

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO  
DE CANA PRÉ-TRATADO ENTRE TRÊS FORMAS DE OPERAÇÃO EM BATELADA**

Mirella Cappellazzo  
Eng<sup>o</sup> Química, UEM, 2007  
Orientador: Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Estadual de Maringá, como  
parte dos requisitos necessários à obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia Química, área  
de Desenvolvimento de Processos.

Maringá - PR - Brasil  
Agosto de 2009.

FICHA ELABORADA POR HELENA T. O. PITTON CRB 8º/4699

C247c Cappellazzo, Mirella  
Comparação da eficiência de hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado entre três formas de operação em batelada / Mirella Cappelazzo. -- Maringá : [s.n.], 2009.  
81 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes.  
Coorientadora: Profª Drª Gisella Maria Zanin.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2009.

1. Enzimas celulolíticas. 2. Hidrólise enzimática. 3. Bagaço de cana. 4. Batelada alimentada. 5. Bateladas consecutivas. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. II. Título.

CDU 2.ed. 66.094.941

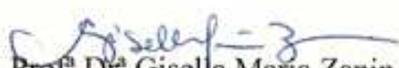
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Mirella Cappellazzo perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 28 de agosto de 2009.

COMISSÃO JULGADORA



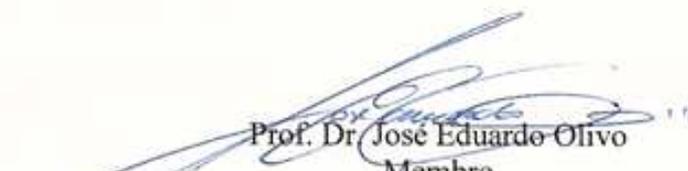
Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes  
Orientador



Prof.ª Dr.ª Gisella Maria Zanin  
Coorientadora



Prof. Dr. Marcos de Souza  
Membro



Prof. Dr. José Eduardo Olivo  
Membro

*Esta dissertação é dedicada:*

*Aos meus pais Ediza e Osmar que desde pequena me fizeram acreditar que sou capaz de tudo que desejar.*

*Ao Frederico, amigo, amante e companheiro de todos os momentos.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Maria de Fátima, minha mentora científica, que sempre me incentivou e continua me apoiando amorosa e atenciosamente.*

*Ao Prof. Arildo, um verdadeiro mestre, que me ensinou com carinho e paciência a conduzir meus trabalhos experimentais durante minha Iniciação Científica.*

*Ao Prof. Flávio Faria de Moraes, mestre querido, que concedeu a honra de orientar-me acreditando em minha capacidade intelectual.*

*À Prof<sup>ª</sup>. Gisella que me apoiou gentilmente em minhas dúvidas.*

***A Vocês, o meu carinho.***

*Agradecimentos:*

- *A Deus, que torna todas as coisas possíveis.*
- *Ao Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD, pela competente orientação deste trabalho e por ter sempre acreditado em mim.*
- *Ao Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin, cuja valiosa coorientação foi essencial para este trabalho.*
- *Aos companheiros de pesquisa Liliane Pires Andrade, Giovana Fernanda Dionisio, Camila Garcia Baldin, Letícia de Souza Zarpellon, Andressa Carneiro e Flávio César Imazu Santana.*
- *Aos Engenheiros Químicos Lauro Mitsuaki Kambara e Luiza Pedrina Vilxenski Calsavara, que estavam sempre prontos a ajudar.*
- *À Prof<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula, do departamento de Zootecnia, e à equipe do LANA, Laboratório de Análise de Alimentos, que, além de me auxiliarem, cederam a estrutura e material para a caracterização do bagaço pré-tratado.*
- *À Novozymes pela doação da enzima.*
- *À Prof<sup>a</sup> Elba Bon e sua equipe, que me receberam muito bem em seu laboratório na UFRJ, e me indicaram o caminho para a produção da enzima.*
- *Aos Profs. Adilson R. Gonçalves e George Jackson de M. Rocha, da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), pelo fornecimento do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, substrato de todas as reações de hidrólise deste trabalho.*
- *Aos professores e funcionários do PEQ, em especial à Marilza e ao Robson, pelo apoio.*
- *Aos funcionários e professores do DEQ, pelo bom ambiente de trabalho.*
- *À FINEP, CAPES e DEQ/UEM pelo apoio financeiro.*
- *Às outras entidades e pesquisadores participantes do Projeto Bioetanol, pelo fornecimento de material e troca de informações.*
- *A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.*

***OBRIGADA!***

## COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO ENTRE TRÊS FORMAS DE OPERAÇÃO EM BATELADA

**AUTORA:** Mirella Cappellazzo

**ORIENTADOR:** Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD

**COORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 - 09; CEP: 87020-900 - Maringá - PR, Brasil, defendida em 28 de agosto de 2009. 81 p.

### RESUMO

Neste estudo, foi investigada a eficiência de três formas de operação de reator batelada para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado visando à produção de glicose. Os reatores batelada alimentada e bateladas consecutivas, este com aproveitamento do hidrolisado para readsorção da enzima, tiveram seus desempenhos comparados ao reator batelada convencional. No reator batelada alimentada a carga total de bagaço pré-tratado foi dividida em frações, que foram adicionadas em diferentes intervalos de tempo, distribuídos durante o tempo total de hidrólise, sem a remoção dos resíduos não hidrolisáveis. Enquanto no reator bateladas consecutivas, passado um determinado tempo de reação, o hidrolisado foi esgotado de cada batelada, e colocado em contato com nova porção de bagaço pré-tratado fresco, visando à readsorção da enzima. O bagaço em suspensão no hidrolisado, contendo a enzima adsorvida, foi separado da solução de açúcares por filtração a vácuo e, submetido a uma nova batelada de hidrólise, sem a adição de mais enzima. A comparação foi feita em termos de glicose produzida, que poderia ser posteriormente fermentada a etanol. Um sistema enzimático contendo celulasas e celobiase produzidas por *Trichoderma reesei* Rut-C30 e *Aspergillus awamori*, foi utilizado na hidrólise enzimática. A velocidade de sacarificação foi maior nas primeiras 24 horas de reação, nas quais se produziu mais da metade da glicose total. Os reatores alternativos, ao reator batelada convencional, foram testados motivando-se nas premissas de que suas formas de operação causariam menor inibição da reação de hidrólise, pela alimentação gradativa do substrato e separação do xarope produzido do resíduo de sólido não reagido, conseqüentemente atingindo maior ganho na produção de glicose, para um mesmo tempo de reação. No entanto, o reator batelada convencional foi mais eficiente que os reatores batelada alimentada e bateladas consecutivas, alcançando uma maior produção de glicose, nas condições testadas.

## COMPARISON OF EFFICIENCY BETWEEN THREE WAYS OF BATCH OPERATION FOR ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PRETREATED SUGARCANE BAGASSE

**AUTHOR:** Mirella Cappellazzo

**SUPERVISORS:** Prof. Flávio Faria de Moraes, PhD

Prof. Dr. Gisella Maria Zanin

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, B1 E46 - 09; CEP 87020-900 - Maringá - PR, Brasil, presented on August 28<sup>th</sup>, 2009. 81 p.

### ABSTRACT

In this study, the efficiency of three operation forms of the batch reactor for the enzymatic hydrolysis of steam-exploded and washed sugarcane bagasse, aiming for glucose production, were evaluated. A “fed-batch” reactor and a consecutive batches reactor where the hydrolysate was used for enzyme adsorption were compared to the conventional batch reactor. In the “fed-batch” reactor, the total solids loading was split into fractions, which were added at different intervals, during the total hydrolysis time, without removing non-hydrolyzed waste. In the consecutive batches reactor, after a determinate reaction time, the hydrolysate was separated and put together with a new portion of fresh pre-treated bagasse, intending for enzyme readsorption. The bagasse in suspension in the hydrolysate, containing the enzyme adsorbed, was then separated from the sugar solution by vacuum filtration and after, submitted to a new hydrolysis batch, without more enzyme addition. The comparison was made in terms of glucose production, which can be converted into ethanol. An enzyme system comprising cellulases and cellobiase produced by *Trichoderma reesei* Rut-C30 and *Aspergillus awamori*, was used in the enzymatic hydrolysis. The saccharification rate was higher in the first 24 hours, within more than half of the glucose was produced. The alternative reactors to the conventional batch reactor were tested motivated by the premise that their operation forms would cause minor inhibition of the hydrolysis reaction, by the gradual feeding of the substrate and separation of the produced syrup from the non reacted solid waste, consequently reaching a larger gain in glucose production, for the same reaction time. Nevertheless, the conventional batch reactor was more efficient than the “fed batch” and consecutive batches reactors, attaining a larger glucose production, in the tested conditions.

## ÍNDICE DO TEXTO

<b>Capítulo 1 - Introdução e Objetivos.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introdução .....	1
1.2 Objetivos .....	3
1.3 Estrutura da Dissertação .....	5
<b>Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>6</b>
2.1 A biomassa lignocelulósica .....	6
2.1.1 <i>O bagaço de cana-de-açúcar</i> .....	7
2.2 Pré-tratamento.....	9
2.2.1 <i>Categorias de Pré-tratamento</i> .....	10
2.3 Hidrólise Enzimática.....	17
2.3.1 <i>Celulases</i> .....	20
2.3.2 <i>Aprimorando a hidrólise enzimática</i> .....	22
2.4 Fermentação.....	26
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos .....</b>	<b>28</b>
3.1 Caracterização do bagaço .....	28
3.2 Produção das enzimas celulolíticas.....	31
3.3 Determinação dos açúcares redutores .....	33
3.3.1 <i>Preparação do reagente DNS</i> .....	34
3.3.2 <i>Determinação da curva padrão do reagente DNS</i> .....	34
3.4 Determinação da atividade celulolítica com papel de filtro.....	34
3.4.1 <i>Cálculo da Atividade da Celulase</i> .....	35
3.5 Determinação de glicose – Método Enzimático .....	36
3.5.1 <i>Determinação da curva padrão do Kit GOD-POD</i> .....	37
3.6 Determinação da atividade da celobiase .....	37
3.6.1 <i>Cálculo da Atividade de Celobiase</i> .....	38
3.7 Determinação da umidade do bagaço .....	40
3.8 Ensaio de hidrólise .....	40
3.8.1 <i>Reator batelada convencional</i> .....	42
3.8.2 <i>Reator tipo batelada alimentada</i> .....	43
3.8.3 <i>Reator tipo bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para reabsorção da enzima</i> .....	44
<b>Capítulo 4 – Resultados e discussão.....</b>	<b>46</b>
4.1 Caracterização do bagaço .....	46
4.2 Determinação da curva padrão do reagente DNS .....	47
4.3 Determinação da atividade enzimática celulolítica com papel de filtro .....	48
4.4 Determinação da curva padrão do Kit GOD-POD .....	50
4.5 Determinação da atividade de celobiase .....	50
4.6 Ensaio de Hidrólise .....	52
4.6.1 <i>Reator batelada convencional</i> .....	52
4.6.2 <i>Reator batelada alimentada</i> .....	54
4.6.3 <i>Reator tipo bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para reabsorção da enzima</i> .....	58
<b>Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões.....</b>	<b>64</b>
5.1 Conclusões .....	64
5.2 Sugestões .....	65
<b>Referências .....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura da celulose.....	6
Figura 2.2 - Esquema das metas do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos .....	10
Figura 2.3 - Estrutura molecular da celulose e local de ação da endo-glicanase, celobiohidrolase e $\beta$ -glicosidase.....	21
Figura 2.4 - Uma visão simplificada dos fatores limitantes da eficiência da hidrólise da celulose .	23
Figura 3.1 - Operação do reator batelada convencional.....	42
Figura 3.2 - Operação do reator batelada alimentada.....	43
Figura 3.3 - Operação do reator bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para readsorção da enzima. ....	44
Figura 4.1 - Concentração de açúcares redutores expressos como glicose (mg de glicose/0,5 mL de solução padrão de glicose) .....	47
Figura 4.2 - Relação da concentração relativa do complexo enzimático celulase/celobiase diluído (C*) com os açúcares redutores liberados expressos como glicose. ....	49
Figura 4.3 - Curva padrão para dosagem de glicose pelo kit enzimático Glicose Bioliquid.....	50
Figura 4.4 - Relação das concentrações relativas da enzima diluída (C*) com as massas de glicose liberadas no teste de atividade de celobiase. ....	51
Figura 4.5 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio BL e de seu Controle. ....	52
Figura 4.6 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio A e de seu Controle. ....	54
Figura 4.7 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio B e de seu Controle.....	54
Figura 4.8 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio C e de seu Controle.....	55
Figura 4.9 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio I e de seu Controle.....	58
Figura 4.10 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio II e de seu Controle.....	59
Figura 4.11 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio III. ....	59
Figura 4.12 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio IV.....	60
Figura 4.13 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio V e de seu Controle. ....	60
Figura 4.14 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio VI e de seu Controle. ....	61

**ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 3.1 - Meio Breccia (BRECCIA et al., 1995) modificado – <i>Aspergillus awamori</i> . .....	32
Tabela 3.2 - Meio Mandels (MANDELS e WEBER, 1969) modificado – <i>Trichoderma reesei</i> Rut-C30. ....	33
Tabela 3.3 - Composição das análises do Kit GOD-POD.....	37
Tabela 3.4 - Composição dos brancos para os ensaios enzimáticos.....	37
Tabela 4.1 - Caracterização do bagaço pelo Método de Van Soest (parte A).....	46
Tabela 4.2 - Caracterização do bagaço pelo Método de Van Soest (parte B). ....	46
Tabela 4.3 - Composição do bagaço pré-tratado e lavado. ....	46
Tabela 4.4 - Diluições da enzima estoque.....	48
Tabela 4.5 - Absorvâncias lidas convertidas em concentrações de açúcares .....	48
Tabela 4.6 - Dados dos ensaios enzimáticos para a determinação da atividade de celobiase. ....	51
Tabela 4.7 - Ensaio V: Bateladas consecutivas com readsorção da enzima com 3% (m/m, m.s.) de bagaço, 15 FPU/g de celulose e 150UI/g de celulose. ....	62
Tabela 4.8 - Ensaio VI: Bateladas consecutivas com readsorção da enzima com 9% (m/m, m.s.) de bagaço, 15 FPU/g de celulose e 150UI/g de celulose. ....	62

## NOMENCLATURA

ASA	Massa da amostra pré-seca ou seca ao ar
ASE	Massa da amostra seca em estufa
BPC	Bioprocessamento consolidado
DNS	Reagente a base de ácido 3,5 dinitrosalicílico
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FPU	Filter Paper Unit
GOD-POD	Glicose Oxidase - Peroxidase
m.s.	Massa seca
m/m	Proporção em massa
RB	Variedades de cana-de-açúcar desenvolvidas pela RIDESA
HFS	Hidrólise e Fermentação Separadas
SP	Variedades de cana-de-açúcar desenvolvidas pela COPERSUCAR
SCFS	Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas
SFS	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
U.I.	Unidades Internacionais para a atividade da celobiase
w	Umidade contida no bagaço

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL	Agência Nacional de Energia Elétrica
COPERSUCAR	Cooperativa de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo
RIDESA	Rede Inter-Universitária para o Desenvolvimento do Setor de Açúcar e Alcool
DOE	Department of Energy (United States)

## **Capítulo 1 - Introdução e Objetivos**

### **1.1 Introdução**

A busca por novas fontes de energia e a dependência de combustíveis fósseis são preocupações que atingem atualmente muitos países, e a tendência é considerar que os combustíveis alternativos provenientes de recursos renováveis, como o etanol da biomassa celulósica, devem ser desenvolvidos e aplicados cada vez em maior escala, pois geram inúmeros benefícios em termos de proteção ambiental, desenvolvimento econômico e segurança de energia nacional (SAXENA et al., 2009; LORA e ANDRADE, 2009; YANG e LU, 2007).

Ragauskas et al. (2006) relataram que um dos mais antigos estimulantes da pesquisa química e bioquímica foram os benefícios da conversão de biomassa em combustíveis e produtos químicos. Segundo os referidos autores, no início do século 20, muitos materiais industriais como os corantes, solventes, e fibras sintéticas, eram feitos de árvores e culturas agrícolas. No final dos anos 60, muitos desses materiais bio-baseados foram substituídos por derivados do petróleo, e a crise de energia da década de 70 renovou o interesse na síntese de combustíveis e materiais de fontes naturais renováveis. Este interesse decresceu nas décadas seguintes em que o preço do petróleo diminuiu. No entanto, como consequência, o consumo de petróleo triplicou nos anos subsequentes. Na perspectiva dos autores, a demanda de energia está projetada para aumentar mais que 50% em 2025, sendo que muito deste aumento de demanda emergirá de várias nações que estarão se desenvolvendo muito rápido, e obviamente, uma demanda em ascensão para recursos finitos de petróleo não pode ser uma política satisfatória a longo prazo.

Segundo Vessia (2005), com o foco mundial em fontes de energia renováveis, a biomassa ganhou importância e atenção. Biomassa é um termo usado para caracterizar todo o material orgânico resultante de plantas, árvores, colheitas, restos orgânicos e resíduos da agricultura e de florestas. O mundo produz cerca de 11% de sua energia da biomassa, e isto significa em torno de 44 exajoules (a maioria de biomassa tradicional), mas o potencial de biomassa é considerável, totalizando, teoricamente, 2900 exajoules de bioenergia de colheitas. No contexto de aumento das preocupações ambientais e com biomassa bem distribuída pelo mundo, a opção de estender o uso da biomassa para geração de energia deveria ser seriamente considerada.

A biomassa lignocelulósica representa um dos recursos renováveis mais abundantes na terra, e certamente um dos mais baratos (OGIER et al., 1999), motivo pelo qual a mesma tem sido extensivamente estudada como fonte de energia sustentável para uso industrial. Os estudos iniciais remontam às primeiras décadas do século passado, todavia, apesar dos esforços já efetuados para o desenvolvimento do aproveitamento desta matéria prima, o único processo que pode ser considerado, na atualidade, como tecnologicamente dominado e economicamente viável, é a queima direta da matéria vegetal (SOARES e ROSSELL, 2007, disponível online).

