-tratada	
	R _{EiOH} (%)	Prod. g/(L h)	R _{EiOH} (%)	Prod g/(L h)	R _{EiOH} (%)	Prod g/(L h)
3	70	3,39	37	1,83	96	4,65
6	90	2,16	48	1,19	> 99	2,44
24	78	0,47	49	0,30	77	0,47
30	63	0,59	52	0,48	53	0,51
48	65	0,39	47	0,28	52	0,32
54	51	0,40	36	0,29	51	0,41
72	53	0,32	34	0,21	47	0,28
78	42	0,61	37	0,54	48	0,35
96	-	-	-	-	49	0,29

Os resultados apresentados anteriormente indicam que a lama primária pré-tratada pode ser uma matéria-prima lignocelulósica promissora para a produção de bioetanol nessas condições. De seguida está apresentado a evolução do pH destes ensaios na **Figura 23**.

Resultados e discussão

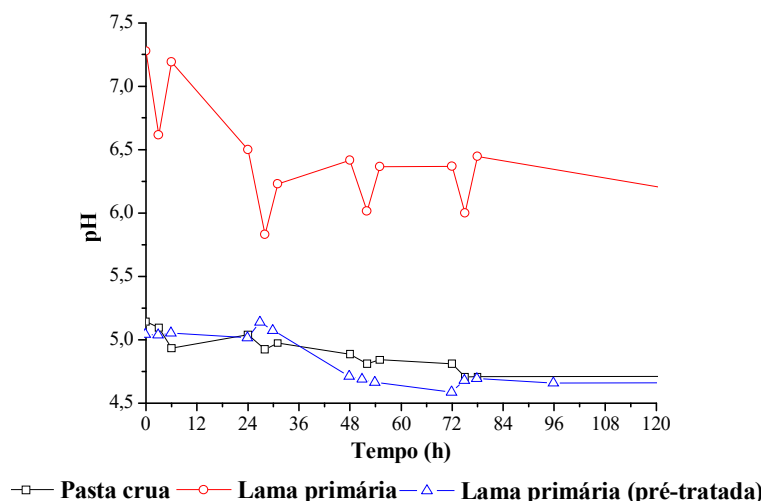


Figura 23 - Evolução do pH no processo SSF com 25 g/L de hidratos de carbono da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) em regime semi-descontínuo com *S. cerevisiae*.

A gama de valores de pH dos ensaios manteve-se entre 5,1 - 4,7 (pasta crua e lama primária pré-tratada) e 7,3 - 6,1 (lama primária não tratada). O perfil de pH do ensaio da lama primária não tratada oscilou devido as adições de lama. Em relação aos ácidos orgânicos, observou-se que houve formação de ácido acético em todos os ensaios. No ensaio da pasta crua a concentração máxima de ácido acético foi de 4,6 g/L, da lama primária pré-tratada foi de 5,0 g/L e da lama primária foi de 2,3 g/L. Foi também detectada a formação de um sub-produto nos ensaios, como se observa na **Figura 24**.

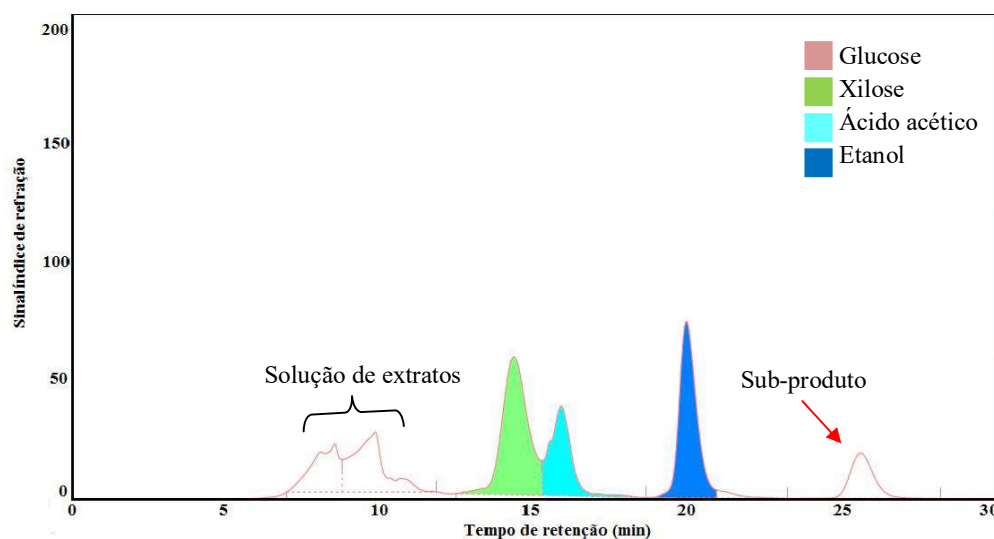


Figura 24 - Cromatograma da reação SSF da pasta crua em 78 h.

A fim de identificar este sub-produto os seguintes compostos foram analisados por HPLC: ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, glicerol, propanona, hidróxi-metil-

Resultados e discussão

furfural e furfural. No entanto, nenhum deles correspondeu ao tempo de retenção deste subproduto. No **Anexo 5** encontram-se os tempos de retenção destes compostos.

- Adições de 50 g/L de hidratos de carbono (até 200 g/L)

De seguida apresentam-se os resultados obtidos do SSF em regime semi-descontínuo de cargas iniciais de 50 g/L de hidratos de carbono da pasta crua e da lama primária. Do início ao fim da reação foram disponibilizados 200 g/L de hidratos de carbono. Caso fossem realizados em descontínuo a quantidade de pasta crua e lama primária seria 43,3 e 167,5 g, respectivamente. A evolução de açúcares e etanol encontra-se representada na **Figura 25**.

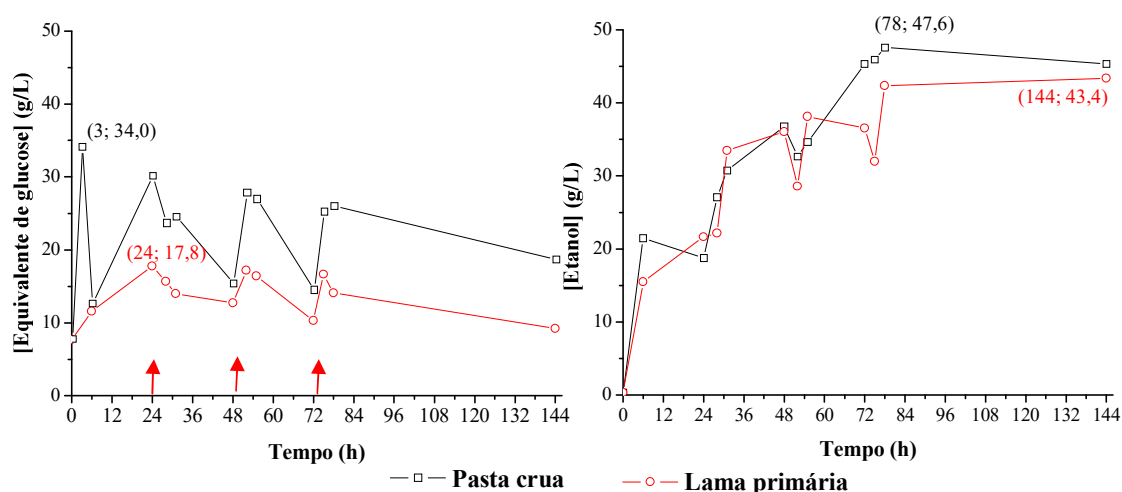


Figura 25 - Evolução da concentração dos açúcares (a) e etanol (b) no processo de SSF com cargas de 50 g/L de HC, em regime semi-descontínuo utilizando pasta crua e lama primária com a *S. cerevisiae*.

As concentrações de açúcares ao longo da reação no ensaio da pasta crua não ultrapassaram as 35 g/L e da lama primária não foi além de 20 g/L. A vantagem de não haver concentrações de açúcares excedentes é que diminui a possibilidade de inibição pelo substrato do extrato enzimático e de contaminação. A variação dos açúcares fermentáveis é dinâmica, varia entre a produção e o consumo, as análises discretas feitas ao longo do tempo apenas permitem avaliar a prevalência da produção ou do consumo em cada período de tempo.

As concentrações de etanol dos ensaios da pasta crua e lama primária foram 47,6 g/L às 78 h e 43,4 g/L às 144 h, respectivamente. No ensaio da lama primária, a concentração máxima de etanol foi apenas 2% superior à concentração de etanol obtida às 78 h (42,3 g/L). Sendo assim, constata-se neste ensaio que não foi vantajoso o prolongamento do tempo

Resultados e discussão

reacional. Os valores de rendimento em etanol (com base na totalidade dos hidratos de carbono adicionados) e de produtividade são apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Rendimento (%) e produtividade (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em semi-descontínuo de 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária.

Tempo (h)	Pasta crua		Lama primária	
	R _{EiOH} (%)	Prod. g/(L h)	R _{EiOH} (%)	Prod. g/(L h)
3	31	3,04	--	--
6	75	3,58	53	2,58
24	65	0,78	75	0,90
30	54	0,99	58	1,08
48	64	0,76	63	0,75
54	40	0,63	44	0,69
72	53	0,63	43	0,51
78	42	0,61	37	0,54
144	40	0,31	38	0,30

Observou-se que à medida que as cargas de MPL foram sendo adicionadas, mais difícil se tornava a agitação do meio heterogêneo e menor era a área superficial de transferência de O₂ e CO₂ entre o meio reacional e o meio envolvente. Observou-se também a acumulação de sólidos no fundo do reator nos ensaios da lama primária. As altas cargas de cinzas, especialmente CaCO₃, podem causar sérios problemas no processo de bioconversão, como interferência no controlo do pH, limite da capacidade do biorreator e redução da eficiência da enzima no bioprocessamento. O pH registado durante o ensaio da pasta crua variou de 5,1 para 4,4 e da lama primária variou de 7,3 para 6,2. A diminuição do pH foi devido à formação de ácidos orgânicos, principalmente, ácido acético. O pH final do ensaio da pasta crua estava abaixo do valor do pKa do ácido acético (4,73), indicando que possivelmente o mesmo estava em sua forma não dissociada (Suryawati *et al.*, 2008).

Constatou-se nos cromatogramas do ensaio da pasta crua a presença do ácido acético e de o sub-produto não identificado no tempo de retenção de 25,5 min. Na **Figura 26** está o cromatograma do ensaio da pasta crua que apresentou a maior concentração de ácido acético no decorrer da reação SSF.

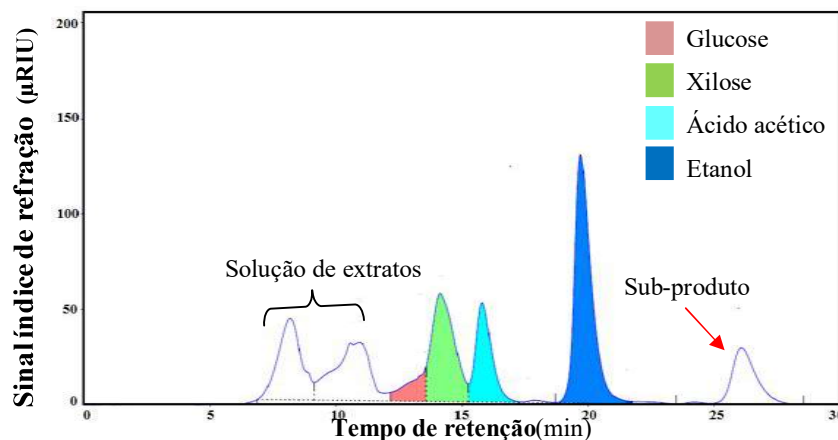


Figura 26 - Cromatograma do ensaio de pasta crua em regime semi-descontínuo (50 g/L de HC) com *S. cerevisiae* em 144 h de reação.

A concentração máxima de ácido acético (tempo de detecção de 15,8 min) no ensaio da pasta crua foi de 9,3 g/L em 144 h. Segundo estudos realizados por Faga *et al.* (2010), a conversão dos açúcares em etanol através da levedura não é afetada pela quantidade total de ácido acético indicando que não possui efeitos inibitórios às células. Em particular, existem leveduras etanológicas, como *S. cerevisiae*, que toleram até 10 g/L de ácido acético sem que afete a produção de etanol (Panganiban *et al.*, 2006). Contudo os produtos da fermentação, como o etanol, ácido láctico e glicerol podem atuar como inibidores do crescimento da levedura e da formação de produtos. A **Tabela 13** reúne os principais resultados dos ensaios SSF com *S. cerevisiae* apresentados até o momento e compara-os com a literatura, em particular, com o trabalho realizado por Kang *et al.* (2010), pois apresentou condições experimentais mais semelhantes com as do presente trabalho.

Os valores de [HC] encontrados na **Tabela 13** foram estimados a partir das informações encontradas no trabalho realizado por Kang *et al.* (2010) e levou-se em consideração a fração da celulose e também da hemicelulose. Os rendimentos de etanol (R_{EtOH}) foram calculados a partir da **Equação 1** e as produtividades (Prod.) foram avaliadas pela **Equação 2**, estas equações foram apresentadas no capítulo "Materiais e Métodos".

Kang *et al.* (2010) realizaram ensaios SSF para a obtenção de bioetanol a partir de lama primária oriunda do processo de pasta Kraft e lama oriunda da reciclagem de papel da fábrica "Boise Paper Company" em Jackson (USA). Em regime descontínuo usaram concentrações iniciais de 37 ou 73 g/L de hidratos de carbono e em semi-descontínuo utilizaram uma concentração total de 145 g/L de hidratos de carbono, utilizando *S. cerevisiae* a 37°C. Além das condições experimentais, as concentrações máximas de etanol obtidas durante este trabalho também foram semelhantes às obtidas por Kang *et al.* (2010).

Tabela 13 - Comparação entre os resultados dos ensaios SSF obtidos com a *S. cerevisiae* neste trabalho e no trabalho realizado por Kang *et al.* (2010).

Regime	Estirpe	MPL	Enzima	Carga enzimática	[HC] g/L	CME g/L	t _{ótimo} (h)	R _{EtOH} (%)	Prod.(g(Lh))	Fonte			
Regime descontínuo	<i>S. cerevisiae</i> (comercial)	Pasta crua	Celulases (Cellic® CTec2 - Novozymes)	35 FPU/g de HC	25	13,9	30	98	0,49	Este trabalho			
		Lama primária			25	9,1	30	64	0,30				
		Lama primária (pré-tratada)			25	12,7	6	87	2,11				
		Pasta crua			50	22,4	24	78	0,93				
		Lama primária			50	23,6	24	81	0,97				
		Lama primária ^(a)			37	13,5	120	64	0,11				
Regime semi - descontínuo	<i>S. cerevisiae</i> ATCC-200062	Lama primária ^(b)	Celulases (Spezyme®CP) + β-glucosidase (Novozyme® 188)	12 FPU/ g de celulose + 24 CBU/g de celulose	73	25,3	120	61	0,21	Kang <i>et al.</i> (2010)			
		Lama reciclada ^(b)			38	13,6	120	63	0,11				
		Pasta crua			77	25,5	120	58	0,21				
		Lama primária			100	27,0	75	90	3,39				
		Lama primária			100	20,7	75	52	1,83				
		Lama primária (pré-tratada)			100	28,1	96	49	0,29				
Regime semi - descontínuo	<i>S. cerevisiae</i> ATCC-200062	Pasta crua	Celulases (Cellic® CTec2 - Novozymes)	35 FPU/g de HC	200	47,6	78	42	0,61	Este trabalho			
		Lama primária			200	43,4	144	37	0,30				
		Lama primária ^(a)			145	45,0	144	54	0,31				
		Lama reciclada ^(b)			153	45,0	144	52	0,31				

MPL: matéria-prima lignocelulósica; [HC]: concentração de hidratos de carbono; **CME**: concentração máxima de etanol; t_{ótimo}: tempo reacional em que obteve a CME;

R_{EtOH}: rendimento em etanol; **Prod.**: produtividade em etanol.

^(a)lama primária - celulose (44,5%), hemicelulose (9,9%), lenhina (8,1%), cinzas (36,0%) e outros (1,5%);^(b)lama reciclada - celulose (49,6%), hemicelulose (13,7%), lenhina (4,6%), cinzas (30%) e outros (2,1%).

Resultados e discussão

Quando se comparam as concentrações máximas de etanol obtidas neste trabalho com outros da literatura que utilizaram *S. cerevisiae* comercial, observa-se que foram próximas. Öhgren *et al.* (2007) e Stenberg *et al.* (2000) aplicaram o processo SSF com *S. cerevisiae*, obtendo concentrações de etanol compreendidas entre 20 g/L e 25 g/L. Öhgren *et al.* (2007) realizaram ensaios SSF que atingiram concentrações de etanol de 20,5 g/L em 96 h a partir de palha demilho pré-tratada e Stenberg *et al.* (2000) utilizaram aparas de abeto (*Picea abie*) e produziram 25 g/L de etanol em 96 h.

4.3.3 Avaliação da agitação e da taxa de oxigenação

A fim de avaliar a influência do nível de oxigênio no processo SSF foram realizados ensaios SSF em balões de Erlenmeyer de 500 mL com o mesmo volume de reação (100 mL) com lama primária não tratada. A área da superfície livre no balão de Erlenmeyer de 500 mL era 87 cm² (volume de reação de 100 mL), cerca de 40% maior que a área de superfície livre no balão de Erlenmeyer de 250 mL (volume de reação de 100 mL).

Tendo em conta que a oxigenação se dá por difusão superficial do ar que passa através da rolha de algodão, quanto maior a área de superfície livre maior será a sua oxigenação. Observou-se durante estes ensaios que houve uma melhor agitação do meio de reação heterogêneo, proporcionando também uma maior oxigenação.

De seguida apresentam-se os resultados obtidos da sacarificação e fermentação em simultâneo de cargas iniciais de 50 g/L hidratos de carbono da lama primária não tratada, em regime descontínuo e semi-descontínuo em balões de 500 mL (volume de cultura de 100 mL). No processo semi-descontínuo, foram feitas mais adições de matéria-prima, além da carga inicial, às 24, 48 e 72 h de reação. O perfil da concentração de açúcares e de etanol encontra-se representado na **Figura 27**.

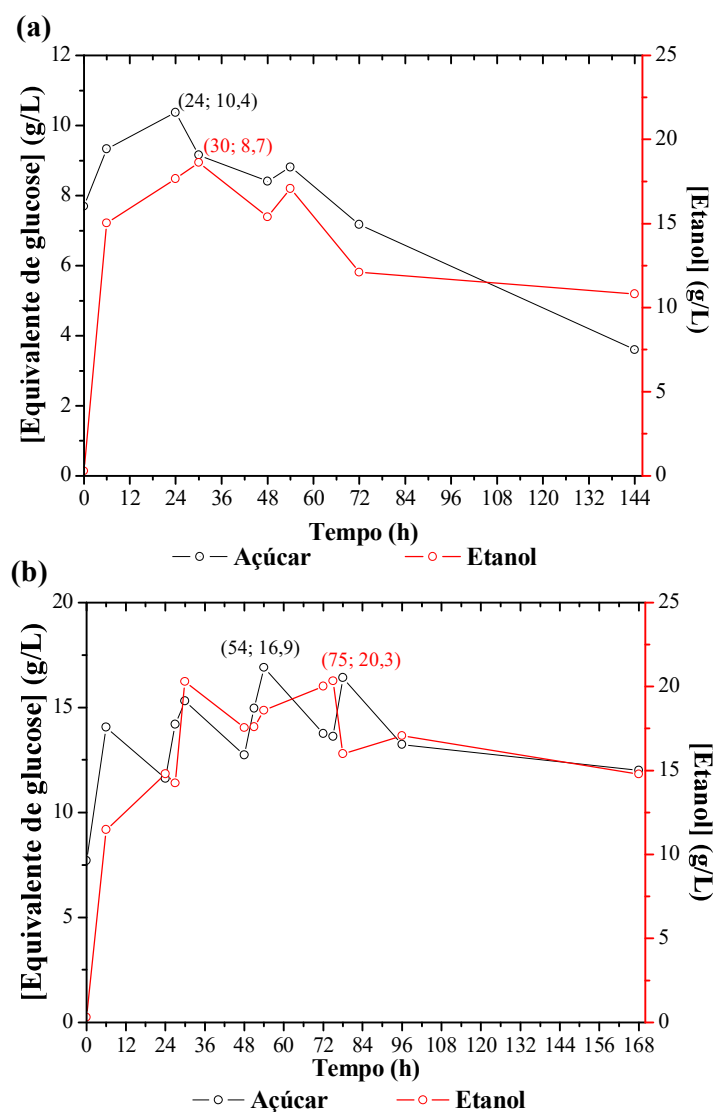


Figura 27 - Evolução da concentração dos açúcares e etanol dos ensaios SSF realizados em balões de 500 mL utilizando lama primária (50 g/L de HC) com a *S. cerevisiae* em (a) regime descontínuo e (b) regime semi-descontínuo.

Na **Figura 27 (a)**, a concentração máxima de açúcar foi de 10,4 g/L e a concentração máxima de etanol foi de 18,7 g/L, correspondendo a um rendimento de 65 % e a uma velocidade de produção de 0,62 g/ (L h) em 30 h. Na **Figura 27 (b)**, a concentração máxima de açúcar foi de 16,9 g/L e a concentração máxima de etanol foi de 20,3 g/L, correspondendo a um rendimento de 17,6 % e a uma velocidade de produção de 0,27g/(L h) em 75 h. Estes resultados, comparados aos resultados dos ensaios conduzidos no balão de 250 mL, foram relativamente inferiores. Percebe-se que o metabolismo fermentativo não foi preferível pela levedura, pois, provavelmente o aumento na taxa de transferência de oxigênio conduziu ao

Resultados e discussão

aumento de biomassa e à aceleração da taxa de crescimento, predominando o metabolismo oxidativo, em detrimento da produção de etanol.

4.4 Ensaio SSF com *K. marxianus* NCYC 1426

Foram realizados diversos ensaios de SSF com a *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 (38°C ou 42°C), em regime descontínuo ou semi-descontínuo. Como fonte de carbono utilizou-se a fração de hidratos de carbono da pasta crua e da lama primária (não tratada ou pré-tratada com HCl), com concentrações iniciais de 25 ou 50 g/L. O conjunto de ensaios realizados com a *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426 encontra-se esquematizado na **Figura 28**.

Descontínuo		Semi-descontínuo	
Pasta crua 38 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L	Pasta crua 38 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L
Lama primária 38 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L	Lama primária 38 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L
Lama primária (pré-tratada) 38 °C	• [HC] = 25g/L	Lama primária (pré-tratada) 38 °C	• [HC] = 25g/L
Pasta crua 42 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L	Pasta crua 42 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L
Lama primária 42 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L	Lama primária 42 °C	• [HC] = 25g/L • [HC] = 50g/L

Figura 28 - Conjunto de ensaios efetuados com a *K. marxianus* NCYC 1426.

4.4.1 Regime descontínuo (38°C)

Apresentam-se de seguida os resultados dos ensaios SSF em regime descontínuo a 38°C com 25g/L e 50 g/L de hidratos de carbono. A evolução das concentrações de açúcares e de etanol dos ensaios com 25 g/L e 50 g/L de hidratos de carbono encontram-se representadas nas **Figura 29** e **30**, respectivamente.

Resultados e discussão

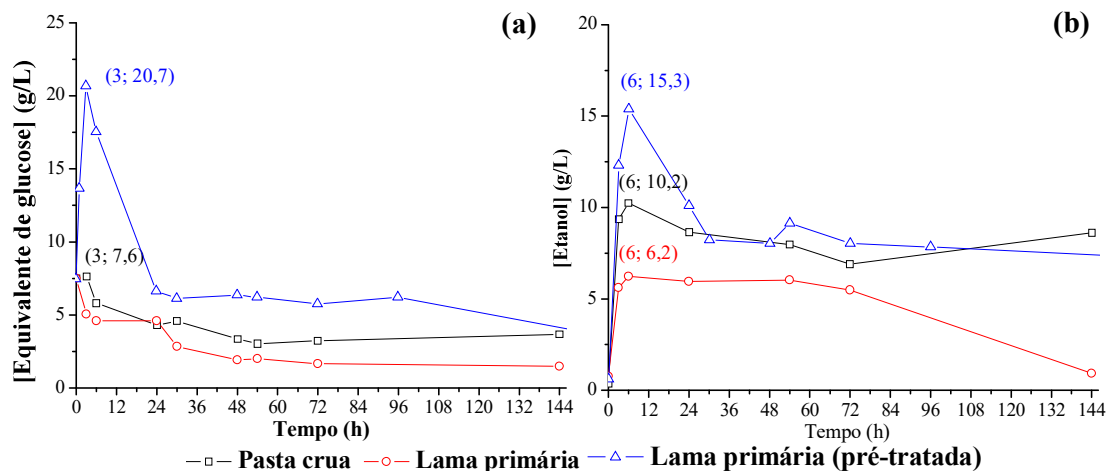


Figura 29 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada (25 g/L de HC) em regime descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C.

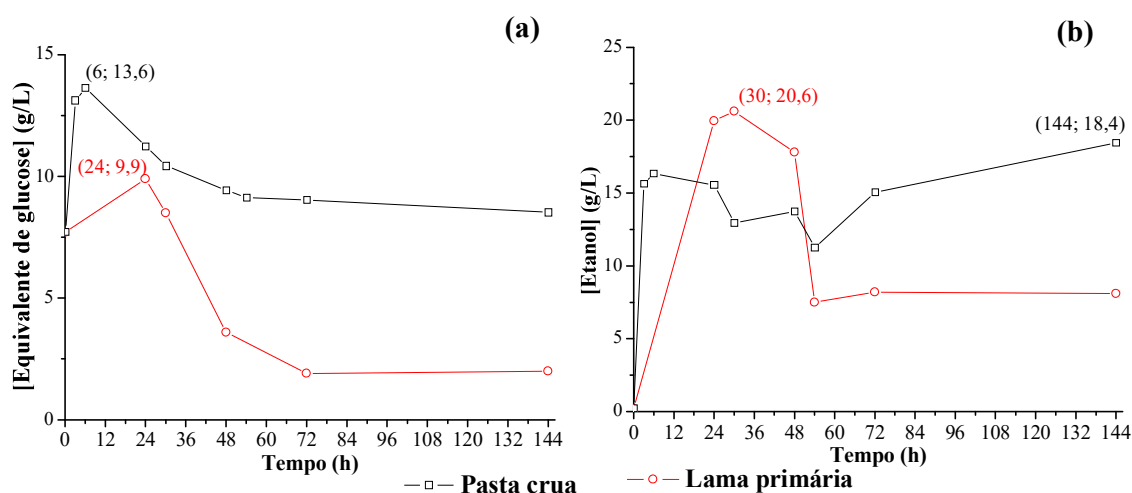


Figura 30 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com pasta crua, lama primária e lama primária pré-tratada (50 g/L de HC) em regime descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C.

Na **Figura 29 (b)** observa-se que a maior concentração de etanol obtida foi de 15,3 g/L em 6 h no ensaio da lama primária pré-tratada, 50% maior que a concentração máxima de etanol obtida no ensaio da pasta crua e 150% maior que a concentração máxima de etanol obtida no ensaio da lama primária. Os rendimentos de etanol e produtividade correspondentes às concentrações máximas de etanol dos ensaios com 25 g/L de hidratos de carbono foram > 99% e 2,55g/(L h) em 6 h (lama primária pré-tratada), 70% e 1,71 g/(L h) (pasta crua) e 39% e 1,4 g/(L h) (lama primária), respectivamente.

Resultados e discussão

Na **Figura 30 (b)** observa-se que a maior concentração de etanol obtida foi de 20,7 g/L em 30 h no ensaio da lama primária, 26% maior que a concentração máxima de etanol obtida no ensaio da pasta crua. Os rendimentos de etanol e produtividade correspondentes às concentrações máximas de etanol dos ensaios com 50 g/L de hidratos de carbono foram 58% e 0,064 g/(L h) para pasta crua e 73% e 0,69 g/(L h) para lama primária. Na **Tabela 14** observa-se os rendimentos em etanol e a produtividade em diferentes tempos.

Tabela 14 - Rendimento - R_{EtOH} (%) e produtividade - Prod. (g/(L h)) de etanol obtidos no SSF em descontínuo com 25 ou 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária (não tratada ou pré-tratada).

t (h)	Pasta crua				Lama primária				Lama pré-tratada	
	[HC] (g/L)				[HC] (g/L)				[HC] (g/L)	
	25		50		25		50		25	
	R_{EtOH} (%)	Prod. g/(L h)	R_{EtOH} (%)	Prod. g/(L h)	R_{EtOH} (%)	Prod. g/(L h)	R_{EtOH} (%)	Prod. g/(L h)	R_{EtOH} (%)	Prod. g/(L h)
6	70	1,71	58	2,73	38	1,04	-	-	> 99	2,55
24	58	0,36	55	0,65	36	0,25	70	0,83	59	0,36
30	40	0,20	46	0,43	-	-	73	0,69	43	0,20
48	49	0,15	48	0,29	35	0,12	63	0,37	49	0,15
54	54	0,15	40	0,21	37	0,11	26	0,14	59	0,16
72	46	0,10	53	0,21	33	0,08	31	0,12	59	0,12
144	58	0,06	65	0,13	1	0,01	29	0,06	48	0,07

Observa-se na **Tabela 14** que os ensaios com 25 g/L de hidratos de carbono apresentaram maiores rendimentos em 6 h e a partir deste tempo os rendimentos foram diminuindo devido ao possível consumo de etanol pela levedura. Nos ensaios com 50 g/L de hidratos de carbono, os rendimentos mais elevados foram atingidos após um maior tempo de fermentação.