O aproveitamento da matéria vegetal desperta grande interesse dos pesquisadores, cientistas e industriais, devido ao fato da mesma ser encontrada em grandes quantidades em vários tipos de resíduos (SOARES e ROSSELL, 2007, disponível online). Para Soares e Rossell (2007, disponível online), o Brasil possui uma condição muito especial ao considerarmos o bagaço da cana, pois o mesmo está disponível de uma forma razoavelmente limpa, em grande quantidade, e concentrada ao lado das usinas de açúcar e álcool, o que torna o bagaço da cana uma atrativa fonte de energia, tanto para queima direta como para conversão em produtos químicos, em especial o etanol.

O etanol, assim como outros biocombustíveis produzidos de biomassa de plantas, é uma boa alternativa aos combustíveis fósseis (SENDELIUS, 2005). Uma vez que o dióxido de carbono liberado durante a sua produção e uso é reciclado durante o crescimento da biomassa, a utilização desse não contribui para o aumento líquido do CO<sub>2</sub> na atmosfera, nem para o aquecimento global. Além disso, a combustão do etanol resulta em emissões relativamente baixas de compostos orgânicos voláteis, monóxido de carbono e óxidos de nitrogênio.

De acordo com Demain et al. (2005), o etanol é um excelente combustível, e em alguns aspectos é até superior à gasolina. Em particular, comparando-o com a gasolina, a queima do etanol é mais “limpa”, o etanol tem maior octanagem, pode ser queimado com maior eficiência; acredita-se que produz menores quantidades de precursores de ozônio (portanto diminuindo a poluição do ar das cidades), e é particularmente benéfico pela pequena quantidade líquida de CO<sub>2</sub> dissipada na atmosfera. O etanol é considerado menos tóxico para os humanos do que a gasolina (ou metanol), e também reduz a formação de fumaça por causa da sua baixa volatilidade; da baixa reatividade fotoquímica do etanol e dos produtos da sua combustão, e das pequenas quantidades de compostos que produzem fumaça formados em sua combustão. O seu alto calor de vaporização, sua alta octanagem, e baixa temperatura de combustão permitem um bom desempenho do motor.

As últimas estimativas preveem uma produção de 475 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e as previsões de produção futura, efetuadas pelo BNDES, consideram que atingiremos 570 milhões de toneladas no ano de 2010 e de 1 bilhão de toneladas no ano de 2021 (SOARES e ROSSELL, 2007, disponível online). Segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL, 2005, disponível online), cerca de 28% da cana é transformada em bagaço.

A despeito da reconhecida disponibilidade do bagaço nas usinas de açúcar e álcool, o uso do bagaço da cana-de-açúcar como biomassa lignocelulósica para obtenção de etanol é uma iniciativa relativamente recente (CALSAVARA et al., 1999; PANDEY et al., 2000) em relação à biomassa lignocelulósica de fontes diferentes que são utilizadas na América do Norte. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de converter a biomassa lignocelulósica de diferentes origens em combustíveis alternativos (SAHA e COTTA, 2008), porém há um número relativamente restrito de estudos focados na hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar. Segundo Finguerut (2007), o grande incentivo à transformação do bagaço e a palha da cana-de-açúcar em etanol, é que poderia ser possível aumentar muito a produção de álcool, de 50 a 100% por hectare de cana plantada, sem expandir as fronteiras agrícolas.

Diante das previsões de um rápido crescimento na produção de cana-de-açúcar, e considerando, a conseqüente abundância e disponibilidade do bagaço da cana no Brasil, a proposta do presente estudo é investigar a eficiência da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de glicose, usando diferentes alternativas de operação do procedimento de hidrólise em reator batelada.

## **1.2 Objetivos**

O objetivo geral deste estudo é testar formas alternativas de operação de reator batelada, aplicadas à hidrólise enzimática de bagaço de cana, e comparar-se a eficiência de hidrólise. Pretende-se dessa forma contribuir para o desenvolvimento de tecnologia de aproveitamento de biomassa lignocelulósica, que visa à aplicação de processos de hidrólise enzimática para a produção de etanol.

O objetivo específico da pesquisa foi utilizar três formas de operação do reator batelada, sendo (i) a batelada convencional, (ii) a batelada alimentada, e (iii) o procedimento de bateladas consecutivas, com aproveitamento do hidrolisado para readsorção da enzima. Para cada forma de operação foi determinada a glicose produzida,

pela hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado, e as três alternativas foram comparadas em relação à eficiência de hidrólise, em função da quantidade de glicose produzida.

A justificativa da seleção desses reatores, alternativos ao reator batelada convencional, está baseada no fato de que a experiência prévia com o reator batelada convencional demonstrou a ocorrência de inibição, não só pelo excesso de substrato, ou seja, altas concentrações de bagaço, como também pelos produtos da reação, como a glicose e celobiose. No entanto, altas concentrações de bagaço são desejadas, e o ideal seria obter uma solução com concentração em torno de 200 g/L de glicose após a hidrólise. A qual é obtida no caso tradicional do etanol de caldo de cana-de-açúcar e melado, pois a fermentação dessa solução produz cerca de 100 g/L de etanol, que pode ser destilado com a tecnologia já existente nas usinas. Ao contrário, uma baixa concentração de bagaço implica num xarope de glicose diluído que produzirá um vinho com baixo teor de etanol, encarecendo a etapa de destilação e o processo como um todo.

Para superar estes problemas, foi selecionado o reator batelada alimentada, porque a adição gradativa do substrato ao longo do tempo de reação permite dar sustento às premissas de que haverá uma redução da inibição pelo substrato, como também pelos produtos da reação, que serão produzidos de forma mais gradativa ao longo do período reacional.

Já o reator bateladas consecutivas, visa à separação do meio reacional líquido do resíduo de substrato sólido não reagido, e capturar a enzima, supostamente concentrada no sobrenadante líquido, da primeira batelada, pela sua adsorção em mais bagaço fresco, sendo continuada a reação entre este bagaço novo e a enzima adsorvida, por meio de bateladas sucessivas. Neste caso, as hipóteses são de que em se retirando o bagaço não reagido, diminui-se a concentração de substrato nas bateladas consecutivas e assim a inibição pelo substrato. Também a posterior etapa de adsorção da enzima, remove grande parte dos açúcares produzidos, reduzindo assim a inibição pelo produto. A enzima remanescente das bateladas consecutivas geraria uma maior produtividade de glicose por unidade de massa de enzima, do que aquela obtida no reator batelada convencional, no qual, após a primeira batelada, a enzima é descartada.

### **1.3 Estrutura da Dissertação**

Este trabalho foi dividido em cinco capítulos e referências, de forma a proporcionar uma melhor visualização da pesquisa desenvolvida e o gradual entendimento de aspectos que o influenciam relevantemente.

O primeiro capítulo apresenta uma visão geral do cenário atual, grande estimulante dessa pesquisa, a posição do Brasil neste cenário, as justificativas para se investir na produção de etanol celulósico e os objetivos que se pretende atingir.

Na Revisão Bibliográfica, segundo capítulo, expõem-se todas as fases envolvidas na produção do combustível de segunda geração, desde a estrutura da biomassa até a fermentação dos açúcares provenientes da hidrólise enzimática da mesma.

O terceiro capítulo descreve os métodos utilizados na pesquisa que gerou este trabalho, cujo foco está na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dentre estes métodos, encontram-se desde aqueles que caracterizam a enzima e o bagaço, utilizados na reação de hidrólise, até aqueles que apresentam a descrição das formas de operação do reator batelada, cujos desempenhos serão comparados.

No quarto capítulo são apresentados os resultados dos experimentos conduzidos de acordo com os métodos sumarizados no terceiro capítulo. Tais resultados são ainda analisados, comparados e justificados por evidências encontradas na literatura.

O capítulo cinco resume as conclusões obtidas no desenvolvimento da pesquisa e, baseado nestas conclusões, sugere alternativas de continuação do estudo, o qual, no momento em que se tornar economicamente viável, trará grandes contribuições em termos energéticos para a população mundial.

E por fim, relaciona-se a bibliografia referenciada ao longo da dissertação.

## Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

### 2.1 A biomassa lignocelulósica

Materiais celulósicos são compostos de lignina, hemiceluloses e celulose e são frequentemente chamados lignocelulósicos (GRAF e KOEHLER, 2000, disponível online). Biomassa lignocelulósica é composta de polímeros de carboidratos (celulose e hemiceluloses), lignina e uma pequena parte remanescente (extratos, ácidos, sais e minerais). A celulose e as hemiceluloses, que geralmente compreendem dois terços da massa seca, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares e eventualmente fermentados a etanol. A lignina não pode ser usada para a produção de etanol. (HAMELINCK et al., 2005).

A celulose é o mais abundante constituinte da parede celular no reino vegetal. É um polímero linear de D-glicose em ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ . A celulose é o principal constituinte da madeira e, por conseguinte, do papel; o algodão é quase que celulose pura. A resistência da celulose ao processamento e aos processos naturais de degradação deriva mais da sua natureza cristalina e do seu “empacotamento” biológico do que das suas ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ . Na hidrólise, o polissacarídeo é fragmentado a moléculas livres de açúcar pela adição de água. O produto, glicose, é um açúcar de seis carbonos ou hexose. (HAMELINCK et al., 2005). Na figura 2.1 apresenta-se a estrutura da celulose.

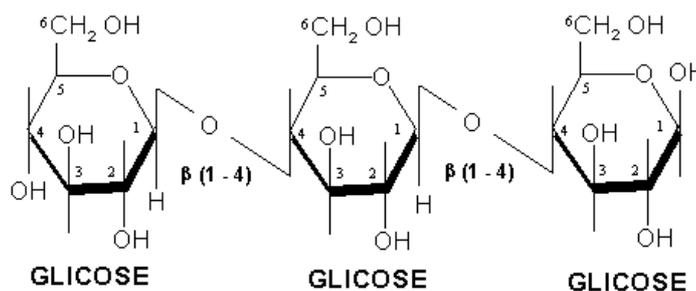


Figura 2.1 - Estrutura da celulose.

(Fonte: [www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9071/celulose.gif](http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9071/celulose.gif))

As hemiceluloses são a segunda parte mais abundante da biomassa renovável e contabilizam de 25 a 35% da biomassa lignocelulósica (SAHA, 2000). As hemiceluloses são polímeros heterogêneos constituídos de pentoses (D-xilose, D-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácidos glucorônicos (KUMAR et al., 2008). Também contém pequenas quantidades de não açúcares como grupos acetil. As hemiceluloses,

devido à sua natureza ramificada e amorfa, são relativamente fáceis de hidrolisar (HAMELINCK et al., 2005).

A lignina está presente em toda biomassa lignocelulósica. Portanto, qualquer processo de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica terá lignina como resíduo. Ela é um polímero complexo de fenilpropano e grupos metóxi, uma substância polifenólica não-carboidratada que incrusta a parede das células e mantém as células juntas. É degradada por poucos organismos em produtos como ácidos orgânicos, fenóis e vanilina. Via processos químicos aditivos valiosos de combustíveis podem ser produzidos (HAMELINCK et al., 2005).

Para que as enzimas degradem a lignocelulose eficientemente, as fibras precisam estar acessíveis às enzimas. Um pré-tratamento de alguma forma é necessário para expor as fibras (SENDELIUS, 2005). O pré-tratamento se refere à solubilização e à separação de um ou mais dos quatro principais componentes da biomassa: hemiceluloses, celulose, lignina e extratos, para tornar a biomassa sólida mais acessível a posteriores tratamentos. A hidrólise (sacarificação) quebra as ligações de hidrogênio nas frações de hemiceluloses e celulose em pentoses e hexoses. Esses açúcares podem ser fermentados a etanol (GRAF e KOEHLER, 2000, disponível online). Se o pré-tratamento for muito agressivo, os açúcares liberados podem ser degradados a compostos inibidores de enzimas, diminuindo o rendimento. Entretanto, o uso de condições muito brandas de pré-tratamento resulta em pequena acessibilidade para a enzima, também diminuindo o rendimento do processo de hidrólise (SENDELIUS, 2005).

### ***2.1.1 O bagaço de cana-de-açúcar***

O bagaço de cana-de-açúcar tem sido caracterizado como um subproduto obtido após a extração de sacarose dos colmos das plantas de cana, e tem sido apontado como uma importante fonte de recurso para a indústria (RASUL et al., 1999). Rasul et al. (1999) descreveu o bagaço como um material fibroso, de baixa densidade, com distribuição variada de tamanhos de partículas e elevada umidade. Como fonte de recurso para a indústria, o bagaço de cana tem sido usado, por exemplo, para preparar carvão ativado para remoção de poluentes (KALDERIS et al., 2008). A capacidade de adsorção do bagaço modificado (anidrido succínico foi usado para introduzir o grupo funcional ácido carboxílico) foi testada em solução de  $Zn^{2+}$  e em efluente de processo de galvanização por Pereira et al. (2009), e Mulinari e Silva (2008) utilizaram a celulose do bagaço de cana

modificada para a adsorção de íons sulfato de soluções aquosas. No Brasil, a utilização do bagaço da cana-de-açúcar tem sido proposta como uma alternativa para a alimentação animal (PIRES et al., 2006), como matéria prima adicional para a produção de etanol, no programa de bioetanol brasileiro (ZANIN et al., 2000), e para a obtenção de filme de celulose (RUZENE et al., 2009).

O potencial biotecnológico do bagaço da cana-de-açúcar para ser utilizado em processos de bioconversão usando microorganismos tem sido destacado como uma fonte promissora em relação a outras fontes de bagaço, nas investigações de Pandey et al. (2000). Esses investigadores registraram que devido ao baixo teor de cinzas, o bagaço de cana-de-açúcar oferece vantagens em processos de bioconversão que utilizam culturas de microorganismos quando comparado à palha de milho e de trigo, as quais apresentam teores de cinzas de 17,5% e 11%, respectivamente. Além disso, os referidos investigadores destacaram que em comparação com outros resíduos agrícolas, o bagaço pode ser considerado um grande reservatório de energia solar devido aos seus elevados teores de produção (cerca de 80 t/ha em comparação com 1, 2 e 20 t/ha para o trigo, outras gramíneas e árvores, respectivamente) e sua capacidade de regeneração (PANDEY et al., 2000). Ao longo dos anos, um grande número de microorganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos têm sido cultivados no bagaço; os fungos filamentosos, especialmente os basidiomicetos, têm sido mais usados pelos pesquisadores para a produção de enzimas e enriquecimento protéico (PANDEY et al., 2000).

No bagaço de cana-de-açúcar, a celulose é descrita como um constituinte encontrado em alta proporção, que pode ser isolada dos outros componentes denominados hemiceluloses e lignina. A perspectiva de utilizar a celulose do bagaço para a produção de diversos derivados da celulose tem estimulado investimentos no sentido de descrever metodologias adequadas para isolar e caracterizar as microfibrilas de celulose extraídas do bagaço (CERQUEIRA et al., 2007; BHATTACHARYA et al., 2008). Cerqueira et al. (2007) descreveram a composição do bagaço como sendo composto principalmente de celulose (30 – 50%) e lignina numa menor proporção (20 – 24%). O estudo de Peng et al. (2009) descreveu a proporção de celulose como sendo em torno de 40 - 45%, a de hemiceluloses como sendo 30 - 35%, e de 20 a 30% de lignina. A caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol, descrito por Canilha et al. (2007) mostrou uma composição de celulose ( $46,08 \pm 0,08\%$ ), hemiceluloses ( $27,11 \pm 0,15\%$ ) e lignina ( $23,19 \pm 0,36\%$ ) semelhante as previamente reportadas na literatura. Proporções maiores do que 50% de celulose ( $54,87 \pm 0,53\%$ ) no bagaço de cana-de-açúcar de origem

brasileira foram descritas por Guimarães et al. (2009). Anselmo Filho e Badr (2004) mostraram que a composição do bagaço pode ser diferenciada e dependente da região onde a cana-de-açúcar é cultivada. Sun et al. (2004) e Peng et al. (2009) elucidaram a composição química, as propriedades físico-químicas e as estruturas de oito hemiceluloses presentes no bagaço de cana.

## 2.2 Pré-tratamento

Na literatura especializada são encontradas diversas metodologias alternativas para aumentar a eficiência dos processos de produção de etanol a partir da hidrólise enzimática da biomassa de lignocelulose de diferentes origens. Pois o etanol assim produzido pode ser usado como combustível, em substituição aos combustíveis fósseis.

Muitos desses estudos têm sido feitos para otimizar as condições de pré-tratamento do material lignocelulósico, dado que esta etapa do processo é considerada por alguns investigadores como sendo o fator determinante do custo do processo de obtenção de etanol a partir de biomassa de diferentes origens (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000; BALLESTEROS et al., 2002; SCHELL et al., 2003; SÖDERSTRÖM et al., 2004; ZHU et al., 2005; ALIZADEH et al., 2005; WYMAN et al., 2005; HU e WEN, 2008; MARTIN et al., 2008; PETERSEN et al., 2009; RODGERS et al., 2009).

De acordo com Baudel (2006, disponível online) o pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar consideravelmente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo. Basicamente, o pré-tratamento consiste em: operações de preparação de matéria-prima (moagem, impregnação), hidrólise (ácida ou enzimática) da celulose (carga e consumo de enzimas ou ácidos, taxas de reação), geração de produtos inibidores à hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, concentrações sacarídeas dos hidrolisados produzidos, purificação de produtos intermediários, tratamento de resíduos, agitação mecânica e geração de energia. Neste contexto, deve-se buscar perfeita integração entre as diversas operações. O desempenho de uma técnica de pré-tratamento deve ser avaliado em função de sua influência sobre os custos associados às etapas precedentes e subsequentes, bem como sobre os custos operacionais, de matéria-prima e de capital.

Demain et al.(2005) explicam que a lignocelulose é difícil de ser quebrada por estar associada com as hemiceluloses; estar coberta por uma capa de lignina que está ligada covalentemente às hemiceluloses; e ter em sua maior parte uma estrutura cristalina com seis ligações de hidrogênio, quatro intramoleculares e duas intermoleculares, conferindo a

ela uma estrutura altamente ordenada e empacotada. As metas do pré-tratamento são: aumentar a área superficial da celulose ao remover a capa de lignina, solubilizar as hemiceluloses; romper a cristalinidade e/ou aumentar o volume dos poros. Ao atingir esses objetivos a perda de açúcar e o consumo de energia são minimizados, e a digestão enzimática é maximizada na hidrólise do material (CONVERSE et al., 1990).