O pH destes ensaios variou entre 5,2 - 4,2 para os da pasta crua e lama primária pré-tratada e 7,5 - 6,2 para os da lama primária, conforme a **Figura 31**. Em relação à formação dos ácidos orgânicos durante essas reações, constatou-se a produção de ácido acético. A concentração deste composto não ultrapassou 1,0 g/L nos ensaios com 25 g/L de hidratos de carbono e 2,0 g/L nos ensaios com 50 g/L de hidratos de carbono.

Resultados e discussão

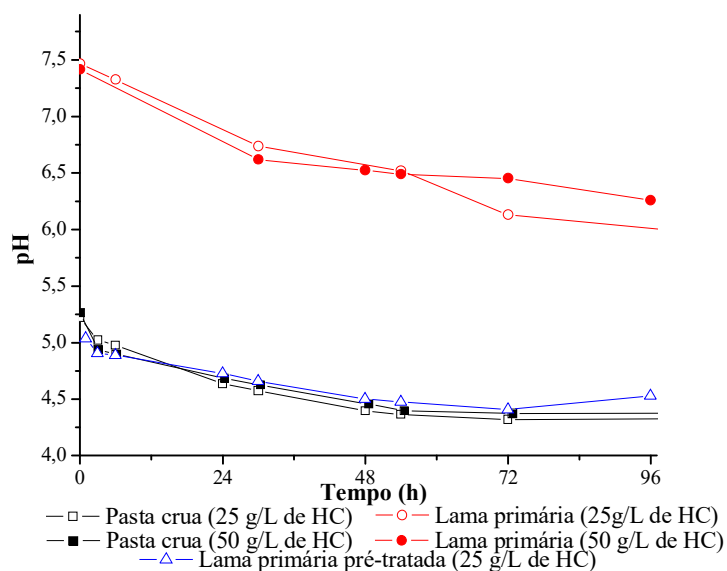


Figura 31 - Evolução do pH nos ensaios SSF da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) em regime descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C.

O sub-produto do tempo de retenção de 26,1 min apareceu em todos os ensaios. Foi observado através dos cromatogramas que este sub-produto geralmente aparecia a partir das 24 h e no decorrer do tempo a área do pico era incrementada. Na **Figura 32** estão dois cromatogramas do ensaio da lama primária (50 g/L de HC) nos tempos reacionais de 30 h e 96 h.

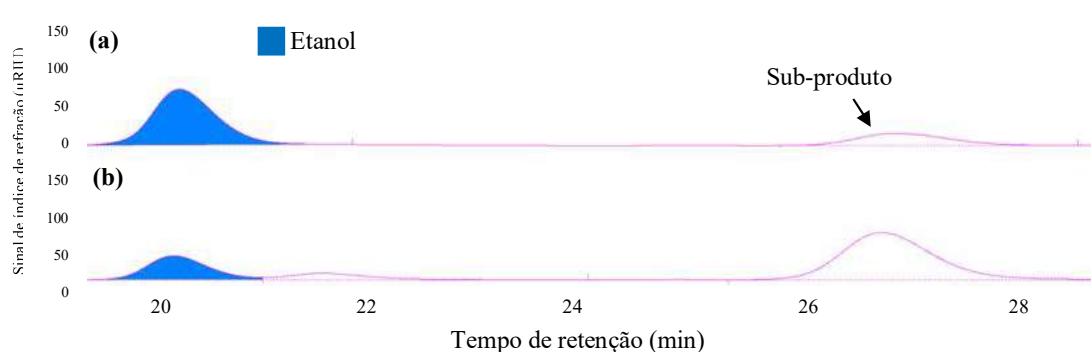


Figura 32 - Cromatogramas do ensaio da lama primária (50 g/L de HC) em regime descontínuo com *K. marxianus* NCYC 1426 em 30 h (a) e 96 h (b).

Resultados e discussão

4.4.2 Regime semi-descontínuo (38°C)

De seguida estão apresentados os resultados dos ensaios em regime semi-descontínuo com uma carga inicial de 25 g/L ou 50 g/L de hidratos de carbono, adicionando-se cargas iguais periodicamente, totalizando 100 g/L ou 200 g/L de hidratos de carbono disponibilizados do início ao fim das reações. A evolução de açúcares e etanol encontra-se representada na **Figura 33 e 34**.

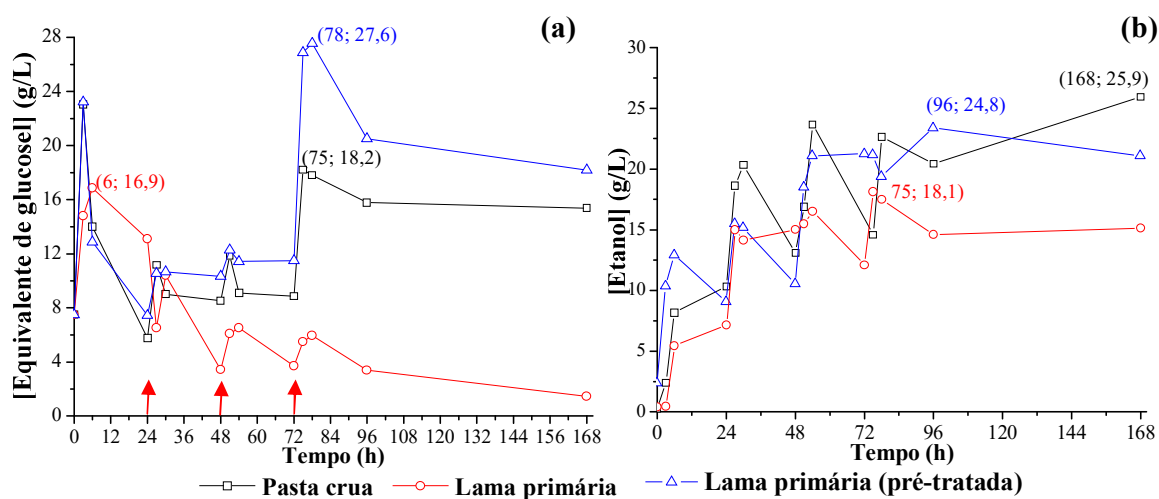


Figura 33 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaiosSSF com adições de 25 g/L de HC da pasta crua e lama primária (não tratada e pré-tratada) em regime semi-descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C.

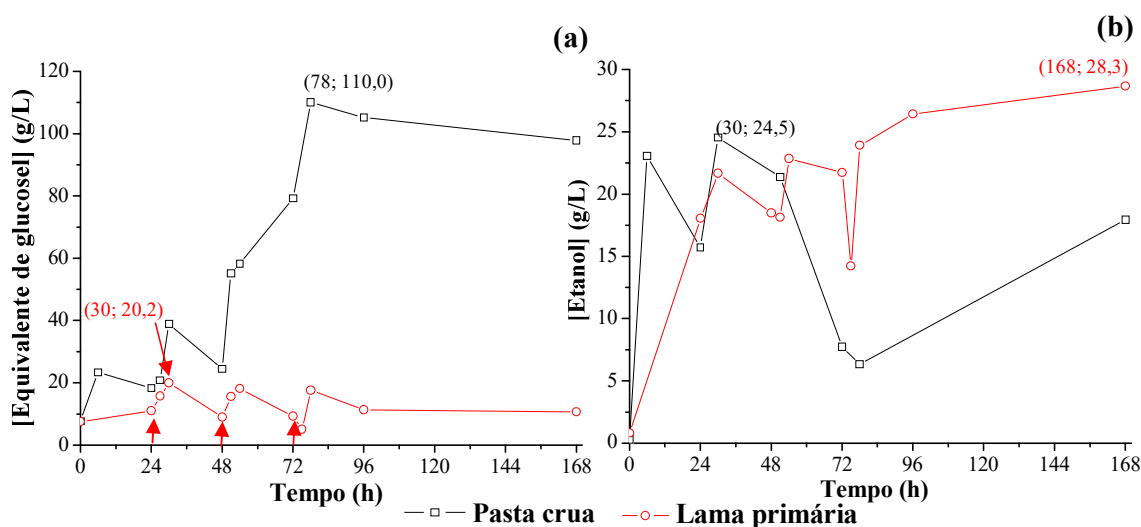


Figura 34 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaiosSSF com adições de 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária em regime semi-descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C.

Resultados e discussão

Na **Figura 33 (b)** observa-se que no ensaio da lama primária pré-tratada obteve-se uma concentração de etanol de 24,8 g/L em 96 h, correspondendo a um rendimento de 43% e uma produtividade de 0,26 g/(L h). A maior concentração de etanol obtida nestes ensaios foi de 25,9 g/L em 168 h para a pasta crua, cerca de 4% maior que a obtida no ensaio da lama primária pré-tratada. Porém, este tempo corresponde ao dobro do tempo reacional em que foi obtida a concentração máxima de etanol no ensaio da lama pré-tratada. Num processo a nível industrial, é de extrema importância levar em consideração o tempo reacional. Apesar do ensaio da pasta crua ter apresentado uma maior concentração de etanol, provavelmente não seria vantajoso em escala industrial prolongar tanto o tempo reacional.

Na **Figura 34 (a)** observa-se uma acumulação de açúcar no ensaio da pasta crua às 78 h e na **Figura 34 (b)** observa-se que a concentração de etanol decresce a partir das 30 h. Isto evidencia que não foi vantajoso realizar a segunda e a terceira adição de pasta crua. Sugere-se a verificação do nível de açúcar antes de adicionar a MPL. Caso este nível esteja elevado não se torna necessário adicionar mais MPL no momento da verificação, evitando assim o excesso de açúcar e eventual inibição da fermentação pelo substrato, assim como o possível "desperdício" de MPL. As quedas de concentrações de etanol observadas nas **Figuras 33 (b)** e **34 (b)** estão provavelmente associadas a diluição do meio reacional devido ao aumento no volume reacional após a hidrólise da matéria-prima lignocelulósica de cada adição realizada, e não necessariamente ao consumo de etanol, como foi suposto anteriormente nos ensaios em regime descontínuo, uma vez que os níveis de açúcar são aqui relativamente superiores.

O pH dos ensaios manteve valores compreendidos entre 5,0 - 4,7 (pasta crua), 5 - 4,5 (lama primária pré-tratada) e 7,8 - 6,2 (lama primária). Através dos cromatogramas, constatou-se que houve formação de ácido acético e do sub-produto da reação correspondente ao tempo de retenção 26,0 min. Na **Tabela 15** encontram-se as concentrações máximas de ácido acético detectadas nos ensaios em regime semi-descontínuo com *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C.

Tabela 15 - Concentrações máximas de ácido acético (regime semi-descontínuo a 38°C).

MPL	[HC] (g/L)	Tempo (h)	[Ácido acético] máximo (g/L)
Pasta crua	25	168	7
	50	78	11
Lama primária	25	75	4
	50	96	6
Lama primária pré-tratada	25	78	5

4.4.3 Regime descontínuo (42°C)

De seguida estão apresentados os resultados dos ensaios com a *K. marxianus* NCYC a 42°C em descontínuo com 25g/L ou 50 g/L de hidratos de carbono a cada adição, totalizando 100 g/L ou 200 g/L de hidratos de carbono disponibilizados do início ao fim das reações. A evolução de açúcares e etanol encontra-se representada na **Figura 35**.

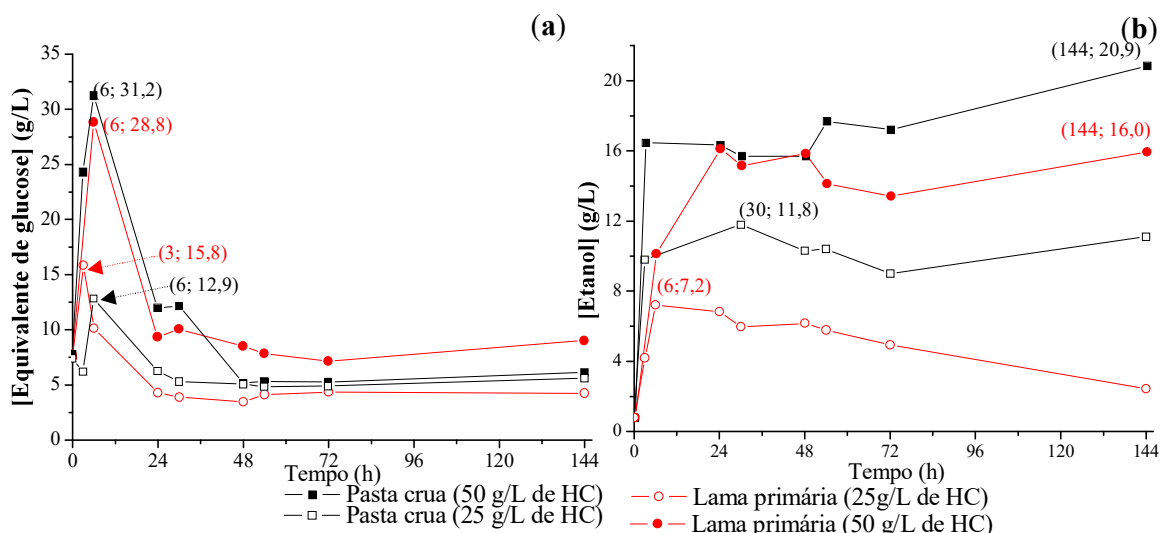


Figura 35 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaiosSSF com 25 ou 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária em regime descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 42°C.

Na **Figura 35(b)** observa-se que a maior concentração de etanol obtida foi de 20,9 g/L em 144 h no ensaio da pasta crua (50 g/L de HC), que corresponde a um rendimento de 71% e uma produtividade de 0,14 g/(L h). No ensaio da lama primária (50 g/L de hidratos de carbono) obteve-se 16 g/L de etanol em 144 h, cerca de 20% menor à obtida no ensaio da pasta crua, que corresponde a um rendimento de 53% e uma produtividade de 0,11 g/(L h).

O pH dos ensaios variou entre 5,1 - 4,4 (pasta crua - 25 g/L de HC), 5,1 - 4,6 (pasta crua - 50 g/L de HC) e 7,3 - 6,2 (lama primária). Em relação ao ácido acético, foi observada a formação deste, porém em baixas concentrações. Nos ensaios da pasta crua e lama primária com 25 g/L de HC, a concentração de ácido acético não ultrapassou 1,0 g/L. Nos ensaios da pasta crua e lama primária com 50 g/L de HC, a concentração de ácido acético não ultrapassou 2,0 g/L. Houve também o aparecimento do sub-produto em 26,1 min.

4.4.4 Regime semi-descontínuo (42°C)

De seguinte estão apresentados os resultados dos ensaios com a *K. marxianus* NCYC a 42°C em semi-descontínuo com 25g/L ou 50 g/L de hidratos de carbono a cada adição, totalizando 100 g/L ou 200 g/L de hidratos de carbono disponibilizados do início ao fim das reações. A evolução de açúcares e etanol encontra-se representada na **Figura 36**.

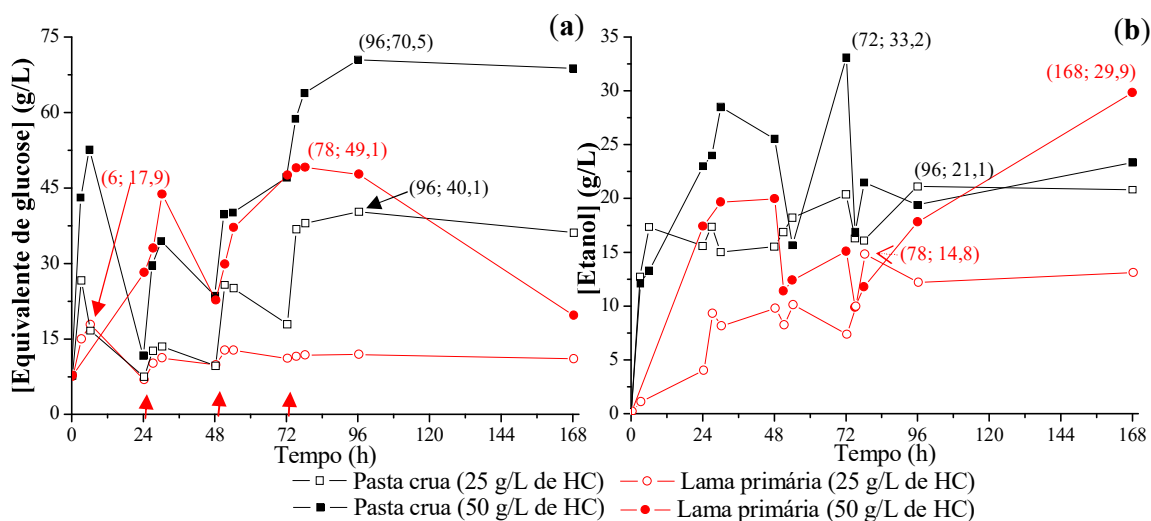


Figura 36 - Evolução da concentração dos (a) açúcares e do (b) etanol nos ensaios SSF com 25 ou 50 g/L de HC da pasta crua e lama primária em regime semi-descontínuo com a *K. marxianus* NCYC 1426 a 42°C.

Na **Figura 36 (a)** observa-se que após a realização da última adição de MPL, os níveis de açúcar nos ensaios da pasta crua mantiveram-se altos. Os níveis de açúcar às 168 h eram de 68,8 g/L no ensaio da pasta crua (50 g/L de HC) e 36,0 g/L no ensaio da pasta crua (25 g/L de HC). Na **Figura 36 (b)** a maior concentração de etanol observada é de 33,2 g/L em 72 h no ensaio da pasta crua (50 g/L de HC), que corresponde a um rendimento de 39% e uma produtividade de 0,46 g/(L h). No entanto, percebe-se que esta concentração está muito diferente das demais e consiste em um ponto anômalo do perfil de concentração. A fim de verificar este valor de concentração, sugere-se que o ensaio SSF com pasta crua (50 g/L de HC) seja repetido.

Os valores de pH dos ensaios variaram entre 4,9 - 4,5 (pasta crua - 25 g/L de HC), 5,0 - 4,6 (pasta crua - 50 g/L de HC), 7,9 - 6,2 (lama primária - 25 g/L de HC) e 7,5 - 5,8 (lama primária - 50 g/L de HC). Através dos cromatogramas, constatou-se que nestes ensaios houve formação de ácido acético e do sub-produto com tempo de retenção de 26,1 min. Na **Tabela 16** encontra-se as concentrações máximas de ácido acético obtidas nestes ensaios.

Resultados e discussão

Tabela 16 - Concentrações máximas de ácido acético (regime semi-descontínuo a 38°C).

MPL	[HC] (g/L)	Tempo (h)	[Ácido acético] _{máximo} (g/L)
Pasta crua	25	75	5
	50	75	10
Lama primária	25	78	7
	50	168	5

De seguida serão apresentados de forma resumida as concentrações máximas de etanol obtidas nos ensaios SSF com a *K. marxianus* NCYC 1426 apresentadas anteriormente. A **Tabela 17** reúne os principais resultados dos ensaios SSF com *K. marxianus* NCYC 1426.

Tabela 17 - Quadro resumo dos principais resultados dos ensaios SSF com *K. marxianus* NCYC 1426 realizados neste trabalho.

T (°C)	Regime	MPL	[HC](g/L)	t _{ótimo} (h)	CME(g/L)	R _{EiOH} (%)	Prod.(g(Lh))
38	Descontínuo	Pasta crua	25	6	10,2	70	1,71
			50	144	18,4	65	0,13
		Lama primária	25	6	6,2	39	1,04
			50	30	20,7	73	0,69
	Semi - descontínuo	Pasta crua	25	6	15,3	> 99	5,12
			100	168	25,9	45	0,15
		200	30	24,5	80	3,84	
		Lama primária	100	75	18,1	31	0,24
			200	168	28,3	25	0,17
		Lama primária (pré-tratada)	100	96	24,8	43	0,26
42	Descontínuo	Pasta crua	25	30	11,8	78	0,39
			50	144	20,9	71	0,15
		Lama primária	25	6	7,2	45	1,21
			50	24	16,1	54	0,67
	Semi - descontínuo	Pasta crua	100	96	21,1	37	0,22
			200	72	33,2	29	0,46
		Lama primária	100	78	14,8	26	0,19
			200	168	29,9	26	0,18

T: Temperatura (°C); MPL: matéria-prima lignocelulósica; [HC]: hidratos de carbono; CME: concentração máxima de etanol; t_{ótimo}: tempo (h) correspondente à concentração máxima de etanol R_{EiOH}: rendimento em etanol; Prod.: produtividade em etanol.

Observa-se na **Tabela 17** que para as mesmas condições de operação (regime, temperatura e concentração de hidratos de carbono), com exceção do tipo de matéria-prima empregada no processo, há diferenças significativas entre as concentrações de etanol obtidas. Por exemplo, em regime descontínuo com 25 g/L de hidratos de carbono a 38°C, os ensaios SSF com lama primária, lama primária pré-tratada e pasta crua obtiveram concentrações de etanol de 6,2 g/L, 15,3 g/L e 10,2 g/L, respectivamente. Nos ensaios realizados por Kádár *et al.* (2004) (**Tabela 18**), observa-se que no ensaio com lama primária a concentração máxima de etanol foi de 8,8 g/L em 72 h, enquanto com celulose em pó (Solka-Floc®) foi de 17,8 g/L

Resultados e discussão

em 72 h. Os resultados anteriormente discutidos indicam que os rendimentos de etanol dependem do tipo de matéria-prima lignocelulósica empregada no processo SSF.

Quando se comparam as concentrações máximas obtidas nos ensaios a 38°C com as obtidas nos ensaios a 42°C, observa-se que foram semelhantes, e por vezes até superiores nos ensaios a 42°C. Isto é vantajoso, pois a atividade do extrato enzimático é mais alta para temperaturas superiores, necessitando assim, para a mesma performance um menor volume de extrato enzimático ou um menor tempo para a hidrólise. Além disso, usar uma levedura termotolerante a 42°C contribui para evitar uma das principais desvantagens do SSF, que é o risco de contaminação e permite também trabalhar em condições não-estéreis, que é muito favorável para uma possível ampliação do processo.

Os resultados obtidos neste trabalho quando comparados com os da literatura mostram-se promissores. Como se observa na **Tabela 18**, Ballesteros *et al.* (2004) realizaram ensaios SSF a 42°C com diferentes matérias-primas lignocelulósicas pré-tratadas com concentrações de hidratos de carbono entre 49 e 57 g/L e obtiveram concentrações máximas de etanol entre 16 e 19 g/L. Neste trabalho, o ensaio SSF da lama primária não tratada a 42°C com 50 g/L de hidratos de carbono em regime descontínuo resultou numa concentração máxima de etanol de 16 g/L em 24 h. Isto é vantajoso, pois para atingir uma concentração de etanol semelhante às obtidas por Ballesteros *et al.* (2004), não foi necessário pré-tratamento da lama primária.

A **Tabela 18** apresenta as concentrações máximas de etanol obtidas em ensaios SSF realizados por Kádár *et al.* (2004), Ballesteros *et al.* (2004), Bollók *et al.* (2000), Faga *et al.* (2010), Suryawati *et al.* (2008) e Tomás-Pejó *et al.* (2009) com estirpes da *K. marxianus*. Os valores de [HC] encontrados na **Tabela 18** foram estimados a partir das informações encontradas nos respectivos trabalhos e levou-se em consideração a fração da celulose e também da hemicelulose. Os rendimentos de etanol (R_{EtOH}) foram calculados a partir da **Equação 1** e as produtividades (Prod.) foram avaliadas pela **Equação 2**, estas equações foram apresentadas no capítulo "Materiais e Métodos".

Tabela 18- Concentração máxima de etanol dos ensaios SSF encontrados na literatura.

MPL	Pré-tratamento	Estirpe	T (°C)	Enzima	Carga enzimática	[HC] (g/L)	CME (g/L)	t _{ótimo} (h)	R _{EtoH} (%)	Prod. g/(L.h)	Fonte
Papelão velho ondulado lama da indústria de papel	Não	<i>K. marxianus</i> Y01070	40	Celulase Celluclast® 1.5 L + β-glucosidase Novozym® 188	15 FPU/g de HC + 15 UI/g de HC	60	14,1	72	41	0,19	Kádár et al. (2004)
							8,8	72	26	0,12	
							17,8	72	52	0,25	
Celulose em pó <i>Populus nigra</i> <i>Eucalyptus globulus</i> Palha de trigo Bagaço de sorgo doce Resíduo de <i>B. Carinata</i>	Explosão a vapor	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42	Celulase Celluclast® 1.5 L	15 FPU/g de HC	50 52 57 49 54	19,0	72	67	0,26	Ballesteros et al. (2004)
							17,0	160	58	0,11	
							18,0	160	56	0,11	
							16,0	160	57	0,10	
							19,0	96	62	0,20	
Aparas de <i>Picea abies</i>	Impregnamento com SO ₂	<i>K. marxianus</i> Y00243 <i>K. marxianus</i> Y00242 <i>K. marxianus</i> Y01070	42	Celulase Celluclast® 2 L + β-glucosidase Novozym® 188	37 FPU/g de HC + 38 IU/g	25 25 25	6,3	8	44	0,79	Bollók et al. (2000)
							3,7	3	26	1,23	
							4,9	6	35	0,82	
<i>Panicum virgatum</i>	Hidrotermólise	<i>K. marxianus</i> IMB3 <i>K. marxianus</i> IMB4	45 37 41	Celulase Fibrilase®	15 FPU/g de HC	44 41	19,43	162	77	0,12	Faga et al. (2010) Suryawati et al. (2008)
							12,3	72	53	0,17	
							14,8	72	64	0,21	
Celulose cristalina (SIGMA®)	Não	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42	Celulase Celluclast® 1.5 L	15 FPU/g de HC	50 100 150	15,0	72	53	0,21	Tomás-Pejó et al. (2009)
							33,0	72	58	0,46	
							42,0	72	49	0,58	

T: temperatura (°C); MPL: matéria-prima lignocelulósica; [HC]: hidratos de carbono; CME: concentração máxima de etanol; t_{ótimo}: tempo (h) correspondente à concentração máxima de etanol; R_{EtoH}: rendimento em etanol; Prod.: produtividade em etanol.

Resultados e discussão

Um dos objetivos específicos estabelecido inicialmente é comparar o desempenho da estirpe termotolerante *K. marxianus* com a levedura comercial *S. cerevisiae* (não termotolerante) para a produção de bioetanol. De seguida nas **Figuras 37** e **38** é possível visualizar as diferenças entre as concentrações de etanol obtidas nos ensaios com a *S. cerevisiae* com a *K. marxianus* a 38°C e as diferenças entre as concentrações de etanol obtidas nos ensaios com a *S. cerevisiae* a 38°C e com a *K. marxianus* a 42°C.

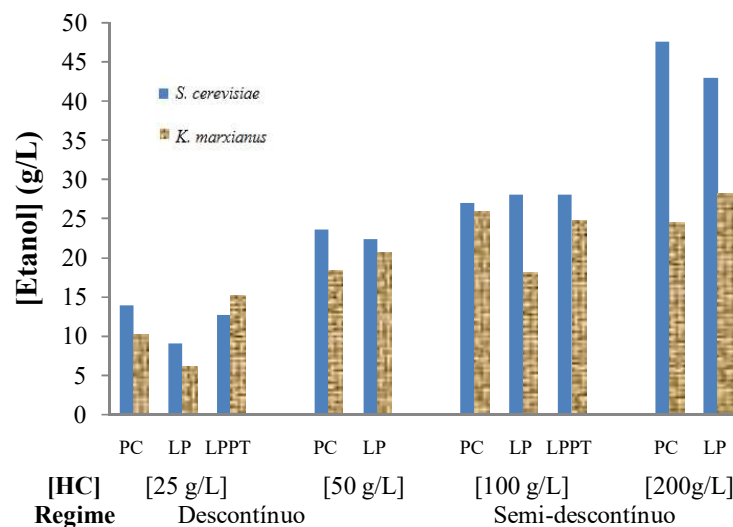


Figura 37 - Comparação entre as concentrações máximas de etanol obtidas pelas estirpes *S. cerevisiae* (comercial) a 38°C e *K. marxianus* NCYC 1426 a 38°C. PC: pasta crua; LP: lama primária; LPPT: lama primária pré-tratada.

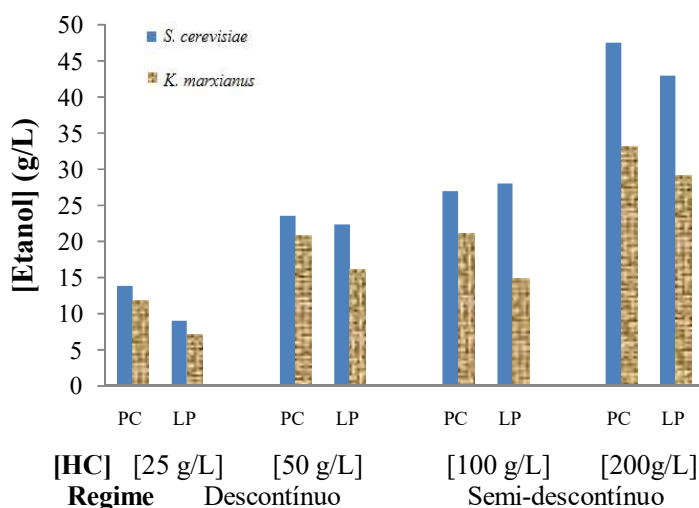


Figura 38 - Comparação entre as concentrações máximas de etanol obtidas pelas estirpes *S. cerevisiae* (comercial) a 38°C e *K. marxianus* NCYC 1426 a 42°C. PC: pasta crua; LP: lama primária.

Os resultados mostram que a *K. marxianus* foi melhor do que a *S. cerevisiae* apenas no ensaio SSF utilizando a lama primária pré-tratada (25 g/L de HC) em descontinuo a 38°C.