Uma investigação minuciosa foi feita por Chang e Holtzaple (2000) no sentido de mostrar que quanto menor for o teor de lignina no material a ser hidrolisado, maior a eficiência da hidrólise enzimática. Pan et al. (2005) também indicaram aumento na eficiência da hidrólise com a redução de lignina residual durante a hidrólise enzimática. Liao et al. (2005) registraram que a produção de glicose foi três vezes maior em fibras de adubo orgânico pré-tratadas com ácido clorídrico diluído para a remoção de hemiceluloses e lignina; as indicações destes autores são de que as hemiceluloses e a lignina inibem parcialmente a enzima celulase, fisicamente ou quimicamente, prevenindo a ligação desta com a celulose.

A Figura 2.2 apresenta as metas do pré-tratamento.

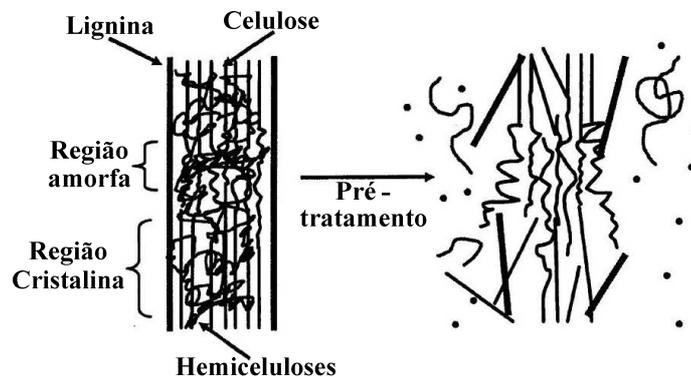


Figura 2.2 - Esquema das metas do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (Fonte: MOSIER et al., 2005).

### 2.2.1 Categorias de Pré-tratamento

De acordo com Vessia (2005) as tecnologias de pré-tratamento são diversificadas e numerosas, mas podem ser divididas em quatro grupos principais: pré-tratamento físico, físico-químico, químico e biológico.

#### 2.2.1.1 Pré-tratamento físico

Segundo Baudel (2006, disponível online), os métodos físicos (e.g. pelletização, moagem) convertem a biomassa em pós finos, incrementando a superfície específica da

celulose, de modo que a hidrólise da mesma ocorre com relativa facilidade. A maior desvantagem associada a este método consiste no elevado consumo energético. No caso do bagaço, pode-se considerar que a moagem da cana configura uma operação de pré-tratamento da fibra.

Segundo Sun e Cheng (2002), o material pode passar por um processo de redução de tamanho para reduzir a cristalinidade da celulose. O tamanho do material é geralmente de 0,2-2 mm depois da moagem. O moinho de bolas vibratórias tem sido indicado como mais efetivo em reduzir a cristalinidade da celulose e melhorar a digestibilidade da biomassa do que o moinho de bolas comum.

Baudel (2006, disponível online) ainda cita outras opções de pré-tratamentos físicos como a irradiação da fibra celulósica com raios- $\gamma$ , que promove uma cisão das ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas da celulose. Deste modo, ocorre incremento da superfície específica e redução da cristalinidade da celulose, o que tende a aumentar a taxa de hidrólise da mesma. Este método, entretanto, é considerado como de custo excessivamente elevado para ser implementado em escala industrial. Outra opção é o pré-tratamento da biomassa mediante pirólise. Contudo, de acordo com Sun e Cheng (2002), essa técnica demanda a utilização de temperaturas muito elevadas (superiores a 300 °C), ocorrendo rápida decomposição da celulose com produção de compostos gasosos e formação de resíduos de alcatrão.

### 2.2.1.2 Pré-tratamento químico

#### *a. Ozonólise*

O ozônio pode ser usado para degradar lignina e as hemiceluloses em muitos materiais lignocelulósicos, como o bagaço (NEELY, 1984). No experimento de Neely (1984), a degradação foi essencialmente limitada à lignina. As hemiceluloses foram levemente atacadas, entretanto a celulose praticamente não foi afetada. A taxa de hidrólise enzimática aumentou cinco vezes, devido à remoção de 60% da lignina presente na palha de trigo pelo pré-tratamento com ozônio. Tal pré-tratamento tem as seguintes vantagens: remove eficientemente a lignina; não produz resíduos tóxicos para os processos subsequentes; e as reações ocorrem à temperatura e pressão ambientes (VIDAL e MOLINIER, 1988). No entanto, de acordo com Sun e Cheng (2002), uma grande quantidade de ozônio é requerida, tornando o processo caro.

**b. Pré-tratamento ácido**

Usa ácidos sulfúrico ou nítrico diluídos. De todos os pré-tratamentos químicos conhecidos, o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (0,6–1,2%, temperatura acima de 140 °C) tem sido favorável para a aplicação industrial por atingir altas taxas de reação e melhorar significativamente a hidrólise da celulose (ESTEGHLALIAN et al., 1997)

Martin et al. (2007) estudaram o potencial da pré-hidrólise com ácido diluído como um método de pré-tratamento para o bagaço de cana. A pré-hidrólise foi conduzida a 122 °C durante 20, 40 ou 60 min. Usando 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em uma proporção em massa de 1:10 (sólido: líquido) a formação de açúcar aumentava com o aumento do tempo de reação. Xilose, glicose, arabinose e galactose foram detectadas no pré-hidrolisado. As hemiceluloses do bagaço foram hidrolisadas a altas concentrações de xilose e arabinose (19,1 e 2,2 g/L, respectivamente), e a uma conversão de xilanas de mais de 80% foi obtida. A pré-hidrólise com ácido diluído resultou em um aumento de 2,7-3,7 da conversibilidade enzimática do bagaço de cana.

**c. Pré-tratamento com ácido diluído em reatores de fluxo**

É o pré-tratamento em reatores *de fluxo* com adição de ácido sulfúrico bastante diluído (em torno de 0,07%), ou seja, em concentrações muito inferiores às aquelas empregadas nos sistemas em batelada (0,7 - 3,0%). Temperaturas moderadas (140 - 170 °C) são utilizadas no primeiro estágio para hidrolisar a fração hemicelulósica mais reativa, enquanto no segundo estágio se utilizam condições mais severas (180 - 200 °C), visando hidrolisar as hemiceluloses mais recalcitrantes (MOSIER et al., 2005; BAUDEL, 2006, disponível online). Cerca de 30% - 50% da lignina são extraídas, enquanto aproximadamente 80% - 95% das hemiceluloses (majoritariamente sob a forma de monômeros) são recuperadas. A polpa pré-tratada apresenta elevada reatividade de fibra, com digestibilidade enzimática da ordem de 90%. Entretanto, o processo demanda configurações de equipamento complexas, além de elevado hidromódulo, bem como elevado consumo de água e energia (BAUDEL, 2006, disponível online).

De acordo com Soares e Rossell, (2007, disponível online) a empresa DEDINI construiu uma unidade semi-industrial pioneira, utilizando processo patenteado e denominado de DEDINI HIDRÓLISE RÁPIDA (DHR), o qual utiliza reator contínuo e inclui a tecnologia de remoção da lignina. Por meio do processo por solvente orgânico

(Organosolv) com a hidrólise ácida diluída, esta unidade está em operação experimental na Usina São Luiz, localizada em Pirassununga, estado de São Paulo.

**d. Pré-tratamento alcalino**

O pré-tratamento alcalino usa bases como hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio. Com esse pré-tratamento toda lignina e parte das hemiceluloses são removidas, e a reatividade da celulose para posterior hidrólise é suficientemente aumentada. Os custos do reator são menores do que aqueles para tecnologias ácidas. No entanto, o uso destes sais em altas concentrações, além de representar elevados custos, cria preocupações ambientais e podem levar a custos de tratamento de efluentes, reciclados e resíduos proibitivos. Métodos alcalinos são geralmente mais efetivos em solubilizar uma grande fração da lignina, enquanto deixam muito das hemiceluloses numa forma polimérica insolúvel (HAMELINCK et al., 2005).

**e. Deslignificação Oxidativa**

A biodegradação da lignina pode ser catalisada por uma enzima peroxidase na presença de  $H_2O_2$  (AZZAM,1989). O pré-tratamento de bagaço de cana com peróxido de hidrogênio aumentou bastante sua suscetibilidade à hidrólise enzimática. Cerca de 50% da lignina e maior parte da celulose foram solubilizadas por 2% de  $H_2O_2$  a 30 °C depois de 8 horas e 95% de eficiência de produção de glicose da celulose foi alcançada na sacarificação subsequente pela celulase a 45 °C por 24 horas (AZZAM,1989).

**f. Processo Organosolv**

No processo Organosolv, um solvente orgânico ou uma mistura aquosa de solventes orgânico com um ácido inorgânico (HCl ou  $H_2SO_4$ ) como catalisador é usada para romper as ligações internas entre a lignina e as hemiceluloses. Os solventes orgânicos usados no processo incluem metanol, etanol, acetona, etileno glicol, trietileno glicol e álcool tetrahidrofurfuril (CHUM et al., 1988; THRING et al., 1990). Ácidos orgânicos como oxálico, acetilsalicílico e salicílico também podem ser usados como catalisadores no processo Organosolv (SARKANEN, 1980). À altas temperaturas (acima de 185 °C), a adição de catalisador foi desnecessária para deslignificação satisfatória (SARKANEN,

1980; AZIZ e SARKANEN, 1989). Para reduzir os custos, os solventes usados no processo precisam ser drenados do reator, evaporados, condensados e reciclados. A remoção dos solventes do sistema é necessária, pois podem inibir o crescimento dos organismos, a hidrólise enzimática e a fermentação (SUN e CHENG, 2002).

### 2.2.1.3 Pré-tratamento físico-químico

#### *a. Explosão a vapor*

Sun e Cheng (2002), em sua revisão, explicam o funcionamento desse método. Nele a biomassa é aquecida com vapor saturado de alta pressão e atinge temperaturas relativamente elevadas, para em seguida, a pressão ser repentinamente reduzida, o que faz com que a biomassa passe por uma descompressão explosiva e auto-hidrólise pela formação de ácidos orgânicos. O processo causa a hidrólise das hemiceluloses e a cisão de algumas ligações entre a celulose e a lignina. Mosier et al. (2005) encontraram na literatura evidências que levam a crer que as hemiceluloses são hidrolisadas pelo ácido acético e outros ácidos liberados durante o pré-tratamento de explosão por vapor.

Ainda de acordo com Mosier et al. (2005), as maiores mudanças químicas e físicas na biomassa lignocelulósica causadas pela explosão a vapor são frequentemente atribuídas à degradação das hemiceluloses. Isto melhora a acessibilidade das enzimas às fibras de celulose. A redução do tamanho de partícula da biomassa e o aumento do volume dos poros, depois da descompressão explosiva, são menos importantes no melhoramento da digestibilidade da biomassa lignocelulósica explodida por vapor.

Baudel (2006, disponível online) descreve a origem do método como sendo o processo sueco Masonite de produção de aglomerados de madeira. Quando um material lignocelulósico é aquecido a temperaturas relativamente elevadas com vapor saturado, seguido de uma súbita descompressão do equipamento, produz-se uma mistura de cor marrom resultante da fragmentação da biomassa. Após lavagem do material, separação do líquido e adição de adesivos, produz-se o aglomerado de madeira. No Brasil, a empresa Madeira Sintética, localizada em Alagoas, tem utilizado bagaço de cana na produção de aglomerados para a indústria moveleira.

### ***b. Hidrotermólise***

De acordo com Mosier et al. (2005), a hidrotermólise, também denominada solvólise não-catalítica ou “aquasolv” utiliza água comprimida em contato com a biomassa durante até 15 minutos sob temperaturas entre 200 e 230 °C. Nestas temperaturas, a água promove a cisão das ligações hemiacetálicas dos carboidratos, liberando ácidos durante a hidrólise da biomassa. Entre 40 e 60% da biomassa é dissolvida no processo, com remoção de celulose variando entre 4 e 22%, remoção de lignina de 35 a 60% e remoção total das hemiceluloses. Acima de 90% das hemiceluloses são recuperadas como açúcares monoméricos quando se usa ácido como catalisador da hidrólise do líquido produzido.

Mosier et al.(2005) ilustram os principais tipos de configurações de reatores de água quente líquida. Configurações de reatores de fluxo e batelada em contra-corrente e co-corrente podem ser utilizadas. Nos reatores de fluxo, a água quente passa por um leito fixo de biomassa, promovendo a hidrólise dos componentes lignocelulósicos, os quais são transportados para fora do reator. Remove-se grande quantidade de lignina (35 a 60%) neste processo (BAUDEL, 2006, disponível online).

Segundo Baudel (2006, disponível online) o processo de hidrotermólise apresenta desvantagens importantes em relação ao sistema por explosão a vapor. Reduzidas cargas de sólidos (de 1 a 8%) devem ser utilizadas, em razão da formação de inibidores nos hidrolisados produzidos ao se utilizar concentrações de sólidos superiores a 10%. A quantidade de água utilizada no processo de hidrotermólise geralmente é muito superior àquela empregada no processo por explosão a vapor, produzindo hidrolisados muito diluídos, o que tende a provocar problemas operacionais nas etapas subsequentes do sistema integrado.

### ***c. Explosão da Fibra com Amônia***

É um pré-tratamento que envolve amônia líquida e explosão com vapor (HAMELINCK et al., 2005). Nele o material lignocelulósico é exposto à amônia líquida em altas temperaturas e pressões por um período de tempo, então a pressão é subitamente reduzida. A explosão da fibra com amônia não solubiliza as hemiceluloses significativamente quando comparado ao pré-tratamento ácido (SUN e CHENG, 2002). Esse pré-tratamento pode ser aplicado a diversos materiais. Holtzaple et al. (1991) aplicaram-no ao bagaço de cana, com 15% de teor de lignina, e obtiveram acima de 90% de hidrólise de celulose e hemiceluloses. Já para materiais com uma porcentagem maior de

lignina, como o papel de jornal (18 a 30% de lignina), o tratamento não se apresentou tão eficiente, sendo o rendimento da hidrólise para o material de apenas 40%, segundo McMillan (1994).

#### **d. Explosão com CO<sub>2</sub>**

A explosão com CO<sub>2</sub> é similar à explosão com vapor e amônia, e também é usada no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. O método se caracteriza pela formação de ácido carbônico e aumento da taxa de hidrólise das hemiceluloses. Quando aplicado ao bagaço de cana, esse método mostrou ser mais eficiente do ponto de vista econômico que a explosão com amônia, além de não produzir os inibidores de fermentação gerados no pré-tratamento com vapor (ZHENG et al., 1998).

Segundo Baudel (2006, disponível online), sistemas de pré-tratamento utilizando CO<sub>2</sub> como agente de hidrólise, como o de explosão com CO<sub>2</sub> podem ser considerados como alternativas tecnológicas potencialmente interessantes no longo prazo, para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando o CO<sub>2</sub> produzido na etapa de fermentação alcoólica.

#### **2.2.1.4 Pré-tratamento biológico**

Costa et al. (2002) estudaram o pré-tratamento biológico do bagaço de cana com três espécies de fungos *Panus tigrinus*. O potencial do fungo de deslignificação foi analisado pela determinação da composição química de amostras do bagaço degradado, e a seletividade determinada em termos do decaimento de peso dos diferentes compostos analisados. Todas as linhagens cresceram abundantemente tendo o bagaço como única fonte de carbono. Depois de determinada a composição química do bagaço degradado o *P. tigrinus* FTPT-4745 foi selecionado como a linhagem mais eficiente em pequena escala (6 g), uma vez que os carboidratos foram preservados.

Outras propostas, mais recentes, de usar fungos filamentosos com potencial para oxidar lignina, têm sido apresentadas por alguns investigadores (SÁNCHEZ, 2009; CAMASSOLA e DILLON, 2009). Sánchez (2009) apresentou uma relação das enzimas e da caracterização destas, produzidas pelos fungos com potencial de oxidar lignina (*Phanerochaete chrysosporium*, *Botrytis cinerea*, *Stropharia coronilla*). A expectativa é a

biodegradação de lignocelulose em substituição aos diversos processos físicos e químicos usuais nos pré-tratamentos.

### 2.3 Hidrólise Enzimática

O processamento de materiais lignocelulósicos à etanol consiste de quatro principais operações: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/purificação do produto. Apesar de várias configurações de processos terem sido estudadas para a conversão de biomassa celulósica em etanol, a hidrólise enzimática da celulose fornece oportunidades para melhorar a tecnologia, de forma que o etanol de biomassa lignocelulósica seja competitivo quando comparado a outros combustíveis líquidos em larga escala (WYMAN, 1999).

A hidrólise enzimática da celulose é feita por enzimas do complexo celulase que são altamente específicas. Os produtos da hidrólise são geralmente açúcares redutores incluindo glicose.

As evidências de que as celulasas podem ser inibidas pelo produto da reação de sacarificação, ou por altas concentrações de substratos, têm conduzido muitos trabalhos com materiais lignocelulósicos a processos em que as reações de sacarificação e de fermentação ocorrem simultaneamente. No processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS), a hidrólise, que conduz à produção de açúcares monoméricos, ocorre simultaneamente com a fermentação para a conversão dos açúcares em etanol. O SFS tem sido considerado como um processo interessante e superior ao de Hidrólise e Fermentação Separadas (HFS) porque a subsequente conversão dos açúcares produzidos na hidrólise, a etanol pela fermentação, evita que os açúcares gerados na hidrólise atuem como inibidores da enzima celulase. Schell et al. (1999) relacionaram em seu artigo os aspectos positivos e negativos de cada um desses processos de hidrólise. Esses autores testaram as concentrações de sólidos de 7,5; 12,8; e 18,0% (m/m), com 7,0; 21,5 e 36 FPU/g celulose de atividade enzimática, e conforme a expectativa dos investigadores, a produção de glicose aumentou com aumento da carga da enzima e diminuiu com o aumento da concentração de sólidos. O máximo de monômeros e de produção de glicose total, de 85 a 89%, respectivamente, foi alcançada com 36 FPU/g de celulose e 7,5% (m/m) de sólidos.