Resultados e discussão

Nos demais ensaios SSF, a *S. cerevisiae* apresentou uma melhor performance na obtenção de bioetanol. Mediante os resultados observados, sugere-se a realização de ensaios SSF com a lama primária pré-tratada em concentrações maiores de HC e um estudo com a estirpe *K. marxianus* NCYC 1426 utilizando substratos mais simples a fim de determinar as suas melhores condições de fermentação.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

Este trabalho teve como principal objetivo valorizar resíduos lignocelulósicos, neste caso lamas primárias provenientes da indústria de pasta papelreira, usando-os como matéria-prima para a produção de bioetanol por Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF). Para atingir este fim foi necessário cumprir os seguintes objetivos específicos:

✓ Seleção de uma estirpe termotolerante da espécie *Kluyveromyces marxianus* para aplicação do processo SSF. A estirpe selecionada foi a *Kluyveromyces marxianus* termotolerante NCYC 1426, pois possui aplicações adequadas ao objetivo deste trabalho, em particular a degradação de glucose, a produção de etanol, para além de suportar temperaturas até 42°C;

✓ Avaliação do crescimento das estirpes a diferentes temperaturas. A ideia é avaliar a temperatura máxima que as leveduras suportam, no sentido de aproximar tanto quanto possível da temperatura óptima da reacção enzimática para implementação do processo SSF. O crescimento celular das estirpes *K. marxianus* NCYC 1426 e *S. cerevisiae* (comercial) foi avaliado a 30, 38 e 42°C. Usando como parâmetros de comparação a taxa específica de crescimento (μ) e a densidade ótica na fase estacionária, foi possível determinar quais as temperaturas a serem aplicadas no processo SSF. Optou-se por utilizar a temperatura de 38°C nos ensaios SSF para *S. cerevisiae* (comercial) e as temperaturas de 38 e 42°C para *K. marxianus* NCYC 1426;

✓ Avaliar e comparar o potencial da lama primária e da pasta crua como matéria-prima para a fermentação. A lama primária mostrou-se, em geral, uma matéria-prima lignocelulósica promissora quando comparada com a pasta crua (usada como referência);

✓ Comparar o potencial da lama primária não tratada com o da lama pré-tratada. As lamas primárias foram submetidas à SSF em duas maneiras, com e sem neutralização ácida. Os ensaios SSF da lama primária pré-tratada deram origem a maiores concentrações de etanol quando comparados com os ensaios da lama primária não tratada nas mesmas condições;

✓ Avaliar a influência da concentração de hidratos de carbono. Foram avaliadas duas concentrações de hidratos de carbono, 25 g/L e 50 g/L e percebeu-se que estão diretamente relacionadas com a produção de etanol. Em geral, os ensaios com maiores concentrações de hidratos de carbono conduziram a maiores concentrações de etanol;

✓ Avaliar dois tipos de regimes (descontínuo e semi-descontínuo) de alimentação da matéria-prima. O regime semi-descontínuo apresentou várias vantagens, como maior

Conclusões e sugestões de trabalho futuro

economia de extrato enzimático, menor consistência inicial do meio reacional e maiores concentrações de etanol. Apesar das vantagens da alimentação incremental de matéria-prima ao biorreator, observou-se que alguns ensaios apresentaram uma sobrecarga de nutrientes, o que leva ao seu desperdício, tal como foi evidenciado no ensaio da pasta crua (50 g/L) com a estirpe *K. marxianus* a 38°C. Para evitar este desperdício (e diminuição do rendimento de conversão associado), sugere-se que a adição de matéria-prima seja feita apenas quando os níveis de açúcares fermentáveis estiverem baixos;

✓ Avaliar a influência do nível de oxigenação. Foram realizados ensaios SSF com a *S. cerevisiae* em balões de Erlenmeyer de diferentes tamanhos mas com o mesmo volume de mistura reagente. O metabolismo fermentativo da levedura não foi favorecido por uma oxigenação mais facilitada;

✓ Comparar o desempenho da *K. marxianus* nas temperaturas de 38 e 42°C. Quando se comparam as concentrações máximas de etanol obtidas nos ensaios a 38°C com as obtidas nos ensaios a 42°C, observa-se que foram semelhantes, e por vezes até superiores nos ensaios a 42°C. Isto é vantajoso, pois a atividade do extrato enzimático é mais elevada para temperaturas superiores, atingindo-se o mesmo desempenho com um menor volume de extrato enzimático e/ou um menor tempo de hidrólise, o que facilita a cinética global do processo;

✓ Comparar a performance das estirpes. Os resultados mostraram que a estirpe termotolerante *K. marxianus* NCYC 1426 foi melhor do que a *S. cerevisiae* (comercial) apenas no ensaio da lama primária pré-tratada (25 g/L de HC) em descontínuo a 38°C. Nos demais ensaios SSF, a *S. cerevisiae* (comercial) apresentou um melhor desempenho na produção de bioetanol.

O trabalho experimental realizado confirmou que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados. Verificou-se que é possível valorizar a fração orgânica das lamas primárias da indústria da pasta papelreira num processo integrado de hidrólise enzimática e fermentação, mesmo sem qualquer pré-tratamento das lamas, e com produção de etanol superior à que tradicionalmente tem sido obtida numa sequência de três etapas reacionais distintas. A expectativa de um balanço económico favorável torna-se agora superior.

No entanto, constata-se que haveria ainda mais a investigar. De seguida são apresentadas algumas sugestões de trabalho futuro:

✓ Realizar ensaios SSF com lama primária pré-tratada com maiores concentrações de hidratos de carbono;

Conclusões e sugestões de trabalho futuro

- ✓ Avaliar o uso de outros resíduos agro-industriais, assim como a mistura com lamas primárias;
- ✓ Realizar o balanço mássico das reações SSF;
- ✓ Realizar o aumento de tamanho do biorreator para uma escala piloto;
- ✓ Fazer uma estimativa económica do processo para verificar a viabilidade em maior escala.

6. REFERÊNCIAS

Abdel-Fattah, W. R.; Fadil, M.; Nigam, P.; Banat, I. M. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, (2000) 531-535.

Alfani, F.; Gallifuoco, A.; Saporosi, A; Spera, A; Cantarella, M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25, (2000) 184-192.

Alkasrawi, M.; Rudolf, A.; Lidén, G.; Zacchi, G. Influence of strain and cultivation procedure on the performance of simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, (2006) 279-286.

Ask, M.; Olofsson, K.; Felice, T. D.; Ruohonen, L.; Penttilä, M.; Lidén, G.; Olsson, L. Challenges in the enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 47 (2012) 1452-1459.

Atkinson, B. (1983). Biochemical engineering and biotechnology handbook. Nature Press. 1119 p.

Babiker, M. A.; Abdel-Banat; Hisashi Hoshida; Akihiko Ano; Sanom Nonklang; Rinji Akada. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, (2010) 861–867.

Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Cabanas, A.; Carrasco, J.; Martín, C.; M. J. Negro, M. J.; Saez, F.; Saez, R. Selection of Thermotolerant Yeasts for Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Cellulose to Ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28/29, (1991) 307-315.

Ballesteros, M.; Oliva, J.M.; Negro, M.J.; Manzanares, P.; Ballesteros, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a Simultaneous Saccharification and Fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39, (2004) 1843-1848.

Boze, H.; Moulin, G.; Galzy, P. Production of Food and Fodder Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, (1992) 65-86.

BP Statistical Review of World Energy June 2013. Disponível em: <bp.com/statisticalreview>. Acesso em Junho de 2013.

Brethauer, S.; Wyman, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 101, (2010) 4862-4874.

Carvalho, M. G. V. S. Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas da pasta Kraft de *Eucalyptus Globulus*. (Tese de doutoramento) Universidade de Coimbra. Coimbra, 1999.

Referências

- Celpa, "Associação da indústria papelreira: boletim estatístico" (2011) Disponível em <<http://www.celpa.pt/FileGet.aspx?FileId=4413>>.
- Chen, H.; Han, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*, 43, (2008) 1462-1466.
- CSB - Centaalbureau voor Schimmelcultures, culture collection database. Disponível: <<http://www.cbs.knaw.nl/databases/>>. Acesso em Fevereiro de 2013.
- Demain, A. L. Biosolutions to the energy problem - Review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, (2009) 319-332.
- Directiva 2003/30/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, 8 de Maio de 2003. Promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes.
- Directiva 2009/28/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, 23 de Abril de 2009. Promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis.
- Duff, S. J. B.; Murray, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55 (1996) 1-33.
- Eklund, R.; Zacchi, G. Simultaneous Saccharification and Fermentation of steam-pretreated willow. *Enzyme Microbial Technology*, 17 (1995) 255-259.
- Esterbauer, H, Steiner W, Labudova I, Hermann A, Hayn M. Production of *Trichoderma* cellulase in Laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36, (1991) 51-65.
- Eurostat (2013). Share of renewable energy in gross final energy consumption. Disponível em: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/tgm/table.do?tab=table&init=1&plugin=1&language=en&pcode=t2020_31>. Acesso em Março de 2013.
- Fan, Z.; South, C.; Munsie, K. L. J.; Walsum, P.; Lynd, L. R. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, (2003) 93-101.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of food and agriculture. 2008, p 128.
- Fernando, S.; Adhikari, S.; Chandrapal, C.; Murali, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy & Fuels*, 20, (2006) 1727-1737.
- Ferreira, V.; Faber, M. O.; Mesquita, S. S.; Pereira, N. J. Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. *Journal of Biotechnology*, 13, (2010) 2.
- Fitzpatrick, M.; Champagne, P.; Cunningham, M. F.; Whitney, R. A. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101, (2010) 8915-8922.
- Fonseca, G. G.; Heinzle, E.; Wittmann, C.; Gombert, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, (2008) 339-354.

Referências

- Galbe, M.; Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, (2002) 618-628.
- Gupta, R.; Shama, K. K.; Kuhad, R. C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* - NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100, (2009) 1214 – 1220.
- Hägerdal, B. H.; Galbe, M.; Grauslund, M. F. G.; Lidén, G.; Zacchi, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today - Review. *Trends in Biotechnology*, 24, (2006) 549-556.
- Hong, J.; Wang, Y.; Kumagai, H.; Tamaki, H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal Biotechnology*, 130,(2007) 114-23.
- Kádár, Z.; Szengyel, Z.; Réczey, K. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20, (2004) 103-110.
- Kamm, B.; Kamm, M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, (2004) 137–145.
- Kang, L.; Wang, W.; Lee, Y. Y. Bioconversion of Kraft Paper Mill Sludges to Ethanol by SSF and SSCF. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 161, (2010) 53-66.
- Krishna, S. H.; Reddy, T. J.; Chowdary, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 77, (2001) 193-196.
- Lane, M. M.; Morrissey, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24, (2010) 17-26.
- Li, H.; Kim, N. J.; Jiang, M.; Kang, J. W.; Chang, H. N. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid–acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 100, (2009) 3245-3251.
- Li, X., Li, Z., Zheng, J., Shi, Z., Li, L., Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using cassava as substrate, *Bioresource Technology* (2012), em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.056>>.
- Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Zyl, W. H.; Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Journals.ASM.org*, 66, (2002) 506-577.
- 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*, 32, (2008) 400-406.
- Matos, C.; Oliveira, A. C.; Silva, L.; Lukasik-Bogel, R.; Gírio, F. Sustentabilidade de biocombustíveis: Implementação Nacional da Estratégia Europeia. Laboratório Nacional de Energia e Geologia, 2010.
- Mckendry, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass - Review. *Bioresource Technology*, 83, (2002) 37-46.

Referências

Mendes, C.T.V.; Rocha, J. M. S.; Carvalho, M. G. V. S. Primary sludge from pulp and paper mill as a potencial raw-material to produce value-added products. In Proceedings of the ABTCP 2012 + VII CIADICYP, The 45th ABTCP Internacional Pulp and Paper Congress and VII Ibero American Congress on Pulp and Paper Research, 9-11 October, 2012, São Paulo, Brasil.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, 31, (1959) 426-428.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96 (2005) 673-686.

National Collection of Yeast Cultures (NCYC). Disponível em: <<http://www.ncyc.co.uk/>>, consultado em 09/10/2012.

National Renewable Energy Laboratory (NREL). Conceptual biorefinery. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acesso em: 04/06/2013.

Nieves, R.A.; Ehrman, C. I.; Adney, W.S.; Elander, R.T.; Himmel, M.E. Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, (1998) 301- 304.

Nikolic, S.; Mojovic, L.; Rakin, M.; Pejin, D.; Pejin, J. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chemistry*, 122, (2010) 216-222.

Nonklang, S.; Abdel-Banat, B. M.; Cha-Aim, K.; Moonjai, N.; Hoshida, H.; Limtong, S.; Yamada, M.; Akada, R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2008) 7514-21.

NREL-LAP 001. Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 001. National Renewable Energy Laboratory. (1994) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

NREL-LAP 003. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 003. National Renewable Energy Laboratory. (1995) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

NREL- LAP 004. Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure 004. National Renewable Energy Laboratory. (1996) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

NREL-LAP 005. Standart method for ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure 003. National Renewable Energy Laboratory. (1994) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

NREL-LAP 006. Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure 006. National Renewable Energy Laboratory. (1996) Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

Referências

NREL-LAP 008. SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. Laboratory Analytical Procedure 008. National Renewable Energy Laboratory. (1995) 14 p. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

NREL-LAP 015. HPLC Analysis of Liquid Fractions of Process Samples for Byproducts and Degradation Products. National Renewable Energy Laboratory. (1996) 9 p. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>.

Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Química Nova*, 33 (2010) 1549-1558.

Ohara, H. Biorefinery (mini-review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, (2003) 474-477.

Ohgren, K.; Bengtsson, O.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Galbe, M.; Hahn-Hagerdal, B.; Zacchi, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, 126, (2006) 488-498.

Olsson, L.; Soerenden, H.R.; Dam, B.P.; Christensen, H.; Krogh, K.M.; Meyer, A.S. (2006). Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129-132 (2006) 117-129.

Park, I.; Kim, I.; Kang, K.; Sohn, H.; Rhee, I.; Jin, I.; Jang, H. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *Process Biochemistry*, 45, (2010) 487-492.

Pereira, N. J.; Couto, M.A.P.G.; Santa Anna, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, *Amiga Digital UFRJ*, Rio de Janeiro, 2 (2008) 45 p.

Qureshi, N., Ezeji, T.C. Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2, (2008) 319-330.

Rudolf, A.; Alkasrawi, M.; Zacchi, G. Lidén, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, (2005) 195-204.

Sánchez, O. J.; Cardona, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99, (2008) 5270-5295.

Sassner, P.; Galbe, M.; Zacchi, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, (2006) 756-762.

Shao, X.; Jin, M.; Guseva, A.; Liu, C.; Balan, V.; Higsett, D.; Dale, B.E.; Lynd, L. Conversion for Avicel and AFEX pretreated corn stover by *Clostridium thermocellum* and simultaneous saccharification and fermentation: Insights into microbial conversion of pretreated cellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 102, (2011) 8040-8045.

Referências

- Shaw, A. J.; Podkaminer, K. K.; Desai, S. G.; Bardsley, J. S.; Rogers, S. R.; Thorne, P. G.; Hogsett, D. A.; Lynd, L. R. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 105, (2008) 13769-13774.
- Shen, F.; Kumar, L.; Hu, J.; Saddler, J. N. Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and deslignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. *Bioresource Technology*, 102 (2011) 8945-8951.
- Singh, D.; Banat, I. M.; Nigam, P.; Marchant, R. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. *Biotechnology Letters* [S.I.], 20, (1998) 753-755.
- Souza, C. J. A. Produção de etanol por Sacarificação e Fermentação Simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- Sjöström, E. Wood Chemistry: Fundamentals and applications. 2^a ed., Academic Press, Inc. San Diego (1993).
- Srichuwong, S.; Fujiwara, M.; Wang, X.; Seyama, T.; Shiroma, R.; Arakane, M.; Mukojima, N.; Tokuyasu, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass and bioenergy*, 33, (2009) 890-898.
- Stenberg, K.; Bollók, M.; Réczey, K.; Galbe, M.; Zacchi, G. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of stem-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, (2000) 204-210.
- Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, (2002) 1-11.
- Suryawati, L.; Wilkins, M. R.; Bellmer, D. D.; Huhnke, R. L.; Maness, N. O.; Banat, I. M. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, (2008) 894-902.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, 2, (2007) 707-738.
- Tomás-Pejó, E.; García-Aparicio, M.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; Ballesteros, M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*, 100, (2009) 890-895.
- Van Maris, A. J. A.; Abbott, D. A.; Belissimi, E.; Brink, J.; Kuyper, M.; Luttik, M. A. H.; Wisselink, H. W.; Scheffers, W. A.; Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, (2006) 391-418.
- Wingren, A.; Galbe, M.; Roslander, C.; Rudolf, A.; Zacchi, G. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous saccharification and fermentation based

Referências

bioethanol process - Technical and economic evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, (2005) 485-499.

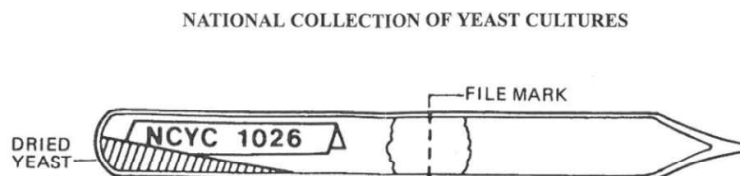
Zhang, Y.H.P.; Lynd, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Non complexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, (2004) 797-824.

Sacarificação e fermentação simultâneas de resíduos lignocelulósicos da indústria da pasta e papel para a produção de bioetanol

ANEXOS

Anexo 1 - Folhetos das especificações

A) Folheto de especificações da *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1426



Rehydration and Growth of freeze dried cultures

Each yeast is dispatched as a small quantity of freeze-dried culture sealed under vacuum in glass ampoules. Ampoules should be opened in the following way:

1. Check the number on the label inside the ampoule.
2. Score the glass with a suitable file at the level of the cotton wool plug.
3. Wipe the ampoule with alcohol.
4. Apply the end of a red-hot glass rod to the file mark to crack the glass.
5. Remove the tip of the ampoule and cotton wool plug and place in a container for subsequent sterilization before disposal.
6. Using a sterile Pasteur pipette, add about 0.5ml YM broth (Becton Dickinson/Difco 271120) or malt extract to the dried material.
7. Gently resuspend the dried culture and transfer to a culture bottle containing approximately 10ml of the same medium.
8. Unless otherwise indicated, most yeasts should be incubated at 25°C. Growth may be slow immediately after resuscitation. It may be necessary to incubate cultures for at least 5 days before discarding. Growth is usually stimulated by aeration which may be achieved by shaking or rocking the culture.
9. The discarded ampoule should be placed in a container for subsequent sterilization before disposal.

NCYC cultures should only be handled by, or under the supervision of, a trained microbiologist.

If you experience any problems rehydrating or growing your culture, or have any comments on NCYC services or how they could be improved, please contact us: ncyc@bbsrc.ac.uk

Growth Media

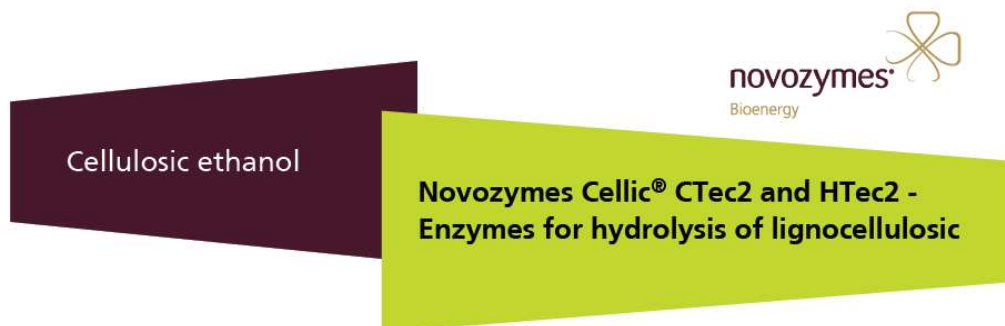
All NCYC strains (except where indicated) can be routinely grown in YM broth (Becton Dickinson/Difco 271120). Other suitable nutrient media include:

- YM: 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose
- YEP-glucose: 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1% glucose
- Malt Extract: 0.3% malt extract, 0.5% peptone
- Sabouraud's Glucose: 1% peptone, 4% glucose
- YPD medium: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose
- Yeast Nitrogen Base (Difco 0392-15-9) : a chemically defined medium to which a carbon source must be added.
- Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco 0919-15-3), which can be supplemented with appropriate amino acids or other source of nitrogen (useful for some genetically defined strains). A carbon source must be added.

*Agar when required is added to a final concentration of 1.5 - 2.0%
(All percentages are given weight/volume)*

More information about these media is given by J P van der Walt & D Yarrow, 'Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts' in *"The Yeasts. A Taxonomic Study"*, third edition (ed. N J W Kreger-van Rij, Elsevier, 1984) pp 45-104, and in *"Yeasts: Characteristics and Identification"*, second edition (J A Barnett, R W Payne & D Yarrow, Cambridge University Press, 1990).

B) Folheto das especificações do extrato enzimático



Application sheet

Conversion of lignocellulosic biomass to ethanol involves the liberation of sugars from biomass feedstocks. These materials are composed of three major fractions: cellulose, hemicellulose, and lignin. Cellulose and hemicellulose contain sugars in polymeric form that can be converted by enzymes to fermentable monomers for subsequent fermentation.

The lignin component, however, protects the cellulose and hemicellulose against microbial and enzymatic attack. Hence, the use of lignocellulose as a raw material requires a physical or chemical pretreatment in order to render the cellulose and hemicellulose fractions accessible for enzymatic hydrolysis. This pretreatment step is a fine balancing act aimed at opening the fibers to increase water access and enzyme accessibility while minimizing sugar loss and inhibitor generation to ensure high yields and a substrate suitable for enzymatic hydrolysis and fermentation.

Cellic CTec2 and HTec2 are state-of-the-art enzymes that have proven effective on a wide variety of pretreated lignocellulosic materials for the conversion of the carbohydrates in these materials to simple sugars prior to fermentation.

Product	Cellic [®] CTec2	Cellic HTec2
Tech specifications/description	Cellulase complex for degradation of cellulose to fermentable sugars A blend of - Aggressive cellulases - High level of β -glucosidases - Hemicellulase	- Endoxylanase with high specificity toward soluble hemicellulose - Cellulase background
Features	- High conversion yield - Effective at high solids concentrations - Inhibitor tolerant - Compatible with multiple feedstocks and pretreatments - High concentration and stability	- Can improve cellulose hydrolysis when combined with CTec2 - Helps in case of mild acid or alkaline pretreatment - Converts hemicellulose to fermentable sugars
Benefits	- Up to 50% lower enzyme dosage - Lower operating and capital costs from optimization of process, e.g., higher total solids loading and higher ethanol titer - Enabling low ethanol cost - Increased process flexibility	- 20% lower enzyme usage cost - Enables higher ethanol yields - Provides increased flexibility for pretreatment technology

Table 1. A description of Cellic[®] CTec2 and HTec2 and their features.

Application

CTec2 and HTec2 in application

Novozymes has partnered broadly with different cellulosic ethanol production companies that have worked with the Cellic product family to optimize the cellulosic ethanol production process. We have gathered application information using CTec2 and HTec2 in various process setups using different feedstocks and pretreatments. It is recommended to dose Cellic CTec2 based on the level of cellulose contained in the substrate to allow direct comparisons of enzyme effectiveness on various biomass materials, including those from

Dosing guidelines

The suggested enzyme trial dosage levels for initial investigation of a substrate are 1.5 %, 3.0 %, 6.0 %, and 30.0 % w/w (g enzyme/g cellulose). These data points should be used to generate a dose response curve (enzyme dosage vs. percentage cellulose conversion). The low dosage provides a target for commercially feasible cellulose hydrolysis, while the high dosage provides an indication of maximum enzymatically accessible cellulose content. Additional testing is recommended to refine the dose response curve and determine the effect of time, solids loading, cellulose conversion, and enzyme dosage.

If the pretreated feedstock of interest contains an appreciable amount of hemicellulose, it is advised to combine Cellic CTec2 and HTec2 to boost the cellulose hydrolysis. In some cases, other Novozymes hemicellulases may also be relevant. The enzyme dosage recommendation for Cellic HTec2 is 0.05–0.50 % w/w (g enzyme/g cellulose), but the dosage required is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly. HTec2 is dosed based upon

the amount of cellulose in the substrate because it is primarily viewed as a cellulase-boosting enzyme; additionally, dosing in this way simplifies the experimental plan.

Using CTec2 and HTec2 in combination

When pretreatments result in a feedstock that would benefit from additional hemicellulose degradation, one should test whether there is synergy between CTec2 and HTec2. It is recommended to perform a dose response test and a dose response-replacement test where the total dosage of the CTec2 and HTec2 equals the dosages in the CTec2-only dose response test. An example of an initial study design is shown in table 2.

Treatment	Enzyme dosage % w/w (g enzyme/g cellulose)	
	CTec2	HTec2
Cellulase – low	1.50 %	0.00 %
Cellulase – mid	3.00 %	0.00 %
Cellulase – high	6.00 %	0.00 %
Replacement – low	1.35 %	0.15 %
Replacement – mid	2.70 %	0.30 %
Replacement – high	5.4 %	0.60 %

Optimal temperature and pH

The optimal temperature and pH for Cellic CTec2 are 45–50 °C and pH 5.0–5.5, as shown in figures 1 and 2 respectively. The activity profiles were produced using a dilute acid-pretreated corn stover at 5% total solids loading. The temperature was kept constant at 50 °C for the pH profile, and the pH was kept at 5.0 for the temperature profile throughout the 72-hour hydrolysis.

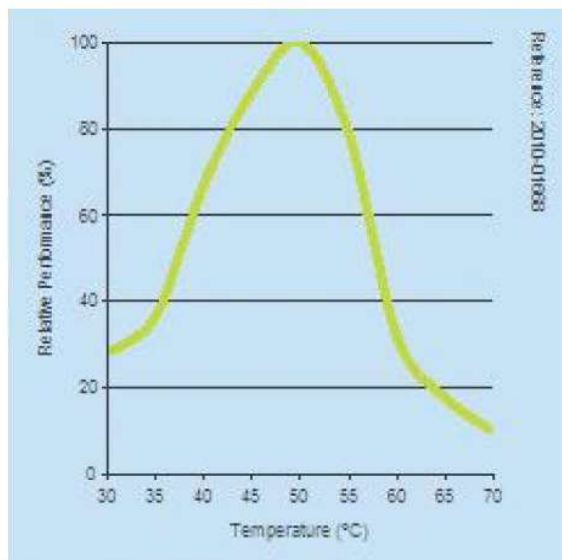


Fig. 1. Temperature curve

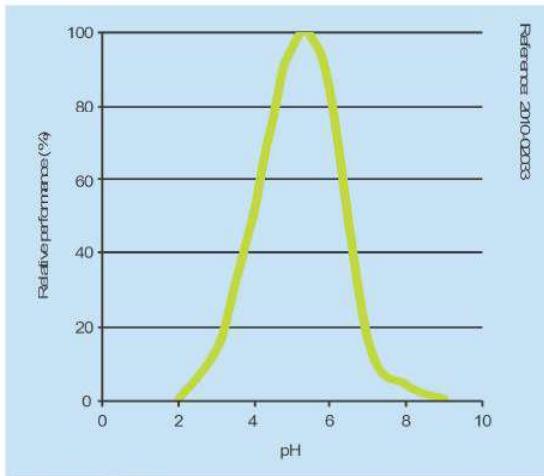


Fig. 2. pH curve

The optimal temperature and pH for Cellic HTec2 are 45–50 °C and pH 5.0.

Figures 3 and 4 illustrate the activity of Cellic HTec2 at different temperatures and pH values using azo-wheat arbinoxylan as substrate.

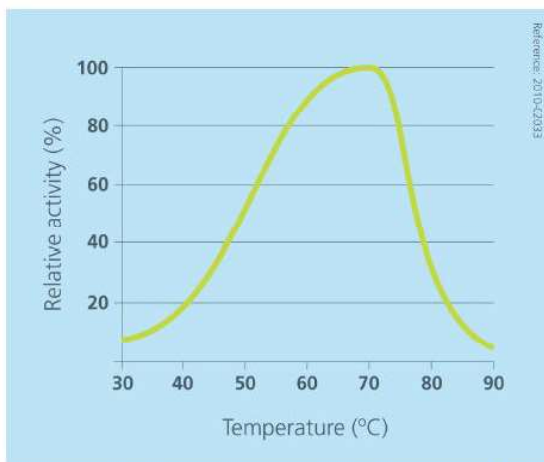


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of Cellic[®] HTec2.

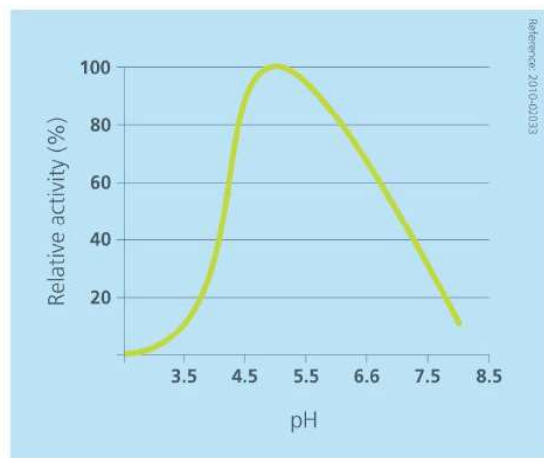


Fig. 4. Effect of pH on the activity of Cellic[®] HTec2.