A comparação dos dois processos HFS e SFS com temperaturas diferentes (200 °C ou 217 °C) e tempo de pré-tratamento diferentes (3 ou 10 min) feita por Alfani et al (2000), mostrou que o processo SFS requereu menor tempo (30 h) do que HFS (96 h) e resultou

em maior produção de etanol (quase três vezes maior). Castano e Mejia (2008) também relataram que o processo SFS apresenta uma redução de tempo e energia para a produção de etanol a partir de mandioca, e mostraram que a concentração de etanol não afeta o processo de sacarificação. Entretanto, já há evidências de que no sistema SFS também ocorre a formação de substâncias adicionais devido a reações do etanol com monômeros de açúcares produzidos na sacarificação. Zhang et al. (2009) verificaram que a celulase derivada de *T. reesei* converte xilano, e também pode converter outros monossacarídeos, em substâncias complexas na presença de etanol.

Por outro lado, Marques et al. (2008) verificaram que o processo HFS gerou uma concentração de etanol igual a 19,6 g/L, superior à concentração de etanol igual a 18,6 g/L verificada no processo SFS; entretanto. Essa maior concentração de etanol foi obtida num tempo quase quatro vezes maior (179 horas) do que a obtida no processo SFS com apenas 48 horas de incubação. Esses investigadores verificaram que nas preparações com 50 °C e pH 5,5, usando altas doses de enzima (120 U/g de carboidrato), a sacarificação ocorreu numa extensão relativamente baixa (45%) após 6 dias (144 horas) de incubação, e admitiram que o baixo rendimento obtido foi determinado pela baixa termo estabilidade da enzima a 50 °C. Tais evidências foram consideradas estar em concordância com outros experimentos (GALBE e ZACCHI, 2002) que mostram que a temperatura ótima para a sacarificação enzimática não é somente uma função do material e fonte da enzima, mas é também dependente do tempo de incubação.

Vessia (2005) cita ainda outra forma de se processar a hidrólise, a sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas (SCFS), em que a hidrólise enzimática da celulose e fermentação das pentoses e hexoses ocorrem em um estágio do processo. A hidrólise das hemiceluloses da corrente resultante ocorre em um estágio separado.

No Bioprocessamento Consolidado (BPC), descrito por Lynd (1996), o etanol e todas as enzimas requeridas são produzidas por uma única comunidade de microrganismos, em um único reator. O BPC parece ser o ponto final lógico da tecnologia de conversão de biomassa. A aplicação do BPC não implica em nenhum custo adicional de capital ou operacional para a produção da enzima, e reduz a diversificação de substratos para produção da enzima ou para os sistemas enzimáticos e fermentativos compatíveis. Contudo, ainda não há organismos ou combinações compatíveis de microrganismos que viabilizem o processo.

A quantidade de substrato sólido usado para as reações de hidrólise enzimática é outro parâmetro físico importante que afeta a eficiência da hidrólise da celulose. Uma

elevada quantidade de substrato sólido foi considerada como uma estratégia prática e economicamente mais adequada. Entretanto, a expectativa de alguns investigadores de aumentar a produção de etanol aumentando a quantidade de substrato não foi uma alternativa inteiramente satisfatória. Nos experimentos de Varga et al. (2004) usando o processo SFS, o aumento na quantidade de substrato (massa seca: m.s.; milho seco) (12% m.s.) inibiu a fermentação. Os autores justificaram a redução na produção de etanol em razão de que um o aumento na quantidade de massa não transferida na reação pode causar a formação de uma goma hidratada; em concentrações altas do substrato a enzima não consegue liquefazer o material fibroso pré-tratado, o que determina uma baixa taxa de sacarificação, levando à uma baixa produção de etanol (cerca de 5%). O rendimento máximo em etanol (87%) ocorreu com 8% m.s.. Na tentativa de contornar o efeito negativo do aumento de massa do substrato na reação, os investigadores adotaram a alternativa de aumentar gradativamente a concentração do substrato em intervalos de 5 h até alcançar 12%.

Esse procedimento descrito como operação ou hidrólise em batelada alimentada, tem sido recomendado como alternativa para aumentar a produção de etanol, aumentando a quantidade de substrato (FAN et al., 2003). Na hidrólise por batelada alimentada, o substrato e/ou as enzimas são adicionados ao reator gradativamente e o substrato sólido é degradado gradativamente, de modo que a mistura se torna mais fluida, e maior quantidade de sólido pode ser adicionada (RUDOLF et al., 2005). A hidrólise em batelada alimentada tem sido considerada como um processo promissor para a hidrólise de material lignocelulósico por alguns autores (LIAO et al., 2005; CHEN et al., 2008; HODGE et al., 2009), que recomendam o uso e a otimização deste processo. A comparação da hidrólise enzimática em reator de batelada e de batelada alimentada analisada por Zheng et al (2009) mostrou que a concentração de glicose produzida nos dois sistemas foi equivalente nas primeiras 24 horas. Mas indicou que o sistema de batelada alimentada pode ser considerado mais eficiente, porque enquanto o sistema batelada requer concentração baixa de substrato, concentração alta de enzimas, e tempo prolongado de hidrólise, a batelada alimentada pode ser feita com concentrações altas de substrato alimentadas gradativamente e usando concentrações baixas de enzimas, o que pode diminuir o custo do processo de destilação e recuperação de etanol. Após as primeiras 24 horas de reação, esses autores registraram maiores concentrações de glicose, e menor inibição das enzimas no sistema de batelada alimentada. Já Rosgaard et al. (2007) que aplicaram uma estratégia de batelada alimentada à hidrólise da palha de cevada pré-tratada, concluíram que a alimentação

gradual de substrato resultou em menores rendimentos de glicose, mesmo quando a enzima foi alimentada juntamente com o substrato.

### 2.3.1 Celulases

A procura pelas causas biológicas da hidrólise da celulose começou na Segunda Guerra Mundial, quando o exército americano montou um programa de pesquisa para entender as causas da deterioração de roupas e equipamentos militares nas selvas do Sul do Pacífico. A consequência deste evento foi a identificação do que se tornou um dos mais importantes organismos no desenvolvimento de enzimas celulase, o microrganismo *Trichoderma viride* (eventualmente renomeado *Trichoderma reesei*). Este fungo, *Trichoderma reesei*, de fato produzia enzimas celulase, as quais hidrolisam celulose (DOE, 2007, disponível online).

Ironicamente, inicialmente a pesquisa em celulases foi estimulada pela necessidade de prevenir o ataque hidrolítico da celulose. Hoje, recorre-se a esta enzima de forma a aumentar o seu poder hidrolítico. Esta mudança no foco da pesquisa de celulase não ocorreu até o início dos anos 60, quando os açúcares provenientes da hidrólise da celulose foram reconhecidos como uma possível fonte de alimento (DOE, 2007, disponível online).

A primeira aplicação destas enzimas na hidrólise da madeira no processo de etanol foi simplesmente substituir a etapa de hidrólise ácida da celulose por uma etapa de hidrólise enzimática por celulase. O que apresenta várias vantagens: as condições brandas de processo geram altos rendimentos, e os custos de manutenção são baixos comparados à hidrólise ácida ou alcalina (não há problema de corrosão). O processo é compatível com a maioria dos processos de pré-tratamento, apesar de métodos puramente físicos serem tipicamente inadequados (GRAF e KOEHLER, 2000, disponível online).

De acordo com McMillan (1994), a susceptibilidade de substratos celulósicos às celulases depende de fatores estruturais do substrato incluindo a cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, a área superficial e a quantidade de lignina presente no substrato. A lignina interfere na hidrólise ao bloquear o acesso das celulases à celulose ao ligar-se irreversivelmente à enzima.

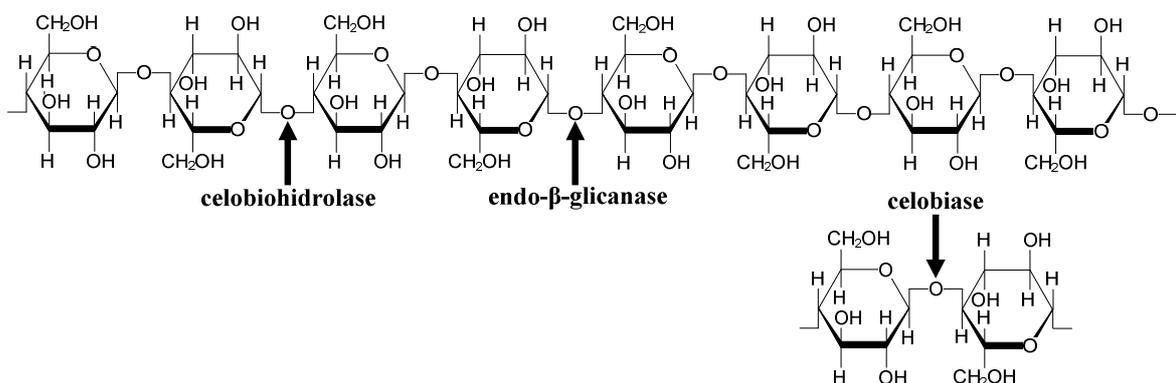
Trabalhos prévios focados no reciclo da celulase mostram que o reuso da celulase pode manifestar menores períodos de incubação, assim como aumentar a eficiência e diminuir o custo da hidrólise enzimática. No entanto, a presença de lignina tem atuado como limitante da eficiência da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, e portando na eficiência de reciclo de celulase (LU et al., 2002).

De várias formas, no entanto, o entendimento da celulase é incipiente quando comparado à outras enzimas. Existem algumas boas razões para isso. O sistema celulose-celulase envolve enzimas solúveis atuando em substratos insolúveis. O aumento de complexidade quando comparado a sistemas homogêneos enzima substrato é imenso (DOE, 2007, disponível online).

Três principais classes de enzimas celulase são conhecidas atualmente: (DOE, 2007, disponível online; COUGHLAN e LJUNGDAHL, 1988; KUMAR et al., 2008).

- Endoglicanase (EG, endo-1,4-glicanohidrolase, ou EC-3.2.1.4) catalisam a ruptura aleatória das ligações internas da cadeia de glicose.
- Exoglicanase ou celobiohidrolase (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glicana-celobiohidrolase, EC-3.2.1.91) que incluem glicano hidrolases, que preferencialmente liberam monômeros de glicose do final da cadeia da celulose e celobiohidrolases que, preferencialmente, liberam celobiose (dímeros de glicose) do final livre da cadeia de celulose.
- celobiase ( $\beta$ -D-glicosídeo-glicohidrolase, EC-3.2.1.21), atuam apenas em celooligosacarídeos e celobiose, e por sua vez, liberam monômeros de glicose da celobiose.

A Figura 2.3 ilustra o local de atuação da endoglicanase e da exoglicanase na molécula de celulose e da celobiase na molécula de celobiose.



**Figura 2.3 - Estrutura molecular da celulose e local de ação da endo-glicanase, celobiohidrolase e  $\beta$ -glicosidase.**

(Fonte: Kumar et al., 2008)

Segundo Duff e Murray (1996), além dos três principais grupos de enzimas celulase, há ainda enzimas auxiliares que atacam as hemiceluloses, como a glicoronidase, acetilesterase, xilanase,  $\beta$ -xilosidase, galactomanase e glicomanase. Durante a hidrólise enzimática, a celulose é degradada pelas celulasas à açúcares redutores que podem ser fermentados a etanol por leveduras ou bactérias (SUN e CHENG, 2002). A importância de um sistema de celulasas que atacam a celulose cristalina está na observação de que a maioria dos pré-tratamentos que aumentam a área superficial também aumentam a cristalinidade. Estes incluem ácido sulfúrico, base e etilenodiamina diluídos (DEMAIN et al., 2005).

### ***2.3.2 Aprimorando a hidrólise enzimática***

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose incluem a concentração e o tipo do substrato, a atividade da celulase, e as condições de reação (temperatura, pH, assim como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e velocidade da hidrólise enzimática, as pesquisas tem se focado em aperfeiçoar o processo de hidrólise e aumentar a atividade da celulase (SUN e CHENG, 2002). Uma visão simplificada dos fatores limitantes da hidrólise enzimática da celulose por celulasas está apresentada na Figura 2.4. Nela a celulose está representada pelas linhas retas e os fatores limitantes de sua hidrólise estão numerados de 1 a 6. O índice 1 representa a inibição pelo produto das celobiasas e celobiohidrolases pela glicose e celbiose, respectivamente. O número 2 ilustra a ligação improdutiva das celobiohidrolases na cadeia de celulose. Devido à forte ligação da cadeia de celulose no sítio ativo das celobiohidrolases, obstáculos podem fazer a enzima parar e se tornar uma ligação inativa. Os números 3 e 4 indicam as hemiceluloses ou lignina associadas com as microfibrilas, ou cobrindo-as, impedindo as celulasas de terem acesso à superfície da celulose. O índice 5 mostra que as enzimas (celulase e hemicelulase) podem ficar adsorvidas em superfícies ou partículas da lignina. Já o número 6 representa a desnaturação ou perda de atividade das enzimas que podem ocorrer por estresse mecânico, atividade proteolítica ou pequena termoestabilidade (JORGENSEN et al., 2007).

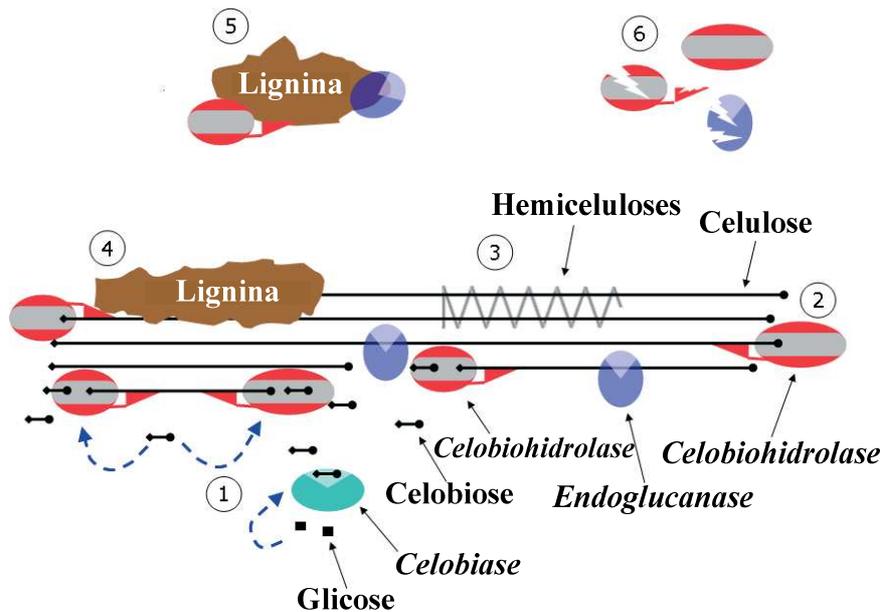


Figura 2.4 - Uma visão simplificada dos fatores limitantes da eficiência da hidrólise da celulose (JORGENSEN et al., 2007)

A concentração de substrato é um dos principais fatores que afetam o rendimento e velocidade inicial de da hidrólise enzimática da celulose. Segundo Cheung e Anderson (1997) à baixas concentrações de substrato, um aumento na concentração de substrato, da temperatura e da concentração de enzimas, normalmente resulta num aumento de rendimento e velocidade da hidrólise.

No entanto, Huang e Penner (1991) e Penner e Liaw (1994) relataram que altas concentrações de substrato podem causar inibição por substrato, o que diminui substancialmente a velocidade de hidrólise, além de que a extensão da inibição do substrato depende da razão entre total do substrato e o total de enzima.

De acordo com Jorgensen et al (2007), a operação da hidrólise com altas concentrações iniciais de substrato tem se deparado com o problema de inibição pelo produto especialmente do sistema de enzimas celulolíticas. As  $\beta$ -glicosidasas provenientes de microrganismos produtores de celulases são, em certo grau, inibidas pela glicose (YUN et al., 2001; DECKER e al., 2000). Isto resulta em um acúmulo de celobiose, que é um potente inibidor das celobiohidrolases (HOLTZAPPLE et al., 1990). A inibição das celulases por açúcares derivados das hemiceluloses também foi demonstrada. Xiao et al. (2004) demonstraram que derivados da hidrólise das hemiceluloses (manose, xilose e galactose) apresentam efeitos de inibição expressivos da atividade da celulase durante a hidrólise da celulose.

Jorgensen et al. (2007), afirmam que outros compostos também inibem as enzimas. Dentre esses estão os produtos de degradação formados durante o pré-tratamento. A lavagem do material pré-tratado resulta em uma maior conversão da celulose devido à remoção dos inibidores (TENGBORG et al., 2001a).

O processo SFS tem sido extensivamente estudado para a redução da inibição pelo produto. Comparado à hidrólise-fermentação em dois estágios, o SFS tem as seguintes vantagens (SUN e CHENG, 2002): aumento da taxa de hidrólise pela conversão de açúcares que inibem a atividade das celulases; requer menor quantidade de enzima; maiores rendimentos de produto; menores exigências de assepsia uma vez que a glicose é removida imediatamente e o etanol é produzido; menor tempo de processamento; e menor volume de reator, pois um único reator é utilizado.

Wu e Lee (1997) descobriram que a celulase perde 9%, 36% e 64% de sua atividade original em concentrações de etanol a 9, 35 e 60 g/L, respectivamente, a 38 °C durante o processo SFS. As desvantagens que precisam ser consideradas no SFS incluem: temperaturas incompatíveis de hidrólise e fermentação; tolerância dos microrganismos a etanol; e inibição das enzimas pelo etanol.

Outro aspecto considerado como importante e determinante das reações de hidrólise enzimática da celulose e hemiceluloses é a eficiência das enzimas celulases empregadas para digerir a celulose e produzir a glicose, usada para posterior ou simultânea reação de fermentação para a produção do etanol. A quantidade e a origem das celulases são consideradas como fatores críticos porque estas também determinam a eficiência e o custo dos processos de hidrólise.