Figure 5 shows the enzyme dose response of Cellic CTec2 at 50 °C and pH 5.0 for an unwashed sample of dilute acid-pretreated corn stover at 15 % total solids loading.

The enzymes are also effective on other feedstocks such as sugarcane bagasse, corn cob, corn fiber, and wood pulp. The dose response will depend on feedstock, pretreatment, and process conditions.

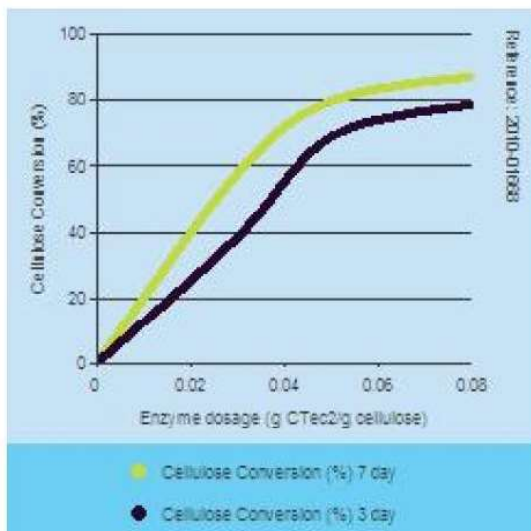


Fig. 5. Enzyme dosage (g enzyme/g cellulose).

Storage in application

The recommended storage conditions are 0–25 °C (32–77 °F) in sealed packaging, well-protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. However, enzymes gradually lose activity over time. Extended storage and/or adverse conditions such as higher temperature may lead to a higher dosage requirement.

Safety, handling, and storage

Safety, handling, and storage guidelines are provided with all products.

CELLULOSIC ETHANOL PRIMER

Biofuels are a key to reducing global CO₂ emissions, and cellulosic bioethanol offers the opportunity to reduce CO₂ emissions by up to 90% compared to conventional gasoline. The cellulosic ethanol industry holds a lot of promise for meeting the demand for an alternative global liquid transportation fuel, and at Novozymes we recognize this potential as a worthwhile focus for our company. That is why we started working on developing cellulosic ethanol solutions in 2000 and have continued to grow our research efforts in this area every year since then. Our cellulosic ethanol work has become the largest endeavor in our company's history, with more than 150 people dedicated to this effort. We have learned a lot through our internal research and through our partnerships with leading companies across the globe.

The information in this section has been collected through our efforts over the years and is offered to help you progress in your cellulosic ethanol work.

Cellulosic ethanol production process

The production processes for lignocellulosic ethanol are continuously being optimized at pilot and demonstration-scale plants around the world. Simplified, the process has five steps (see figure 6):

1. Feedstock: Feedstock collection and transport to the cellulosic ethanol plant.
2. Pretreatment: A mechanical or thermochemical pretreatment step to break up the lignocellulosic structure so that the enzymes can access cellulose and hemicellulose.
3. Hydrolysis: An enzymatic hydrolysis step to convert the cellulose and hemicellulose to monomeric sugars.
4. Fermentation: A fermentation step to convert the sugars to ethanol.
5. Recovery: A recovery step to separate the ethanol from the remaining fractions so the product can be sold.

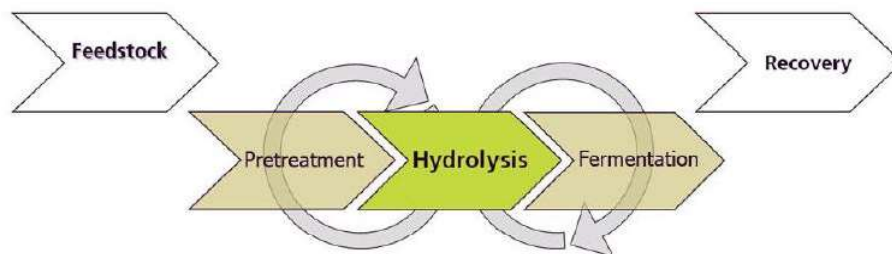


Fig. 6. Cellulosic ethanol production process.

It is widely believed that pretreatment, hydrolysis, and fermentation should be carried out in an integrated fashion since the three steps are highly interconnected. For example, degradation products generated during pretreatment can adversely affect hydrolysis and fermentation. Additionally, determining the optimal time to proceed from hydrolysis to fermentation can potentially increase the ethanol yield or decrease the overall process cost. Thus, it is important to determine how changes to one process step affect the performance and cost of the subsequent steps.

Hydrolysis

The primary goal of hydrolysis is to convert as much cellulose as possible into monomeric sugars as quickly as possible, which is achieved by adding cellulases and hemicellulases. A good measure of the effectiveness of an enzyme is percentage cellulose conversion, which is defined as the amount of cellulose converted to glucose divided by the total amount of cellulose. A high cellulose conversion can be achieved by increasing either the enzyme dosage or the hydrolysis time. However, a small fraction of the cellulose in a feedstock is harder to convert than the majority; hence, there can be a diminishing return where it takes a large amount of enzyme to convert a relatively minor fraction of cellulose.

Given this diminishing return, it is not recommended to attempt to reach a predetermined target percentage cellulose conversion without developing a process model, as this could result in a higher process cost. Finding the optimal enzyme loading requires balancing of capital expenses and operational expenses. Modeling these relationships is critical for finding the optimal process setup for a cellulosic ethanol plant.

Table 3 shows a few basic relationships between several hydrolysis factors and CAPEX/OPEX. It is important to note that the benefits and downsides shown below do not necessarily offset one another. For example, if you increase solids, the savings on acid/base and tank costs may not offset the reduction in maximum attainable conversion at higher enzyme cost. Additionally, it should be noted that not all changes will be realized at the same time as there are multiple ways to approach these complex relationships.

Hydrolysis factor	CAPEX	OPEX
Higher enzyme dosage	<ul style="list-style-type: none"> - Quicker reaction results in less installed-tank capacity - Lower agitation cost 	<ul style="list-style-type: none"> - More spent on enzyme - Lower agitation cost - Lower residence time - Higher cellulose conversion
Longer hydrolysis time	<ul style="list-style-type: none"> - Lower enzyme dosage - More installed-tank capacity 	<ul style="list-style-type: none"> - Higher heating/agitation cost - Less spent on enzyme
Higher total solids	<ul style="list-style-type: none"> - More expensive (initial) mixing system - Less installed-tank capacity - More expensive solids transport - Potentially cheaper pretreatment equipment - Smaller distillation unit 	<ul style="list-style-type: none"> - Lower water throughput - More spent on enzyme - Higher agitation power - Lower heating cost - Lower acid/base cost - Lower distillation cost
Higher percentage cellulose conversion	<ul style="list-style-type: none"> - Lower CHP size/cost 	<ul style="list-style-type: none"> - Less material for boiler means less income from electricity - More ethanol generated results in lower distillation costs - More spent on enzyme

Table 3. Some basic relationships between CAPEX and OPEX.

A brief note on fermentation and SSF

It is strongly recommended to identify the optimal time to switch from hydrolysis to fermentation for the specific feedstock. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), a process design where yeast and enzyme are added together and run at 32–37 °C, is commonly cited as a way of decreasing process costs because it can remove the end-product inhibition on enzymes by fermenting glucose to ethanol.

However, for cellulosic bioethanol, suboptimal conditions during SSF necessitate longer processing time for the enzymes and C5 sugar conversion to reach a specific glucose conversion level. The temperature is not favorable for optimal enzyme performance, and higher inhibitors, due to high solids in hydrolysis, cause the normal yeast dosage to not perform effectively. For cellulases, CTec2 and HTec2 have significantly more activity at hydrolysis temperatures than at fermentation temperatures (Figures 1 and 3), and CTec2 also has an improved β -glucosidase enzyme that has less glucose inhibition.

Additional information

We invite you to explore our bioenergy information site at

www.bioenergy.novozymes.com. For additional information on Novozymes' products or other general topics, please contact Novozymes using the contact form on the above website to place your inquiry.

Novozymes A/S
Tel: +45 4446 0000
Fax: +45 4446 9999
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark
bioenergy@novozymes.com

*Novozymes is the world leader in bioinnovation. Together with customers across a broad array of industries we create tomorrow's industrial biosolutions, improving our customers' business, and the use of our planet's resources. Read more at www.novozymes.com.
Novozymes delivers advanced bioinnovation solutions to the bioenergy industry by setting new standards in performance and viability; helping the world realize the promise of renewable energy.*

Laws, regulations, and/or third-party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, information provided in this document "AS IS" is of good faith and does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

Anexo 2 - Determinação quantitativa dos açúcares redutores e preparo da solução tampão Citrato de Sódio.

A) Método analítico para a determinação quantitativa dos açúcares redutores - DNS original

- Preparação da solução de DNS

- Solução A: obteve-se dissolvendo a quente, 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 mL de solução de hidróxido de sódio 2 M num copo em banho-maria.
- Solução B: obteve-se dissolvendo 150,9 g de tartarato duplo de sódio e potássio em água destilada e perfazendo com água até ao volume de 250 mL.
- Solução DNS: obteve-se adicionando, a quente, 100 mL da solução A e 250 mL da solução B, perfazendo o volume com água até 500 mL.

- Método analítico DNS original

Num tubo adicionou-se 1 mL da amostra (diluída quando necessário) e 1 mL de DNS. Agitou-se e colocou em banho-maria por 5 min. Em seguida, transferiu-se para um banho de gelo e adicionou-se 10 mL de água destilada. Deixa-se arrefecer durante 15 min. Transferiu-se a solução para uma cuvete e leu-se absorvância a 540 nm num espectrofotómetro UV-Vis. O branco foi preparado com 1 mL água destilada que sofreu o mesmo tratamento da amostra.

- Obtenção da curva de calibração.

Preparou-se uma solução-padrão de 1 mg/mL de glucose. Foram efectuadas várias diluições a partir da solução-padrão. Aplicou-se o método analítico DNS original descrito para as soluções diluídas preparadas e para a solução-padrão. A concentração conhecida de glucose de cada solução foi relacionada com a respectiva absorvância medida no espectrofotómetro, obtendo-se uma curva de calibração linear. Para cada reagente DNS preparado, foi construída uma nova curva de calibração. A **Figura 39** mostra, como exemplo, a curva de calibração do DNS preparado em 09/04/2012.

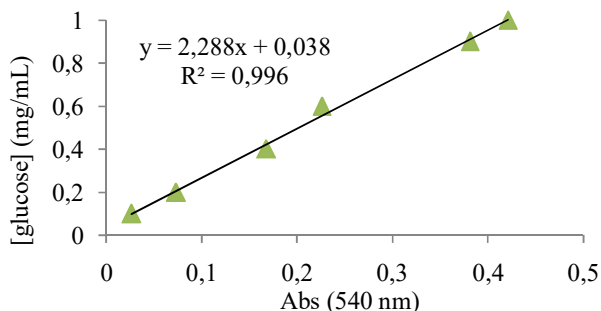


Figura 39 - Relação entre concentração de glicose e absorvância (curva de calibração).

B) Preparo da Solução Tampão Citrato de Sódio

Preparou-se uma solução stock de tampão citrato de 1 M, dissolvendo-se em um copo 210 g de ácido cítrico monohidratado em 750 mL de água destilada, adicionou-se hidróxido de sódio (~60 g) até pH 4,3 e foi adicionada água destilada até perfazer o volume de 1000 mL. Para preparar a solução de tampão citrato de 0,05 M bastou diluir a solução stock (por exemplo 50 mL da solução stock para 950 mL de água destilada). O pH da solução de tampão citrato 0,05 M devia ser 5,0, pois é o pH ótimo do extrato enzimático (Cellic[®] CTec2). Para isso, ajustou-se o pH da solução com hidróxido de sódio. Este procedimento está descrito no NREL-LAP 006 (1996).

C) Método analítico para a determinação quantitativa dos açúcares redutores - DNS modificado

Este método foi utilizado quando as amostras a serem analisadas continham solução tampão citrato de sódio (0,05 M; pH 5,0).

- Preparação do reagente DNS modificado

Num balão volumétrico de 2000 mL, dissolveram-se 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada. Em seguida acrescentou-se 306 g de tartarato de potássio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C).

- Método analítico do DNS modificado

Num tubo adicionou-se 0,5 mL da amostra (diluída quando necessário), 1 mL de solução tampão citrato de sódio (0,05 M; pH 5,0) e 3 mL de DNS modificado. Agitou-se e colocou-se em banho-maria por 5 min. Em seguida, transferiu-se para um banho de gelo onde arrefeceu durante 5 min. Transferiu-se 0,2 mL para uma cuvete, acrescentou-se 2,5 mL de água destilada e leu-se a absorvância a 540 nm num espectrofotómetro UV-Vis. O branco foi preparado com 0,5 mL de solução tampão citrato de sódio (0,05 M; pH 5,0) que sofreu o mesmo tratamento.

- Obtenção da curva de calibração.

A diferença na obtenção da curva de calibração relativa ao DNS original é que a solução-padrão de glucose preparada inicialmente deve ter agora uma concentração de 5 mg/mL. Na **Figura 40** está representada a curva de calibração do DNS modificado preparado em 29/10/2012.

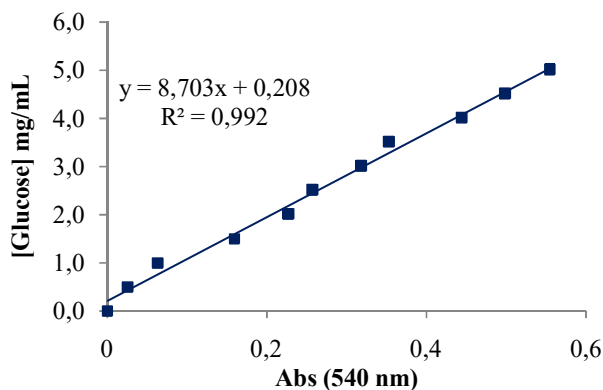


Figura 40 - Relação entre concentração de glucose e absorvância (curva de calibração - DNS modificado).

Através da equação da **Figura 40** foi possível encontrar as concentrações dos açúcares redutores para cada absorvância lida no espectrofotómetro a 540 nm.

Anexo 3 - Tratamento de lamas primárias

Neutralização do carbonato de cálcio com ácido clorídrico

Pesou-se 5 g de lamas primárias (base seca) num copo de 1 L. Num balão volumétrico de 250 mL, colocou-se cerca de 150 mL de água destilada e juntou-se aproximadamente 2,2 mL de ácido clorídrico a 37%. Adicionou-se depois água destilada até perfazer 250 mL. Esta solução aquosa ácida foi adicionada às lamas e misturou-se a suspensão com uma vareta até que não observasse mais a efervescência, devido à libertação de CO₂ por reacção do HCl com o CaCO₃, isto demorava cerca de 3 min. De seguida, a suspensão era filtrada através de uma teia metálica de 60 mesh (funil com ~12.5 cm de diâmetro, 9 cm de altura), comprimindo bem o bolo contra a malha metálica. O bolo foi recolocado no copo e adicionaram-se 250 mL água destilada, misturando-se a suspensão com uma vareta durante 1 min. A suspensão foi então filtrada com a mesma teia metálica.

Anexo 4 - Determinação da atividade enzimática do extrato enzimático

O Procedimento experimental para a determinação da atividade do extrato enzimático foi feito na seguinte ordem:

- ✓ Recortaram-se tiras de papel de filtro Whatman nº1 de 1,0 cm de largura por 6,0 cm de comprimento (≈ 50 mg).
- ✓ Adicionou-se 1,0 mL de tampão citrato (0,05 M, pH 4,8) e 0,5 mL da solução enzimática diluída a um tubo de ensaio. Foram efetuadas pelo menos duas diluições da enzima original, de modo a que, uma delas libertasse um pouco mais de 2 mg de glucose e a outra um pouco menos de 2 mg.
- ✓ Colocou-se num banho a 50°C e após a solução ter atingido a temperatura desejada, adicionou-se uma tira de papel de filtro. Recolocou-se a 50°C e foi mantido a esta temperatura durante 60 min.
- ✓ Findo o tempo de incubação, aplicou o método analítico do DNS modificado.

Realizou-se este procedimento também para o branco do solvente (1,5 mL de tampão citrato), o controlo de enzima (1 mL de tampão + 1 mL de solução de enzima diluída, sem papel de filtro) e o controlo de substrato (1,5 mL tampão + tira de papel de filtro, sem solução enzimática).

- ✓ Fez-se a leitura da absorvância a 540 nm da amostra reaccional, do controlo de enzima e do controlo do substrato contra o branco do solvente. Subtraiu o valor da absorvância dos controlos ao valor da absorvância da amostra reaccional.
- ✓ Aplicou a equação da curva de calibração da glucose, determinando-se a concentração de glucose libertada na hidrólise da tira do papel de filtro. Multiplicou-se por 0,5 mL para calcular a massa de glucose libertada nos 0,5 mL de solução enzimática. Pretendia-se encontrar 2 diluições (concentrações de solução enzimática = 1/Factor de diluição) que permitem obter aproximadamente 2 mg de glucose.
- ✓ Aplicou uma interpolação linear simples entre esses dois pontos para determinar a concentração de solução enzimática diluída ($\text{mL}_{\text{enzima}}/\text{mL}_{\text{solução}}$) que libertava 2 mg de glucose. O valor determinado da concentração da solução enzimática foi depois aplicado na equação ($\text{FPU} = 0,37/\text{Concentração enzimática}$), para determinar as unidades de papel de filtro por volume do extracto enzimático original ($\text{FPU}/\text{mL}_{\text{enzima}}$).

Anexos

- Derivação da unidade FPU

A unidade FPU baseia-se na unidade internacional (IU).

1 IU = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de açúcares redutores obtidos durante a reação de hidrólise.

1 IU = 0,18 mg/min quando o produto é apenas glucose.

A quantidade absoluta de glucose formada no ensaio *FPU* para a diluição crítica de enzima é 2 mg, logo:

$$2 \text{ mg de glucose - equivalente} = \frac{2}{0,18} \mu\text{mol}$$

Esta quantidade de glucose foi produzida por 0,5 mL de enzima em 60 minutos:

$$\frac{\frac{2 \text{ mg glucose}}{0,18 \frac{\text{mg glucose}}{\mu\text{mol}}}}{0,5 \text{ mL de enzima diluída} * 60 \text{ min}} = 0,37 \mu\text{mol}/(\text{min mL})$$

Assim, a concentração crítica de enzima que produzirá 2 mg de glucose na reação *FPU* contém 0,37 unidades, logo:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{concentração de enzima que liberta 2 mg de glucose}} \text{ unidades/mL}$$

Uma vez que o ensaio *FPU* é não linear, a utilização da unidade internacional (IU) é incorreta porque esta é baseada em velocidades iniciais, isto é, baseia-se em relações lineares. Assim sendo, é recomendado que os resultados sejam expressos simplesmente em unidades por mL ou por mg.

Anexo 5 - Tempo de retenção e quantificação dos compostos por HPLC

A) Identificação dos tempos de retenção dos compostos analisados por HPLC

Na **Tabela 19** estão os tempos de retenção dos compostos que foram analisados neste trabalho por HPLC.

Tabela 19 - Tempo de retenção dos compostos analisados por HPLC.

Nome dos compostos	Tempo de retenção (min)
Glucose	13,0
Xilose	14,4
Manose	14,9
Arabinose	16,7
Ácido acético	15,8
Ácido láctico	10,1
Ácido fórmico	14,5
Ácido succínico	13,5
Glicerol	19,2
Etanol	20,0
Propanona	21,0
Hidroxi-metil-furfural (HMF)	35,0
Furfural	45,0

B) Curvas de calibração da Glucose, Xilose, Ácido Acético e do Etanol em HPLC.

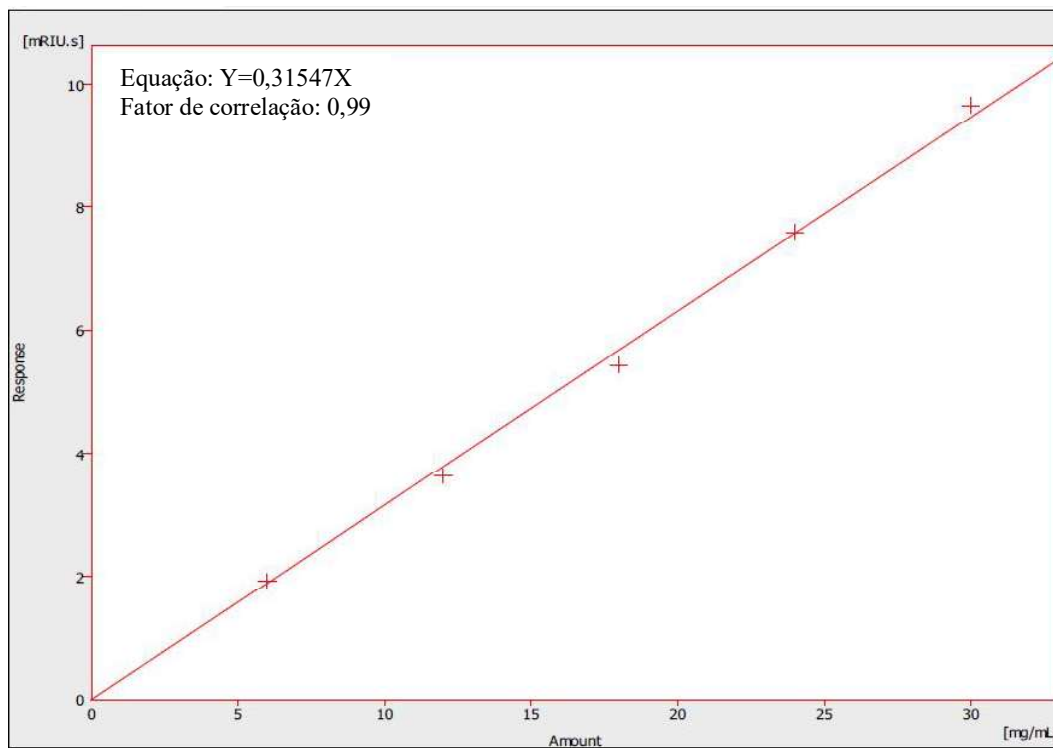


Figura 41- Curva de calibração da glucose (HPLC).

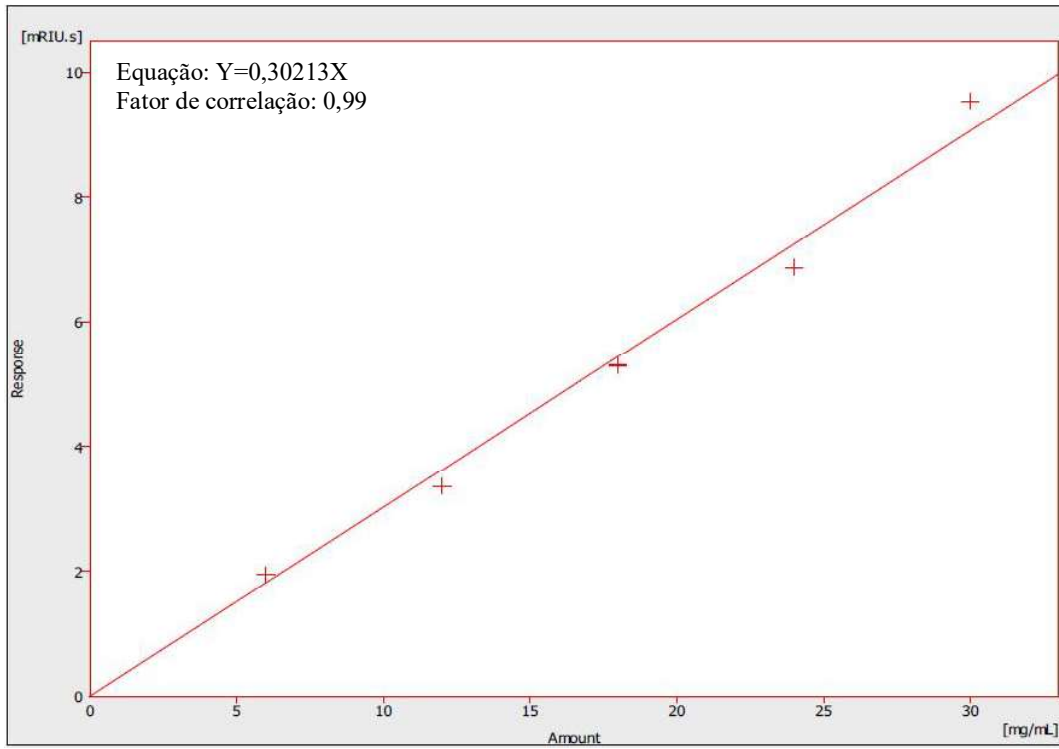


Figura 42- Curva de calibração da Xilose (HPLC).

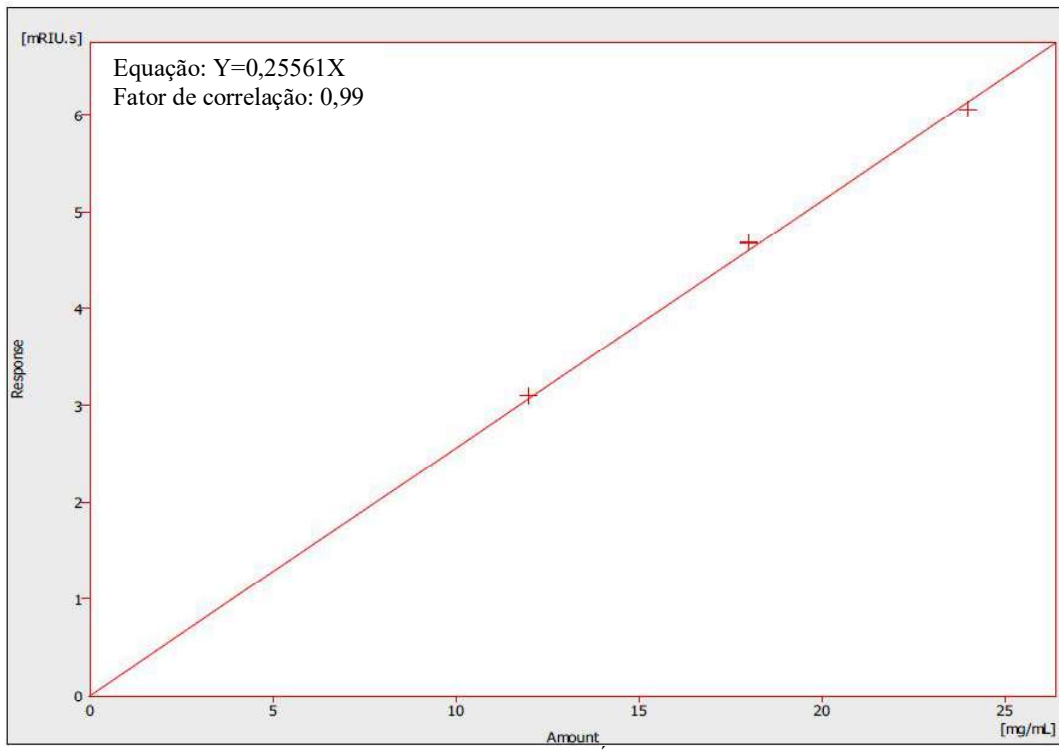


Figura 43- Curva de calibração do Ácido Acético (HPLC).

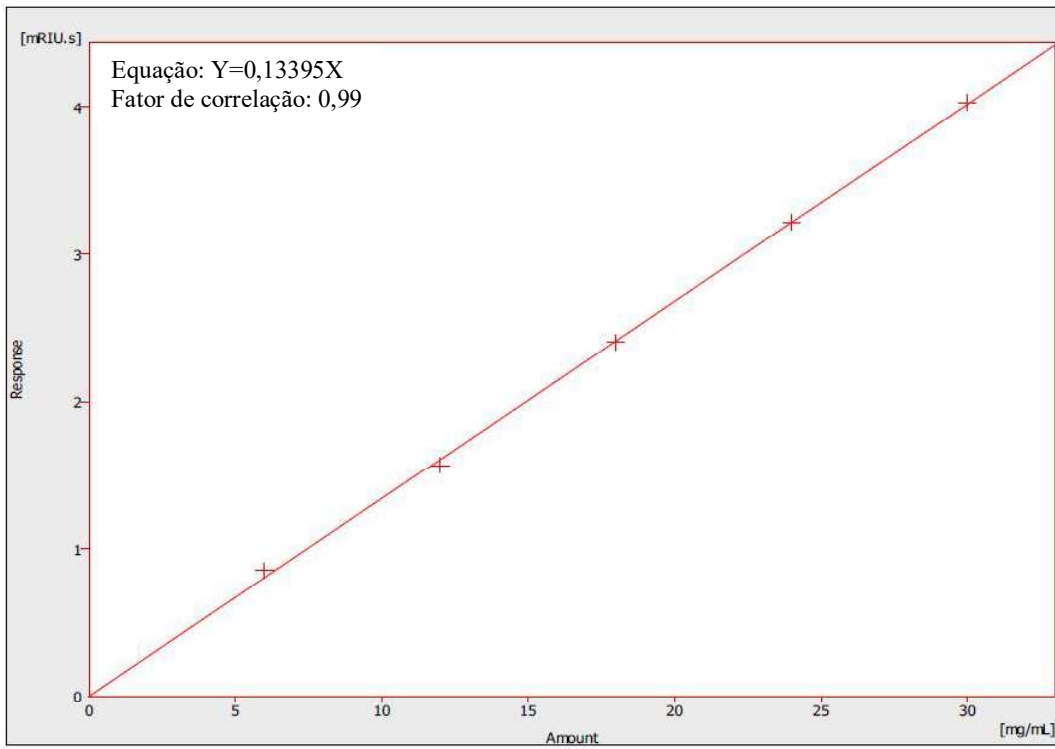


Figura 44 - Curva de calibração do Etanol (HPLC).