Tanto bactérias como fungos podem produzir celulases para a hidrólise de materiais lignocelulósicos. Estes microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos; mesófilos ou termófilos. Bactérias pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* podem produzir celulases (BISARIA, 1991). *Cellulomonas fimi* e *Thermomonospora fusca* tem sido estudadas extensivamente para a produção de celulase. Apesar da maioria das bactérias celulolíticas, particularmente as celulolíticas anaeróbicas como *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens* produzirem celulases com alta atividade específica, elas não produzem altas concentrações de enzima (DUFF e MURRAY, 1996). Devido ao fato das bactérias anaeróbicas terem uma taxa de crescimento lenta e requererem condições aeróbicas de crescimento, a maioria das pesquisas para produção de celulase comercial são focadas em fungos (DUFF e MURRAY, 1996).

Fungos como *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* foram descritos como produtores de celulase (STERNBERG, 1976; FAN et al., 1987; DUFF e MURRAY, 1996). De todos esses fungos, o gênero *Trichoderma* (STERNBERG, 1976), em especial a espécie *T. reesei* (PERSSON et al., 1991) tem sido a mais extensivamente estudada e aplicada para a produção de celulases, a despeito do sistema de celulase de *T. reesei* apresentar um mínimo de atividade de celobiase que determina uma hidrólise incompleta de celobiose causando sérios problemas de inibição (HOLTZAPPLE et al., 1990). A adição complementar de celobiase de outros microrganismos como *Aspergillus niger* (WRIGHT et al., 1986; MOHAGHEGHI et al., 1992; CALSAVARA et al., 1999; CHEN et al., 2008), a modificação genética de *T. reesei* no sentido de aumentar a atividade da celobiase, ou ainda uma mistura de celulases e outras enzimas (XIN et al., 1993) têm sido adotados como alternativas para aumentar a eficiência do sistema de hidrólise. Uma conversão de 90% de celulose foi obtida na sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com um pré-tratamento básico (8%) quando uma mistura de celulases de *A. ustus* e *T. viride* foi usada (MONONMANI e SREEKANTIAH, 1987). De acordo com Sun e Cheng (2002) um aumento na dosagem de celulases no processo, pode aumentar o rendimento e velocidade de hidrólise até certo ponto, no entanto, isso aumentaria significativamente o custo. A expectativa é obter uma alta taxa de hidrólise e produção de glicose usando concentrações menores possíveis de enzimas.

A caracterização da estabilidade térmica e da atividade específica das celulases tem mostrado que estas podem ser inibidas por determinadas concentrações de substrato e pela glicose, produto final da reação de sacarificação (CALSAVARA et al., 1999). Nas reações de hidrólise usando celulases, Xiao et al. (2004) verificaram uma rápida liberação de glicose nas primeiras 24 h e uma lenta liberação de glicose nas 48 h seguintes; os referidos autores descreveram que glicose, celobiose e etanol inibem a ação da celobiase, e que um aumento na concentração de glicose provoca a diminuição da taxa de hidrólise. Ao investigarem o grau de inibição das celulases por diferentes quantidades de glicose, Xiao et al. (2004) indicaram que a hidrólise de celulose suplementada com uma fração solúvel em água de hemiceluloses pode ser uma alternativa para aumentar a concentração de glicose no final da hidrólise; a suplementação pode reduzir o grau de inibição.

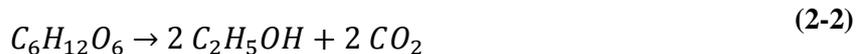
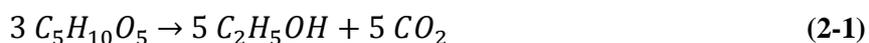
O uso de linhagens de fungos geneticamente modificadas para hidrolisar pentoses do meio de reação, também tem se constituído como uma alternativa para incrementar a obtenção de etanol em processos de SFS e HFS a partir de hemiceluloses e lignocelulose.

Hahn-Hägerdal et al. (2007) desenvolveram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com competência para fermentar açúcares derivados de lignocelulose; as linhagens TMB 3400, TMB 3006, e 424A (LNF-ST), hidrolisam xilose porque contém os genes para codificar as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Tomás-Pejó et al. (2008) usaram duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: a linhagem F12 geneticamente modificada para o consumo de xilose, e a linhagem Red Star que é uma linhagem que fermenta hexoses para produção de etanol, para comparar os processos SFS e HFS. A mais alta concentração de etanol (23,7 g/L) foi obtida com o processo SFS e usando a linhagem F12. A concentração de etanol foi mais alta com o processo SFS do que com HFS em todas as comparações testadas.

Mais recentemente, Matsushika et al. (2009) testaram o potencial de cinco linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de xilose. A linhagem MA-R4 foi a mais eficiente; nesta os genes para a xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Pichia stipitis* foram integrados na linhagem IR-2. A linhagem MA-R4 converte rapidamente xilose a etanol com baixa produção de xilitol. A linhagem MA-R4 foi recomendada pelos autores para a produção em larga escala de etanol a partir de mistura de açúcares presente em material lignocelulósico.

## 2.4 Fermentação

De acordo com Lynd (1996) uma variedade de microrganismos, bactérias, fungos e leveduras, fermentam carboidratos a etanol sob condições anaeróbias. De acordo com as reações, expressas nas Equações (2-1 e 2-2), o rendimento máximo teórico é de 0,51 kg de etanol e 0,49 kg de dióxido de carbono por kg de açúcar (HAMELINCK et al., 2005).



Hamelinck et al. (2005) reportam que métodos para a fermentação de açúcares de seis carbonos são conhecidos há (pelo menos) 6000 anos, quando os Sumérios, Babilônios e Egípcios começaram a fazer e descrever o processo de fabricação de cerveja de grãos (amido). Depois de se tornar possível a liberação de açúcares de seis carbonos de materiais lignocelulósicos (final do século 19) a conversão de açúcares de cinco carbonos se tornou

interessante. Eles representam uma grande percentagem dos açúcares disponíveis, a capacidade de recuperá-los e fermentá-los é importante para a eficiência do processo.

Ainda segundo Hamelinck et al. (2005), todos os microrganismos tem limitações: na habilidade de processar ambas as pentoses e hexoses, nos rendimentos de etanol, e na co-produção de massa celular a partir de etanol. Lynd (1996) afirma que a condição anaeróbia inativa a população de microrganismos vagorosamente.

Martin et al. (2007) estudaram a fermentação do bagaço de cana e observaram que a fermentação do pré-hidrolisado obtido por explosão a vapor por *Saccharomices cerevisiae* apresentou forte inibição. Tal inibição era mais expressiva em termos de produtividade volumétrica que por rendimento de etanol. Os principais responsáveis pela inibição da fermentação pareciam ser os furano aldeídos.

Vasquez et al. (2007) se interessaram em otimizar a hidrólise enzimática da fração celulósica da celolignina (sólidos resultantes da hidrólise ácida do bagaço de cana) e estudar a fermentação à etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. A conversão de celulose foi otimizada tendo o pH, a concentração de enzima, o percentual de sólido e a temperatura como variáveis. As condições ótimas que maximizaram a conversão de celulose à glicose, calculadas em função da massa seca inicial da celolignina pré-tratada (43 °C, 2%, e 24,4 FPU/g de celolignina pré-tratada) como a concentração de glicose (47 °C, 10%, e 25,6 FPU/g de celolignina pré-tratada) foram determinadas. As condições que aperfeiçoavam ambas, a conversão à glicose e a concentração de glicose (47 °C, 10%, e 25,9 FPU/g de celolignina pré-tratada) também foram encontradas. O hidrolisado enzimático resultante foi fermentado gerando uma concentração final de etanol de 30,0 g/L, em apenas 10 horas, e alcançando uma produtividade volumétrica de 3,0 g/L.h, que é próxima aos valores obtidos na fermentação convencional do caldo de cana-de-açúcar (5,0-8,0 g/L) no Brasil.

## Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Os principais materiais utilizados nesta pesquisa foram o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e lavado, fornecido pelos professores Adilson R. Gonçalves e George Jackson de M. Rocha da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). O complexo enzimático celulase/celobiase produzido na UFRJ com orientação das professoras Leda Maria F. Gottschalk e Elba Bon. E a celulase comercial, Novozym 188, usada para suplementar a atividade enzimática do complexo. Tendo em mãos esses materiais, prosseguiu-se à caracterização dos mesmos, para conhecimento de suas propriedades, e seu melhor uso.

A caracterização do bagaço foi feita no Laboratório de Análise de Alimentos (LANA) da UEM coordenado pela professora Lúcia Maria Zeoula, que cedeu a estrutura e os materiais necessários para determinação da composição do substrato utilizado em todos os experimentos.

### 3.1 Caracterização do bagaço

O método Van Soest (SILVA, 1990) se baseia na separação das diversas frações constituintes do material lignocelulósico, por meio de detergentes. Usando-se o detergente neutro separa-se o conteúdo celular da parede celular, constituída principalmente, de celulose, hemiceluloses, lignina e proteína lignificada. Esta fração é denominada Fibra em Detergente Neutro (FDN). O fracionamento continua e determina-se, a seguir, a Fibra em Detergente Ácido (FDA), basicamente lignina e celulose. Por fim, solubiliza-se a lignina e a celulose é conhecida por diferença de pesagens, antes e depois de levar os cadinhos à mufla.

Para preparar a solução de detergente neutro foram pesados 18,61 g de EDTA (etilenodiaminotetracetato dissódico  $[\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ ) e 6,81 g de borato de sódio hidratado  $[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}]$ . Os reagentes foram colocados em um béquer com aproximadamente 400 mL de água destilada e o mesmo foi aquecido até que os reagentes se dissolvessem. Outra solução contendo 30 g de sulfato láurico de sódio  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}]$  e 10 mL de 2-metoxietanol  $[\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2]$  foi preparada e adicionada à primeira. Finalmente, 4,56 g de fosfato ácido de sódio anidro  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$  foram também dissolvidos, por aquecimento, e misturado aos demais reagentes. Para todas essas dissoluções foi utilizado apenas 1 L de água destilada (SILVA, 1990).

É importante ressaltar que a partir desse ponto todo o método foi feito em triplicata. Foram pesadas aproximadamente 0,75 g de bagaço pré-tratado (amostra seca ao ar), previamente triturada em moinho, com peneira de 30 mesh. Foram adicionados 100 mL de solução de detergente neutro (à temperatura ambiente) e o conjunto foi aquecido até fervura, sendo mantido em processo de digestão por 60 min. O conteúdo foi então filtrado por sucção à vácuo em cadinho filtrante de vidro, previamente pesado. Em seguida, o material dentro do cadinho foi lavado duas vezes com água quente (90 a 100° C), e uma vez com 30 mL de acetona. O cadinho foi seco a 105°C, por 12 horas, esfriado em dessecador e pesado. A fibra em detergente neutro (FDN) é a porcentagem dos constituintes da parede celular calculada pela diferença entre as pesagens:

$$FDN (\%) = \left( \frac{FN - C}{S} \right) \times 100 \quad (3-1)$$

onde:  $C$  = Peso do cadinho vazio,

$FN$  = Peso do cadinho + fibra FDN após a secagem, e

$S$  = Peso da amostra seca.

A solução de detergente ácido foi preparada adicionando-se 20 g de brometo-cetil-trimetilamônio próprio para análise, a 1 L de ácido sulfúrico 1 N, previamente padronizado. Agitar para facilitar a dissolução (SILVA, 1990).

Foram pesadas aproximadamente 0,75 g amostra seca ao ar, previamente triturada em moinho, com peneira de 30 mesh. Foram adicionados 100 mL de solução de detergente ácido (à temperatura ambiente) e o conjunto foi aquecido até fervura e mantido em processo de digestão por 60 min. O conteúdo foi então filtrado em cadinho filtrante de vidro, previamente pesado, usando-se sucção a vácuo. Em seguida, o cadinho foi lavado duas vezes com água quente (90 a 100° C), e após com 30 mL de acetona. O cadinho foi seco a 105°C por 12 horas, esfriado em dessecador e pesado.

A fibra em detergente ácido (FDA) foi calculada pela diferença entre as pesagens e convertida em porcentagem:

$$FDA (\%) = \left( \frac{F - C}{S} \right) \times 100 \quad (3-2)$$

onde:  $C$  = Peso do cadinho vazio,

$F$  = Peso do cadinho + fibra FDA após a secagem, e

$S$  = Peso da amostra seca.

A hemicelulose foi então determinada pela diferença entre FDN e FDA:

$$\text{Hemicelulose (\%)} = \text{FDN(\%)} - \text{FDA(\%)} \quad (3-3)$$

A determinação do teor de lignina foi feita a partir da fibra em detergente ácido, envolvendo uma série de soluções (SILVA, 1990):

- a) solução saturada de permanganato de potássio: 50 g de  $\text{K}_2\text{MnO}_4$  dissolvidos em 1 L de água destilada, que foi mantida protegida da luz solar;
- b) solução tampão: solução de 6,0 g de nitrato férrico hidratado [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ] e 0,15 g de  $\text{AgNO}_3$  dissolvidos em 100 mL de água destilada e adicionada a 500 mL de ácido acético glacial, 5 g de acetato de potássio e 400 mL de álcool butil terciário;
- c) solução combinada de permanganato de potássio com tampão (2:1): soluções **a** e **b** misturadas na razão de 2:1 v/v;
- d) Solução de desmineralização: 50 g de ácido oxálico dihidratado ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dissolvidos em 700 mL de etanol 95% adicionados a 50 mL de HCl concentrado (12 N) e 250 mL de água destilada.

Os cadinhos com fibra foram colocados em um recipiente de vidro com uma camada de água destilada de 2 a 3 cm; foram adicionados 30 mL da solução (c) em cada cadinho; e o conteúdo agitado com bastão de vidro, para que a solução entrasse em contato com todas as partículas, por aproximadamente 15 min. Em seguida, os cadinhos foram succionados a vácuo e a água do recipiente de vidro renovada. A operação foi repetida mantendo a solução em contato por 90 min, dessa vez. Os cadinhos foram levados a uma bandeja limpa, com a água, e ali foram adicionados de 20 a 30 mL da solução (d). Decorridos 10 min, os conteúdos dos cadinhos foram filtrados a vácuo até secarem; e a solução (d) renovada. Em seguida, os cadinhos foram lavados com 30 mL de etanol; filtrados a vácuo até secar; lavados com etanol novamente; lavados uma vez com 30 mL de acetona, secos a 100°C por uma noite e pesados. O teor de lignina foi determinado pela subtração do valor pesado do valor do FDA e transformado em porcentagem:

$$\text{Lignina (\%)} = \left( \frac{F - L}{S} \right) \times 100 \quad (3-4)$$

onde:  $F$  = Peso do cadinho + fibra FDA após a secagem,

$L$  = Peso do cadinho depois do tratamento com solução  $K_2MnO_4$ , e

$S$  = Peso da amostra seca.

Os cadinhos foram então levados à mufla a 450-500°C por no mínimo 3 h e pesados. A diferença com a fase anterior determinou o teor de celulose. Já as cinzas foram determinadas pela a diferença de peso entre a calcinação e o cadinho vazio:

$$\text{Celulose (\%)} = \left( \frac{L - B}{S} \right) \times 100 \quad (3-5)$$

$$\text{Cinzas (\%)} = \left( \frac{B - C}{S} \right) \times 100 \quad (3-6)$$

onde:  $B$  = Peso do cadinho após a calcinação,

$L$  = Peso do cadinho depois do tratamento com solução  $K_2MnO_4$ ,

$C$  = Peso do cadinho vazio, e

$S$  = Peso da amostra seca.

### 3.2 Produção das enzimas celulolíticas

A enzima foi produzida na UFRJ, no Laboratório de Tecnologia Enzimática coordenado pela professora Elba Bon, sendo esta operação supervisionada pela professora Leda Maria F. Gottschalk. O complexo de enzimas utilizado na hidrólise constitui-se na mistura das fermentações de *Aspergillus awamori* e *Trichoderma reesei* Rut-C30. O primeiro cultivado em meio Breccia (BRECCIA et al., 1995) e o segundo em meio Mandels (MANDELS e WEBER, 1969), ambos modificados.

A produção da enzima foi iniciada com a preparação do meio Breccia (BRECCIA et al., 1995) modificado para o pré-inoculo do *Aspergillus awamori*. O meio foi preparado adicionando-se os reagentes listados na Tabela 3.1 em um béquer e diluindo-os em 200 mL de água destilada. Apenas a fonte de carbono foi pesada separadamente, em frascos erlenmeyer de 1L, no qual, posteriormente, foram adicionados os 200 mL de meio. O erlenmeyer contendo o meio foi então esterilizado a 1 atm de pressão por 20 min. Em

capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool e com luz UV foi inoculado 1% de *Aspergillus awamori*, ou seja, 2,0 mL da suspensão de esporos do fungo filamentosos nos 200 mL de meio. O frasco foi então colocado em uma incubadora a 30 °C e 200 rpm, onde permaneceu por 2 dias.

O meio de fermentação foi preparado seguindo a Tabela 3.1 e também teve o farelo de trigo pesado separado, dividido entre cada um dos 5 erlenmeyers que, posteriormente, acomodariam o meio de fermentação.

Passado o período do pré-inóculo, os frascos foram levados à capela de fluxo laminar previamente esterilizada e receberam 30 mL inoculados em 300 mL do meio de fermentação previamente esterilizado a 1 atm. Os frascos foram então levados à incubadora a 30°C e 200 rpm, permanecendo lá por 5 dias, período adequado para a fermentação que produz a enzima.

**Tabela 3.1 - Meio Breccia (BRECCIA et al., 1995) modificado – *Aspergillus awamori*.**

Reagentes	Pré-inóculo	Fermentação
	200 mL	1,5 L
Nitrato de Sódio - NaNO <sub>3</sub>	0,24 g	1,8 g
Fosfato de Potássio monobásico - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g	4,5 g
Fosfato de Potássio dibásico - K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g	9,0 g
Sulfato de Magnésio heptahidratado - MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04 g	0,30 g
Cloreto de Cálcio - CaCl <sub>2</sub>	0,01 g	0,075 g
Sulfato Ferroso heptahidratado - FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (solução - 5 g/L)	200 µL	1,5 mL
Cloreto de Cobalto hexahidratado - CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (solução - 20 g/L)	200 µL	1,5 mL
Sulfato de Manganês tetra hidratado - MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (solução - 1,6 g/L)	200 µL	1,5 mL
Sulfato de Zinco heptahidratado - ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (solução - 1,4 g/L)	200 µL	1,5 mL
Extrato de Levedura	2,4 g	18,0 g
Fonte de Carbono (Farelo de Trigo)	6,0 g	45,0 g

O meio do pré-inóculo do *Trichoderma reesei* Rut-C30 foi preparado de acordo com a Tabela 3.2, sendo a fonte de carbono, neste caso, a lactose, que foi pesada, diluída e esterilizada separadamente dos outros constituintes do meio, para evitar caramelização. Em capela de fluxo laminar a lactose foi adicionada ao restante dos componentes, completando a composição do meio. Em seguida, adicionou-se 1% da suspensão de esporos do fungo ao meio de pré-inóculo. O pré-inóculo foi então levado à incubadora onde permaneceu a 30 °C e 200 rpm, por 24 horas.

Passado o período de pré-inóculo, foi realizada a inoculação da fermentação, cujo meio está explicitado na Tabela 3.2, com 10% (v/v) do pré-inóculo. A fermentação teve duração de 4 dias, nos quais o reator foi mantido a 30 °C e 200 rpm.

Terminadas as fermentações dos dois fungos, os mesmos foram separados do meio por centrifugação e subseqüente filtração a vácuo.

Durante a estadia na UFRJ, foram conduzidas quatro fermentações de cada um dos fungos. Já na UEM foi feita a concentração desses fermentados em um módulo de filtração tangencial da Milipore modelo Minitan II com membrana de 30.000 dalton. Os concentrados foram então misturados, originando o complexo celulolítico (celulases + celobiase) utilizado na hidrólise enzimática do bagaço de cana.

**Tabela 3.2 - Meio Mandels (MANDELS e WEBER, 1969) modificado – *Trichoderma reesei* Rut-C30.**

Reagentes	Pré-inóculo	Fermentação
	200 mL	1,5 L
Uréia - CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0,06 g	0,45 g
Sulfato de amônio - (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,28 g	2,1 g
Fosfato de Potássio monobásico - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 g	3,0 g
Cloreto de Cálcio - CaCl <sub>2</sub>	0,06 g	0,45 g
Sulfato de Magnésio heptahidratado - MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,06 g	0,45 g
Sulfato Ferroso heptahidratado - FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (solução - 5 g/L)	200 µL	1,5 mL
Cloreto de Cobalto hexahidratado - CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (solução - 20 g/L)	200 µL	1,5 mL
Sulfato de Manganês tetra hidratado - MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (solução - 1,6 g/L)	200 µL	1,5 mL
Sulfato de Zinco heptahidratado - ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (solução - 1,4 g/L)	200 µL	1,5 mL
Extrato de Levedura	0,05 g	9,0 g
Milhocina	-	9,0 mL
Fonte de Carbono (Lactose)	1,5 g	45,0 g
Sais componentes do Tampão (100 mM - pH 6,0)		
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	-	18,21 g
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	-	7,215 g

### 3.3 Determinação dos açúcares redutores

Os açúcares redutores formados foram determinados pelo Método DNS. Este método baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada, lida espectrofotometricamente a 540 nm.

### 3.3.1 *Preparação do reagente DNS*

Seguindo o procedimento descrito por Miller (1959), misturou-se 1416 mL de água destilada, 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio. Após a dissolução desses reagentes, adicionou-se 306 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 mL de fenol (fundido a 50°C) e 8,3g de metabissulfito de sódio.

### 3.3.2 *Determinação da curva padrão do reagente DNS*

A curva padrão para o reagente DNS, que determina açúcares redutores, foi construída a partir de uma solução de glicose anidra de concentração 10 mg/mL. A partir dessa solução estoque foram feitas diluições que variavam de 0 a 5 mg de glicose/0,5 mL de solução.

A um tubo de ensaio contendo 1 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8, foi adicionado 0,5 mL de uma determinada diluição. Esse procedimento foi feito em triplicata pra todas as diluições. Os tubos foram incubados a 50 °C por 60 min, e ao término do período de incubação foram adicionados 3,0 mL de reagente DNS a cada um deles.

Os tubos foram então fervidos por 5 minutos, tempo suficiente para o desenvolvimento da cor, e, em seguida, transferidos para um banho de gelo. Uma alíquota de 0,200 mL de cada tubo foi retirada e diluída com 2,5 mL de água. O desenvolvimento da cor foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm.

Foi construída uma curva padrão, plotando as concentrações absolutas de glicose (mg/0,5 mL), em função da absorvância a 540 nm e ajustou-se uma reta aos dados.

É importante ressaltar que o reagente DNS identifica açúcares redutores, mas como a curva padrão foi feita com base em uma solução padrão de glicose, ao ser utilizada para quantificar os açúcares estará os expressando como glicose.

## 3.4 **Determinação da atividade celulolítica com papel de filtro**

A detecção da quebra da ligação glicosídica por este método envolve em paralelo e idêntico tratamento, três categorias de tubos de ensaios experimentais (ensaios enzimáticos, brancos e controles). O substrato é 50 mg de papel de filtro Whatman N° 1, correspondendo a uma tira de 1,0 x 6,0 cm.

O método aqui utilizado foi o LAP 006 (ADNEY e BAKER, 1996, disponível online) que segue as recomendações da IUPAC.

Os ensaios enzimáticos foram conduzidos em tubos de ensaios, nos quais se adicionou a tira de substrato enrolada e 1,0 mL de tampão citrato 0,05 mol/L, pH 4,8, que saturava a tira de papel de filtro. Os tubos foram então equilibrados a 50 °C. Adicionou-se 0,5 mL de enzima diluída em tampão citrato. Várias diluições foram feitas de modo a atingir concentrações de enzima que liberassem em torno de 2,0 mg de glicose. Os ensaios, o branco e os controles foram incubados a 50 °C por exatamente 60 min. Ao término do período de incubação, foram adicionados 3,0 mL de reagente DNS para interromper a reação. O branco de reagente continha apenas tampão; o controle de enzima, a diluição de enzima e tampão; e o controle de substrato, substrato e tampão.

Os tubos foram fervidos por 5 minutos e, em seguida, transferidos para um banho de gelo. Uma alíquota de 0,200 mL de cada tubo foi retirada e diluída com 2,5 mL de água. O desenvolvimento da cor foi determinado em espectrofotômetro a 540 nm.

### 3.4.1 Cálculo da Atividade da Celulase

A unidade de medida da atividade da celulase, baseia-se na Unidade Internacional (U.I.) (GHOSE, 1987):

$$\begin{aligned} 1 \text{ UI} &= 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de substrato convertido} \\ &= 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de glicose (açúcares redutores expressos} \\ &\quad \text{como glicose) formado durante a reação de hidrólise} \\ &= 0,18 \text{ mg min}^{-1} \text{ quando o produto é glicose} \end{aligned}$$

A quantidade de glicose liberada no ensaio na diluição crítica é 2 mg. Que pode ser expressa em  $\mu\text{mol}$  como:

$$2,0 \text{ mg de glicose} = \frac{2,0}{0,18} \mu\text{mol de glicose}$$

Esses 2 mg de glicose foram produzidos por 0,5 mL de enzima em 60 min na reação com papel de filtro, reação FPU (Filter Paper Unit). Logo:

$$2 \text{ mg de glicose} = \frac{2,0}{0,18} \mu\text{mol de glicose} \times \frac{1}{0,5 \text{ mL}} \times \frac{1}{60 \text{ min}}$$

$$= 0,37 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ (UI mL}^{-1}\text{)}$$

Então a quantidade estimada de enzima (= concentração crítica da enzima = mL mL<sup>-1</sup>) que libera 2,0 mg de glicose na reação com papel de filtro contém 0,37 unidades:

$$FPU = \frac{0,37}{C^* \text{ da enzima que libera 2,0 mg de glicose}} \text{ unidades mL}^{-1} \quad (3-7)$$

onde:  $C^*$  representa a concentração relativa da enzima diluída, ou seja, a proporção de enzima estoque presente na enzima diluída, da qual 0,5 mL foram acrescentados ao ensaio enzimático.

Para determinar a atividade em unidades de FPU (Filter paper unit), a curva padrão foi utilizada para determinar a concentração de açúcares redutores, expressos como glicose, liberados para cada amostra depois da subtração do controle da enzima. Em seguida, foi estimada a concentração de enzima que liberava exatamente 2,0 mg de glicose, plotando-se as quantidades de glicose liberada em função das concentrações relativas da enzima diluída. O cálculo da atividade foi realizado de acordo com a Equação (3-7).

### 3.5 Determinação de glicose – Método Enzimático

A Glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose segundo as seguintes reações:



onde: GOD = glicose oxidase, e

POD = peroxidase.

A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de glicose presente na amostra.

### 3.5.1 Determinação da curva padrão do Kit GOD-POD

O kit enzimático utilizado nas análises de glicose foi o Glicose Bioliquid (lote 80829002). De acordo com a bula que acompanha o Kit, a reação mantém-se linear até uma concentração de glicose de 4 mg/mL. Logo, para a determinação da curva padrão foram feitas 11 diluições de concentrações conhecidas que variavam de 0 a 4 mg/mL de glicose. Para cada uma das diluições foram feitos testes em triplicata. Os testes foram compostos de acordo com a Tabela 3.3, misturados suavemente e incubados a 37 °C por 10 min. O branco e o padrão (que acompanha o Kit), também montados de acordo com a Tabela 3.3, foram incubados juntamente com os testes. As absorvâncias dos testes e do padrão foram lidas em espectrofotômetro, a 505 nm, previamente zerado com o branco. As concentrações dos testes e as absorvâncias lidas foram correlacionadas pela equação da curva padrão. A leitura da solução padrão que acompanha o Kit, de concentração conhecida, foi analisada pela equação para comprovar a confiabilidade da curva.

**Tabela 3.3 - Composição das análises do Kit GOD-POD.**

	<b>Branco</b>	<b>Testes</b>	<b>Padrão</b>
<b>Amostra</b>	-	0,010 mL	-
<b>Padrão</b>	-	-	0,010 mL
<b>Reagente de trabalho</b>	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

### 3.6 Determinação da atividade da celobiase

Para determinar a atividade da celobiase foi conduzida uma reação cujo substrato é uma solução de celobiose de  $15 \times 10^{-3}$  mol/L em tampão citrato 0,05 mol/L (pH 4,8), preparada no dia (GHOSE, 1987).

Foram adicionados a tubos de ensaio, 1,0 mL de diferentes diluições da enzima em tampão citrato, sendo que tais diluições foram feitas de modo a produzir quantidades de glicose próximas de 1,0 mg (valor absoluto), nas condições de reação. Os tubos foram aclimatados a 50 °C. Em cada tubo foi adicionado e misturado 1,0 mL de solução de substrato. Em seguida esses foram incubados a 50 °C por exatamente 30 min, juntamente com os brancos de celobiose, de enzima e de GOD, descritos na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4 - Composição dos brancos para os ensaios enzimáticos.**

	<b>Branco do GOD</b>	<b>Branco de Celobiose</b>	<b>Branco de Enzima</b>
<b>Tampão citrato de sódio 0,05 mol/L (pH 4,8)</b>	2,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
<b>Diluição da enzima</b>	-	-	1,0 mL
<b>Solução de celobiose 15 mM</b>	-	1,0 mL	-

A reação foi interrompida pela imersão dos tubos em água fervente por exatamente 5 min. Em seguida, os tubos de ensaio foram transferidos para um banho de água gelada e de cada um deles foi pipetado 0,01 mL de amostra. Nessa alíquota foi adicionado e misturado, exatamente 1 mL do reagente GOD-POD. A mistura foi incubada a 37 °C por 10 min. As absorvâncias do branco de celobiose, dos brancos de enzima e das reações enzimáticas foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm, previamente zerado com o branco do GOD. Cada ensaio teve a absorvância subtraída do branco de celobiose e do respectivo branco de enzima.

A atividade de celobiase em termos de UI (Unidades Internacionais), deve ser maior que a atividade de celulase em FPU, para se obter uma hidrólise eficiente. Foi constatado, no entanto, que essa relação não era obedecida no complexo enzimático celulase/celobiase produzido na UFRJ. O complexo foi então suplementado com Novozym 188 (batelada DCN 00021), uma celobiase comercial derivada de *Aspergillus niger*. É importante ressaltar que todos os testes apresentados neste trabalho, inclusive o de determinação da atividade da celobiase no complexo enzimático, foram realizados após a suplementação com a enzima comercial.

### 3.6.1 Cálculo da Atividade de Celobiase

A unidade de medida da atividade da celobiase baseia-se na Unidade Internacional (U.I.) (GHOSE,1987):

$$\begin{aligned} 1 \text{ UI} &= 1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de substrato convertido} \\ &= 2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ de glicose formados durante a reação de hidrólise} \end{aligned}$$

A quantidade de glicose liberada no ensaio na diluição crítica é 1 mg. Que pode ser expressa em  $\mu\text{mol}$  como:

$$\begin{aligned} 1,0 \text{ mg de glicose} &= \frac{1}{0,18} \mu\text{mol de glicose} \\ &= \frac{0,5}{0,18} \mu\text{mol de celobiose} \end{aligned}$$

Esse 1 mg de glicose foi produzido por 1,0 mL de enzima em 30 min na reação com celobiose, reação CB. Logo:

$$\begin{aligned} 1,0 \text{ mg de glicose} &= \frac{0,5}{0,18} \mu\text{mol de celobiose} \times \frac{1}{1,0 \text{ mL}} \times \frac{1}{30 \text{ min}} \\ &= 0,0926 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ (UI mL}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

Então a quantidade estimada de enzima (= concentração crítica da enzima = mL mL<sup>-1</sup>) que libera 1,0 mg de glicose na reação com celobiose contém 0,0926 unidades:

$$CB = \frac{0,0926}{C^* \text{ da enzima que libera 1,0 mg de glicose}} \text{ unidades mL}^{-1} \quad (3-10)$$

Para determinar as concentrações de glicose (mg/mL) nos ensaios, os valores das absorvâncias lidos a 505 nm foram inseridos na equação da curva padrão do teste GOD-POD. Para converter as concentrações de glicose resultantes desse cálculo, expressas em mg/mL, em valores absolutos (mg), essas foram multiplicadas por 2, uma vez que o ensaio totalizava 2 mL.

As diluições enzimáticas foram transformadas em concentrações relativas ( $C^*$ ) da enzima diluída, de acordo com a Equação (3-11).

$$C^* (\text{enzima}) = \frac{1}{\text{diluição}} = \frac{\text{Volume da enzima estoque na diluição}}{\text{Volume total da enzima diluída}} \quad (3-11)$$

Um gráfico das concentrações relativas ( $C^*$ ) da enzima diluída em função da quantidade absoluta de glicose liberada foi construído. Baseando-se na região de dependência linear entre as duas variáveis determinou-se a equação de correlação entre as mesmas. A concentração relativa da enzima diluída ( $C^*$ ) que liberaria exatamente 1,0 mg de glicose pôde ser estimada com o auxílio da equação obtida. De posse desse valor a atividade da celobiase foi calculada utilizando-se a Equação(3-10).

### 3.7 Determinação da umidade do bagaço

Na formulação dos ensaios, considerou-se a massa seca (*m.s.*) de bagaço e para isso foi necessário conhecer a umidade do bagaço, em cada um dos dias em que se iniciou um ensaio.

Tal umidade foi determinada pelos do método gravimétrico, ou seja, pela diferença de pesagens entre as massas úmida e seca de bagaço.

Três placas petri foram levadas a peso constante, e tiveram sua massa determinada ( $m_{placa}$ ). A cada uma delas, foi adicionada cerca de um grama de bagaço, em balança analítica, e a massa do conjunto registrada ( $m_{placa + bagaço\ úmido}$ ). As placas com o bagaço úmido foram levadas à estufa a 105 °C, onde permaneceram por 12 horas. Cada uma das placas foi pesada ( $m_{placa + bagaço\ seco}$ ), depois de resfriada à temperatura ambiente em dessecador.

A umidade contida no bagaço (*w*) pôde ser então determinada pela sequência de cálculos:

$$m_{bagaço\ úmido} = m_{placa + bagaço\ úmido} - m_{placa} \quad (3-12)$$

$$m_{bagaço\ seco} = m_{placa + bagaço\ seco} - m_{placa} \quad (3-13)$$

$$m_{água} = m_{bagaço\ úmido} - m_{bagaço\ seco} \quad (3-14)$$

$$w = \frac{m_{água}}{m_{bagaço\ úmido}} \quad (3-15)$$

Fixada a quantidade de bagaço (*m.s.*) desejada para cada ensaio, é possível calcular então a massa de bagaço a ser pesada:

$$m_{bagaço\ úmido} = \frac{m_{bagaço}(base\ seca)}{1 - w} \quad (3-16)$$

### 3.8 Ensaios de hidrólise

Basicamente, os ensaios de hidrólise foram preparados da mesma forma. Primeiramente determinou-se a porcentagem (m/m, *m.s.*) de bagaço e a atividade em FPU/g de celulose a serem utilizados no meio reacional. Em seguida, levando em conta a umidade contida no bagaço, o material foi pesado dentro de um erlenmeyer de 500 mL previamente tarado. No mesmo recipiente foram adicionados 10 g de tampão citrato de

sódio 0,05 mol/L pH 4,8 e uma quantidade em massa da solução de benzoato de sódio 1 g/L calculada de forma que todo o sistema (bagaço + tampão + benzoato + enzima) totalizasse 100 g. O conjunto era então aclimatado a 50 °C e o momento em que a enzima foi adicionada, fixado como tempo zero de reação. A partir do início da reação o conjunto era incubado a temperatura e agitação constantes de 50 °C e 150 rpm, respectivamente.

No início da reação e em intervalos de tempos pré-determinados, foram tomadas amostras do meio reacional para acompanhar a evolução da produção de glicose. Para que as características do meio não fossem alteradas, o total de alíquotas retiradas foi limitado, de forma que o volume total retirado não superasse 10% do volume total reacional que era de 100 mL, colocado em um recipiente de 500 mL, para garantir uma agitação eficiente do meio reacional.

As alíquotas foram, assim que retiradas, colocadas em água fervente por 5 minutos para inativar a enzima e parar a reação, sendo em seguida resfriadas, centrifugadas, filtradas e a quantidade de glicose nelas presente dosada de acordo com o método GOD-POD. Alcançado o tempo total de hidrólise o frasco erlenmeyer era fervido para inativar a enzima celulase, seu conteúdo era filtrado a vácuo, e o volume do filtrado determinado.

A dosagem de glicose foi feita adicionando e misturando-se 1 mL do reagente GOD-POD a 0,01 mL da amostra colhida em um determinado tempo. A mistura foi incubada a 37 °C por 10 min. A absorvância foi lida em espectrofotômetro a 505 nm, previamente zerado com o branco de GOD e com auxílio da equação da curva padrão, Seção 3.5.1, transformada na concentração de glicose.

É importante ressaltar que a massa de glicose produzida em cada ensaio deve ser precisamente determinada. Pode haver uma contribuição, ainda que pequena, de glicose presente no bagaço, proveniente do pré-tratamento; ou ainda na enzima, proveniente do processo de fermentação. Essa contribuição foi considerada uma vez que houve o tratamento paralelo de três tipos de amostras. São eles:

- Branco de bagaço: contém o bagaço, as soluções de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 e de benzoato de sódio 1g/L, e volume de água equivalente ao volume de enzima.
- Branco de enzima: contém a enzima, as soluções de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 e de benzoato de sódio 1 g/L, e massa de água equivalente à massa de bagaço.

- Ensaios de hidrólise: contém o bagaço, a enzima, as soluções de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 e benzoato de sódio 1g/L. Estes foram feitos em duplicata.

Com os dados provenientes das análises feitas pelo método GOD-POD das alíquotas retiradas das duplicatas dos ensaios de hidrólise e dos brancos de enzima e substrato, é possível determinar a glicose produzida, pela Equação (3-17):

$$ABS_{glic\ prod} = \overline{ABS}_{hidrólise} - (ABS_{branco\ bag} + ABS_{branco\ enz}) \quad (3-17)$$

onde:  $\overline{ABS}$  = absorvância média das duplicatas do ensaio de hidrólise,

$ABS_{branco\ bag}$  = absorvância lida da amostra do branco de bagaço, e

$ABS_{branco\ enz}$  = absorvância lida da amostra do branco de enzima.

### 3.8.1 Reator batelada convencional

No reator batelada convencional, o substrato (bagaço de cana pré-tratado e lavado), a solução tampão, a enzima e o conservante foram alimentados no erlenmeyer como mostra a Figura 3.1, e a reação de hidrólise do bagaço foi acompanhada pela retirada de alíquotas em tempos de reação pré-estabelecidos. A concentração de glicose nessas alíquotas foi determinada e comparada àquela obtida com as outras formas de operação do reator batelada.

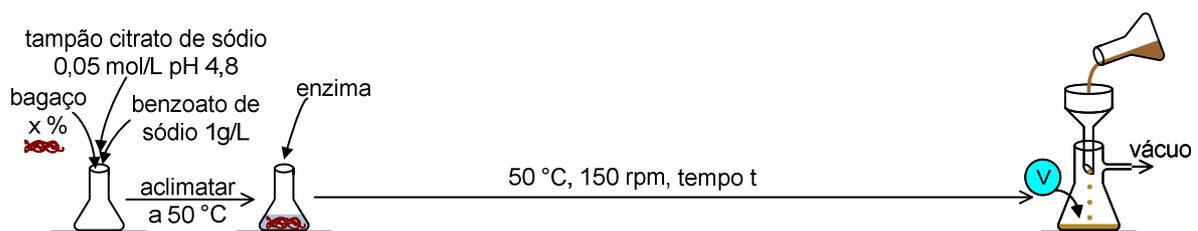


Figura 3.1 - Operação do reator batelada convencional.

Antes de iniciar qualquer um dos ensaios, a umidade do bagaço foi determinada de acordo com o exposto na Seção 3.7 e usada para corrigir a massa de bagaço utilizada em cada um deles.

Considerando que os resíduos remanescentes do pré-tratamento prejudicam a hidrólise enzimática, propôs-se que o bagaço recebido como lavado passasse por um novo processo de lavagem e fosse submetido ao processo de hidrólise, originando o Ensaio LB.

Para compor o Controle de LB, colocou-se o erlenmeyer de 500 mL de capacidade sobre uma balança analítica e, depois de tarada a balança, adicionou-se 3,26 g do bagaço, equivalente a 3% (m/m) de bagaço (m.s.) corrigido de acordo com a umidade do bagaço que era de 8,02% no dia do ensaio. Adicionou-se, ao mesmo erlenmeyer, 10 g de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8, e 84,45 g de benzoato de sódio. O frasco foi aclimatado a 50 °C e 2,22 mL (equivalentes a 2,29g) de solução enzimática, contendo 5,6 FPU/g de celulose e 12,4 UI/g de celulose, foram adicionados. O momento de adição da enzima foi fixado como tempo zero de reação. O Ensaio LB foi composto da mesma forma, utilizando-se o bagaço que passou por um novo processo de lavagem.

### 3.8.2 Reator batelada alimentada

O modo de operação do reator batelada alimentada de hidrólise está representado na Figura 3.2. A carga total de bagaço pré-tratado foi dividida em diversas frações, que foram adicionadas em diferentes intervalos de tempo, iguais ao tempo total de hidrólise dividido pelo número de frações, sem que houvesse a remoção dos resíduos não-hidrolisáveis das adições anteriores.

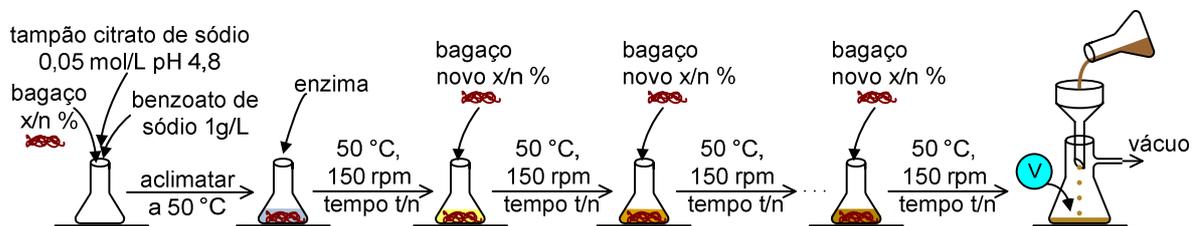


Figura 3.2 - Operação do reator batelada alimentada.

O procedimento de coleta de amostras e dosagem da glicose produzida foi semelhante ao apresentado na Seção 3.8.

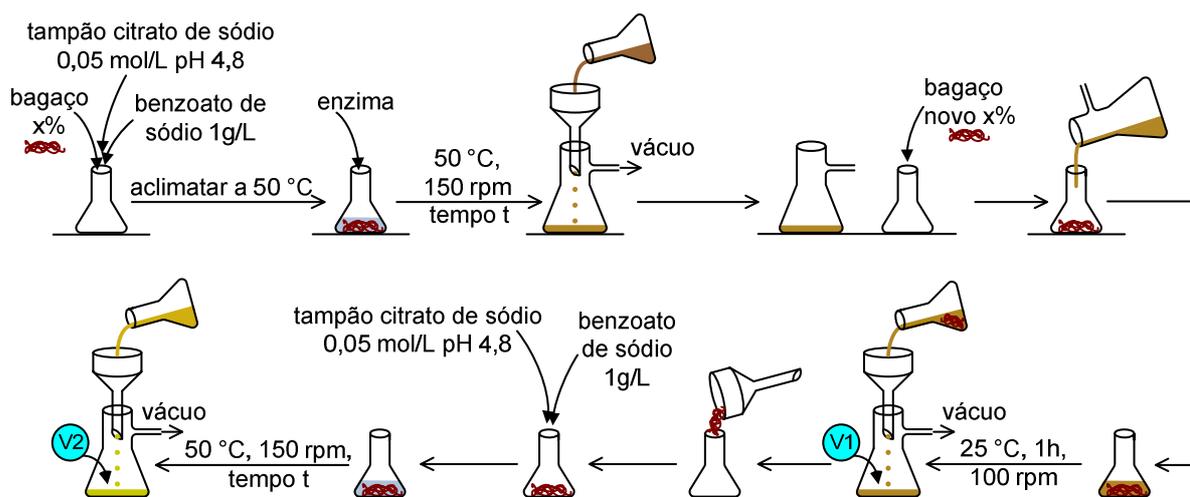
O ensaio A, teve 3 adições de 3% (m/m), em 0, 24 e 48 horas, uma carga enzimática adicionada no início de 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose e um tempo de reação de 72 horas. É importante lembrar que todos os ensaios levam 10 g de solução tampão, benzoato para completar 100 g e são incubados a 50 °C e 150 rpm. Foram retiradas alíquotas de 1,5 mL, nos tempos de 0, 3, 6, 24, 48 e 72 horas. Em paralelo ao ensaio, foi feito um controle do mesmo, que se constituiu de um reator batelada convencional, em que a carga total do bagaço de 9% (m/m) é adicionada no tempo zero.

Os ensaios B e C tiveram a carga enzimática aumentada para 15 FPU/g de celulose e 150 UI/g de celulose, visando atingir uma maior extensão de hidrólise e consequente

maior produção de glicose. No ensaio B, com carga total de sólidos de 3% e no ensaio C, com carga total de 9%; foram feitas adições de massa iguais de bagaço nos tempos 0, 12, 24 e 36 horas. Nos Controle de B e de C, reatores batelada convencional, as cargas totais de bagaço de 3 e 9%, respectivamente, foram adicionadas no início da reação. As alíquotas foram retiradas em 0, 12, 24, 36 e 48 h. No Controle de B,

### 3.8.3 Reator bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para reabsorção da enzima

Os ensaios foram realizados de acordo com o esquema apresentado na Figura 3.3. Neste sistema, passado um determinado tempo pré-estabelecido de reação, o hidrolisado foi esgotado de cada batelada e colocado em contato com nova porção de bagaço pré-tratado fresco, visando à reabsorção da enzima. O contato entre o novo bagaço e a solução ocorreu por 1 hora sob agitação (100 rpm) a 25 °C. O bagaço em suspensão no hidrolisado, contendo a enzima adsorvida, foi separado da solução de açúcares por filtração a vácuo e após, submetido a uma nova batelada de hidrólise. Na filtração a vácuo, o papel de filtro comum foi substituído por papel de filtro constituído de fibra de vidro, para que não houvesse nenhum tipo de reação entre o papel e a celulase. O volume da solução de açúcares ( $V_1$ ) e o volume resultante da nova batelada de hidrólise ( $V_2$ ) foram medidos para posterior cálculo da massa de glicose produzida.



**Figura 3.3 - Operação do reator bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para reabsorção da enzima.**

Da mesma forma que no item anterior, para a determinação da curva, alíquotas eram retiradas em tempos pré-determinados. As alíquotas eram fervidas, para inativar as

enzimas celulase/celobiase; centrifugadas, filtradas e a quantidade de glicose, dosada pelo método GOD-POD.

O primeiro destes ensaios, Ensaio I, continha 9% (m/m) de bagaço pré-tratado (m.s.), carga enzimática de 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 10 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, e solução de benzoato de sódio 1g/L para completar 100 g e eram mantidos a 50 °C, sob agitação de 150 rpm. A primeira batelada foi interrompida com 72 horas de reação, e as separações bagaço-hidrolisado foram feitas por centrifugação, em vez de filtração a vácuo.

O próximo grupo de ensaios, Ensaios II, III e IV, foi constituído de 3% (m/m) de bagaço pré-tratado (m.s.), carga enzimática de 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 10 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8, e solução de benzoato de sódio 1g/L para completar 100 mL em erlenmeyers de 500 mL, mantidos a 50 °C, sob agitação de 150 rpm. No tempo zero, todos os sistemas eram idênticos, sendo que a diferença entre eles residia no tempo em que eram feitas as interrupções da hidrólise e readsorção da enzima. O primeiro foi interrompido em 24 h, o segundo em 48 h e o terceiro em 72 h é importante observar que no Ensaio II foram feitas três bateladas de hidrólise.

Um último grupo de testes, Ensaios V e VI, foi conduzido com uma carga enzimática maior, agora de 15 FPU/g de celulose e 150 UI/g de celulose aplicada a concentrações de 3 e 9% (m/m, m.s.). Nestes testes a hidrólise foi interrompida em 48 h e em seguida, foi feita a readsorção da enzima.

Para efetuar uma análise quantitativa da glicose produzida e comparação dos modos de operação do reator batelada, na forma convencional e na forma de bateladas consecutivas, as Equações (3-18) e (3-19) foram utilizadas:

$$Glicose\ total_{recirculado} = V_1 \times (C_{1f} - C_{1i}) + V_2 \times (C_{2f} - C_{2i}) \quad (3-18)$$

$$Glicose\ total_{controle} = V \times (C_f - C_i) \quad (3-19)$$

onde:  $C$  = concentração de glicose na solução (mg/mL),

$V$  = volume final da solução de hidrolisado (mL),

Subíndices:  $f$  = final,

$i$  = inicial,

$_1$  = antes da readsorção da enzima, e

$_2$  = após a readsorção da enzima.

## Capítulo 4 – Resultados e discussão

### 4.1 Caracterização do bagaço

Os dados e cálculos obtidos a partir da metodologia descrita na Subseção 3.1, baseada no Método de Van Soest (SILVA, 1990), estão apresentados nas Tabelas 4.1 e 4.2. E a composição do bagaço de cana-de-açúcar analisado está sumarizada na Tabela 4.3.

**Tabela 4.1 - Caracterização do bagaço pelo Método de Van Soest (parte A).**

n° amostra	FDA 1	FDA 2	FDA 3	Média (%)
ASA (g) <sup>a</sup>	0,7668	0,7539	0,7669	
ASE (%) <sup>b</sup>	97,20	97,20	97,20	
Massa seca (g)	0,7454	0,7328	0,7454	
m cadinho (g)	49,1250	50,3013	52,2575	
m cadinho+ FDA (g)	49,6779	50,8349	52,7855	
depois do permanganato(g)	49,5545	50,7286	52,6745	
depois da mufla (g)	49,1380	50,3140	52,2705	
FDA (g)	0,5529	0,5336	0,5280	
FDA (%)	74,18	72,82	70,83	<b>72,61</b>
lignina (g)	0,1234	0,1063	0,1110	
lignina (%)	16,56	14,51	14,89	<b>15,32</b>
celulose (g)	0,4165	0,4146	0,4040	
celulose (%)	55,88	56,58	54,20	<b>55,55</b>
cinzas (g)	0,0130	0,0127	0,0130	
cinzas (%)	1,74	1,73	1,74	<b>1,74</b>

<sup>a</sup> ASA = massa da amostra pré-seca ou seca ao ar

<sup>b</sup> ASE = massa da amostra seca em estufa

**Tabela 4.2 - Caracterização do bagaço pelo Método de Van Soest (parte B).**

n° amostra	FDN 1	FDN 2	FDN 3	Média
ASA (g) <sup>a</sup>	0,7568	0,7531	0,7545	
ASE (%) <sup>b</sup>	97,20	97,20294	97,20294	
massa seca (g)	0,735632	0,732035	0,733396	
m cadinho (g)	48,4156	49,2506	48,5433	
m cadinho + FDN (g)	49,0159	49,8356	49,138	
FDN (g)	0,6003	0,585	0,5947	
FDN(%)	81,60	79,91	81,09	<b>80,87</b>

<sup>a</sup> ASA = massa da amostra pré-seca ou seca ao ar

<sup>b</sup> ASE = massa da amostra seca em estufa

**Tabela 4.3 - Composição do bagaço pré-tratado e lavado.**

<b>Celulose(%)</b>	<b>55,6</b>
<b>Lignina(%)</b>	<b>15,3</b>
<b>Hemiceluloses(%)</b>	<b>8,3</b>
<b>Cinzas (%)</b>	<b>1,74</b>

A proporção determinada de celulose no bagaço sendo superior a 50% confirma a proposição de que este substrato é muito favorável para a produção de solução de açúcares por meio de hidrólise. No Brasil, em especial, esta constatação é importante devido ao grande volume de bagaço produzido nas usinas de álcool e açúcar e à sua disponibilidade de forma concentrada numa pequena área, ao contrário de outros recursos lignocelulósicos, que se encontram muito espalhados.

## 4.2 Determinação da curva padrão do reagente DNS

Para determinar a atividade de celulase da enzima estoque, primeiramente foi construída uma curva padrão linear, descrita na Subseção 3.3.2, usando-se as concentrações de açúcares redutores expressos como glicose (mg/0,5 mL) em função da absorvância lida a 540 nm, no teste de DNS preparado segundo Miller (1959) (Subseção 3.3.1). Os resultados estão apresentados na Equação (4-1) e na Figura 4.1:

$$C_{\text{glicose}} = 4,964 \times ABS \quad (4-1)$$

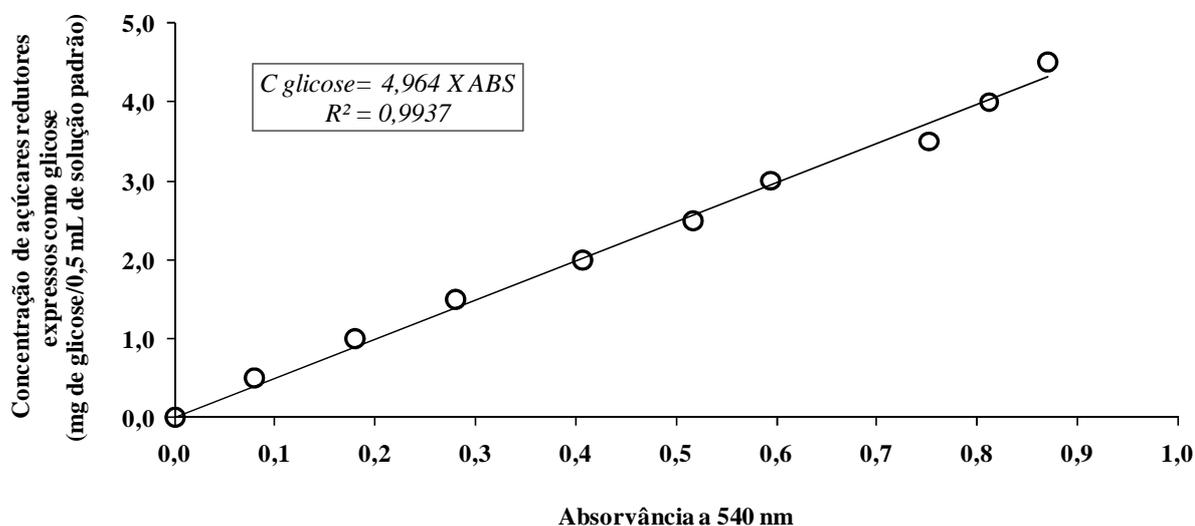


Figura 4.1 - Concentração de açúcares redutores expressos como glicose (mg de glicose/0,5 mL de solução padrão de glicose)

### 4.3 Determinação da atividade enzimática celulolítica com papel de filtro

As diluições de enzima apresentadas na Tabela 4.4, foram feitas para determinar a atividade enzimática celulolítica da enzima estoque. O termo concentração relativa da enzima diluída ( $C^*$ ) é usado para representar a proporção da solução de enzima estoque, presente na solução de enzima diluída.

Tabela 4.4 - Diluições da enzima estoque.

Diluição nº	Fator de diluição	Concentração relativa da enzima diluída ( $C^*$ )	Tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 (mL)	Enzima estoque (mL)
1	1 : 10	0,100	2,70	0,30
2	1 : 15	0,067	2,80	0,20
3	1 : 20	0,050	2,85	0,15
4	1 : 25	0,040	2,88	0,12
5	1 : 30	0,033	2,90	0,10

Os ensaios para a determinação da atividade enzimática celulolítica com papel de filtro foram conduzidos para cada uma das diluições enzimáticas apresentadas na Tabela 4.4, segundo metodologia apresentada na Seção 3.4. As absorvâncias lidas a 540 nm resultantes desses ensaios foram convertidas em concentrações de glicose, utilizando-se a equação da curva padrão de dosagem de glicose, Equação (4-1), sendo apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Absorvâncias lidas convertidas em concentrações de açúcares redutores expressos como glicose liberados nos ensaios.

Ensaio da Diluição	ABS branco enzima	ABS 1	ABS 2	ABS 3	ABS média	Açúcares redutores expressos como glicose (mg /0,5 mL de solução enzimática)
1	0,093	0,525	0,529	0,536	0,434	2,154
2	0,054	0,381	0,377	0,380	0,322	1,600
3	0,035	0,311	0,305	0,316	0,273	1,354
4	0,023	0,257	0,253	0,265	0,232	1,153
5	0,013	0,174	0,175	0,161	0,154	0,764

Relacionou-se a partir de um gráfico a concentração de açúcares redutores expressos como glicose liberados à concentração relativa da enzima diluída ( $C^*$ ) de cada um dos ensaios da reação com papel de filtro. Essa relação está ilustrada na Figura 4.2 e Equação (4-2):

$$C^* = 0,0501 \times C_{glicose} - 0,0124 \quad (4-2)$$

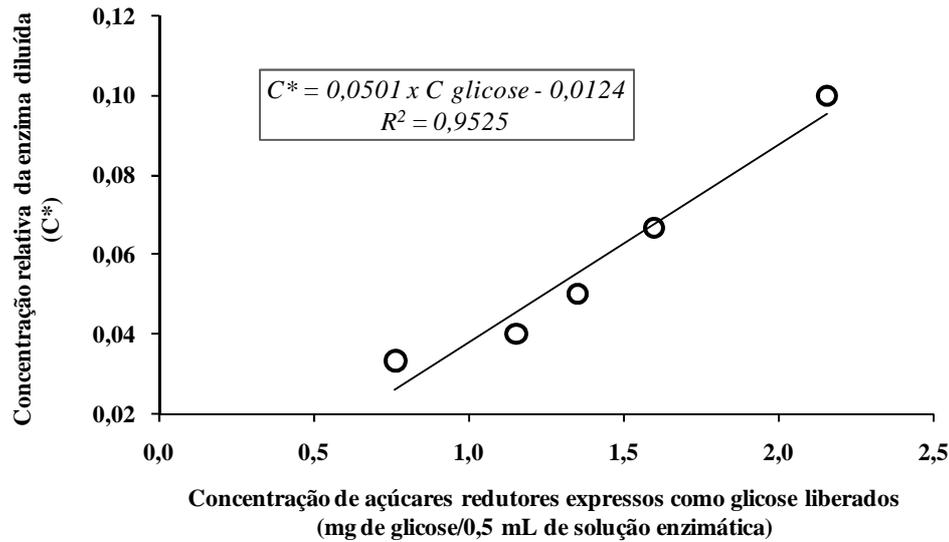


Figura 4.2 - Relação da concentração relativa do complexo enzimático celulase/celobiase diluído ( $C^*$ ) com os açúcares redutores liberados expressos como glicose.

De acordo com a Equação (4-2), determinou-se a concentração relativa da enzima diluída ( $C^*$ ) que libera exatamente 2 mg de glicose.

$$C^* = 0,0501 \times C_{glicose} - 0,0124$$

$$C^* = 0,0501 \times 2 - 0,0124$$

$$C^* = 0,0878$$

O cálculo da atividade da enzima celulase em papel de filtro foi feito com a Equação (3-7):

$$FPU = \frac{0,37}{C^* \text{ que libera 2 mg de glicose}} U/ml \quad (3-7)$$

$$FPU = \frac{0,37}{0,0878} U/ml$$

$$FPU = 4,2 U/ml$$

Por meio desse procedimento de análise e cálculo da atividade de celulase, determinou-se que a Atividade em Papel de Filtro (FPU) da enzima estoque era de 4,2 U/mL.

#### 4.4 Determinação da curva padrão do Kit GOD-POD

A curva padrão do kit glicose-oxidase, usada para quantificar a glicose em amostras de concentrações desconhecidas, foi determinada de acordo com o procedimento apresentado na Subseção 3.5.1 e está apresentada na Equação (4-3) e Figura 4.3.

$$C_{\text{glicose}} = 3,0084 \times \text{ABS} - 0,0268 \quad (4-3)$$

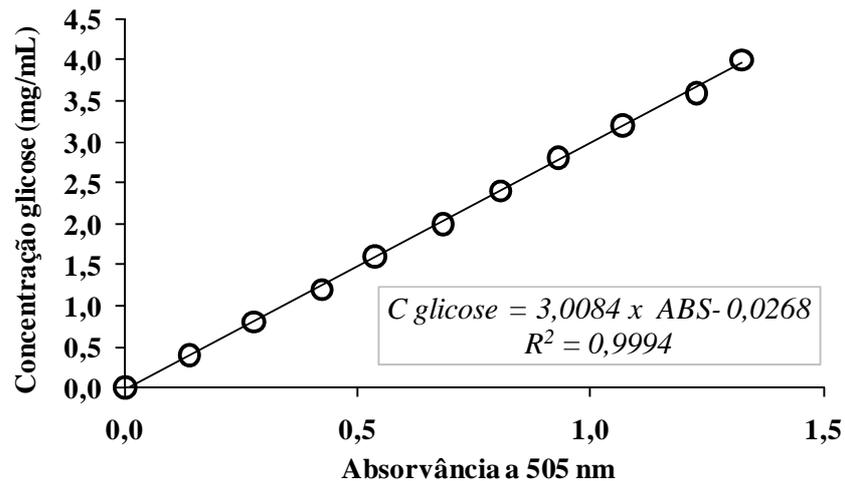


Figura 4.3 - Curva padrão para dosagem de glicose pelo kit enzimático Glicose Bioliquid.

#### 4.5 Determinação da atividade de celobiase

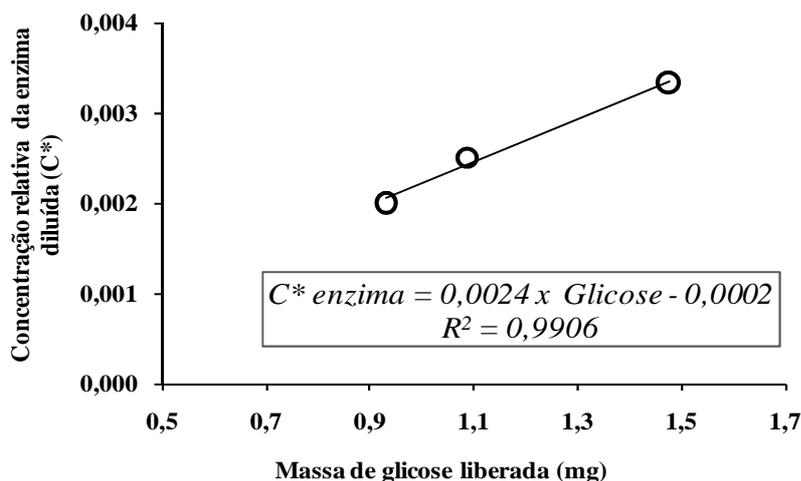
É importante conhecer a atividade da celobiase, por ser ela a responsável pela quebra da celobiose (dímero de glicose), que inibe as enzimas celulases e reduz a velocidade de hidrólise do material lignocelulósico. A atividade de celobiase em termos de UI (Unidades Internacionais), deve ser maior que a atividade de celulase em FPU, para se obter uma hidrólise eficiente. Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados dos ensaios para a determinação da atividade de celobiase da enzima estoque, obtidos de acordo com a Seção 3.6, depois da suplementação da atividade do complexo enzimático produzido na UFRJ com Novozym 188.

**Tabela 4.6 - Dados dos ensaios enzimáticos para a determinação da atividade de celobiase.**

Ensaio	Fator de diluição da enzima	C*	ABS branco enz	ABS	ABS'	ABS''	ABS média	C glicose (mg/mL)	C glicose (mg)
1	1:100	0,0100	0,004	0,359	0,359	0,362	0,356	1,04	2,09
2	1:200	0,0050	-0,004	0,282	0,286	0,287	0,289	0,84	1,69
3	1:300	0,0033	-0,007	0,272	0,254	0,263	0,270	0,79	1,57
4	1:400	0,0025	0,002	0,194	0,216	0,213	0,206	0,59	1,18
5	1:500	0,0020	-0,003	0,178	0,182	0,17	0,180	0,51	1,03

C\* = Concentração relativa da enzima diluída em relação à enzima estoque.

A Figura 4.4 foi feita utilizando-se as três últimas diluições e resultados da Tabela 4.6 para ajustar uma reta aos dados de concentração relativa da enzima diluída (C\*) em função da quantidade de glicose liberada no teste de atividade de celobiase, na região de dependência linear entre estas variáveis, dada pela Equação (4-4).



**Figura 4.4 - Relação das concentrações relativas da enzima diluída (C\*) com as massas de glicose liberadas no teste de atividade de celobiase.**

$$C^* = 0,0024 \times C_{glicose} - 0,0002 \quad (4-4)$$

A concentração de enzima que libera 1 mg de glicose, dada pela Equação (4-4), é:

$$C^* = 0,0024 \times C_{glicose} - 0,0002$$

$$C^* = 0,0024 \times 1 - 0,0002$$

$$C^* = 0,0022$$

A atividade enzimática de celobiase da enzima estoque foi calculada, usando-se a Equação (3-11):

$$CB = \frac{0,0926}{C^* \text{ que libera } 1,0 \text{ mg de glicose}} \quad (4-5)$$

$$CB = \frac{0,0926}{0,0022}$$

$$CB = 42,1 \text{ U.I. mL}^{-1}$$

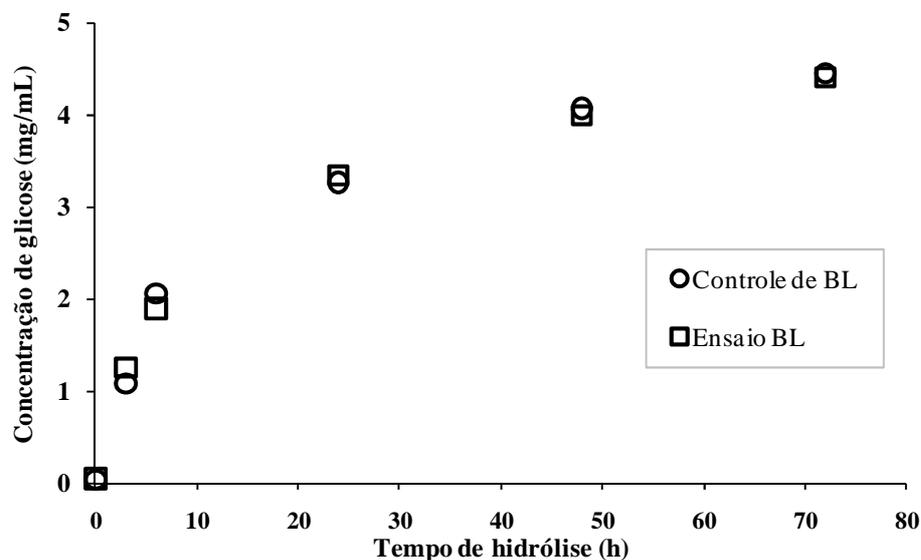
Portanto, conclui-se que a atividade enzimática de celobiase da enzima estoque era de 42,1 UI. mL<sup>-1</sup>, onde UI = Unidades Internacionais de celobiase (GHOSE, 1987).

Na discussão dos resultados dos ensaios de hidrólise do bagaço, com diferentes formas de operação do reator batelada, que serão apresentados a seguir, será indicada a atividade enzimática de celulase em FPU/g de celulose e a atividade enzimática de celobiase em UI/g de celulose.

## 4.6 Ensaios de Hidrólise

### 4.6.1 Reator batelada convencional

Os resultados do Ensaio BL, descrito na Seção 3.8.1 são apresentados na Figura 4.5:



**Figura 4.5 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio BL e de seu Controle.**  
**Ensaio BL (Batelada convencional do bagaço novamente lavado (3% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 72 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de BL (Batelada convencional do bagaço tal qual recedido (3% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 72 horas, 50 °C, 150 rpm)**

Observando-se os resultados destes ensaios, foi constatado que a lavagem do bagaço pré-tratado feita pela equipe de pesquisa da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) retirou eficientemente os resíduos do pré-tratamento passíveis de serem

removidos por esse processo de separação e o resultado de ambos os testes, com ou sem lavagem adicional, produziu praticamente o mesmo perfil de concentração de glicose em função do tempo. Portanto, o bagaço recebido não precisaria ter sido novamente lavado, uma vez que não é possível observar diferenças consideráveis na produção de glicose. Por outro lado, a lavagem adicional também não prejudicou o desempenho da hidrólise.

De acordo com o perfil apresentado na Figura 4.5, constata-se que a velocidade de conversão da celulose em glicose é maior nas 24 horas iniciais de reação, em que se produz mais da metade da glicose, decrescendo com o tempo. Yang et al. (2006) explicam que o declínio na velocidade da reação com o progresso da mesma, não pode ser atribuída às mudanças na reatividade do substrato, mas sim a outros fatores como obstáculos estruturais, tais como a enzima ficar retida ou ter sua ação retardada. Outros autores apontam a adsorção improdutiva da enzima à lignina, por meio de ligações hidrofóbicas, como responsável pelo processo (PALONEN et al., 2004). Pan et al. (2005) afirmam que o pré-tratamento por explosão a vapor, hidrolisa e remove a maior parte das hemiceluloses, provocando um aumento do teor líquido de lignina; o que sugere que o argumento de Palonen et al. (2004) pode ter uma contribuição importante no decréscimo da velocidade de hidrólise com o passar do tempo. Além desses fatores ainda existe a inibição da celulase pela glicose e celobiose produzidas durante o processo de hidrólise (XIAO et al., 2004).

#### 4.6.2 Reator batelada alimentada

Os resultados referentes aos ensaios A, B e C estão apresentados nas figuras 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente.

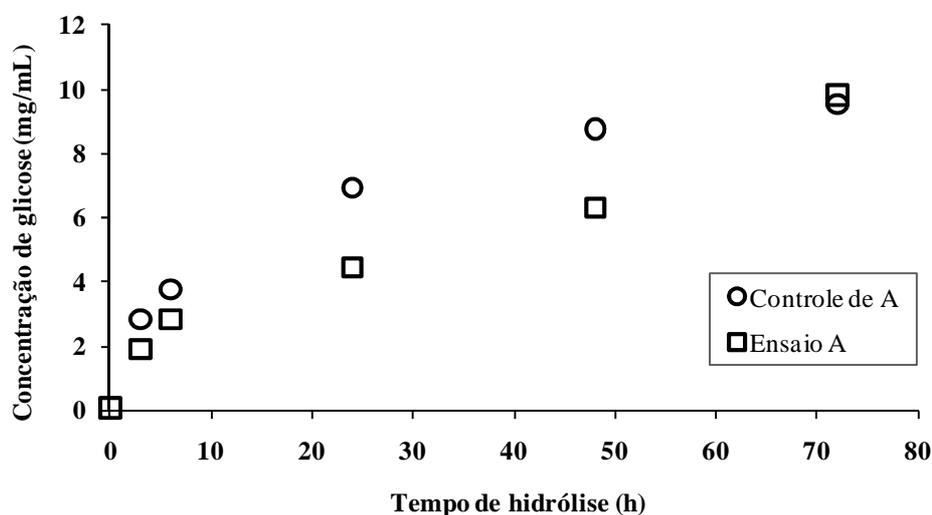


Figura 4.6 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio A e de seu Controle. Ensaio A (Batelada alimentada: 3 adições de 3% (m/m) de bagaço (m.s.), em 0, 24 e 48 horas; 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 72 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de A (Batelada convencional: 9% de bagaço, 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 72 horas, 50 °C, 150 rpm).

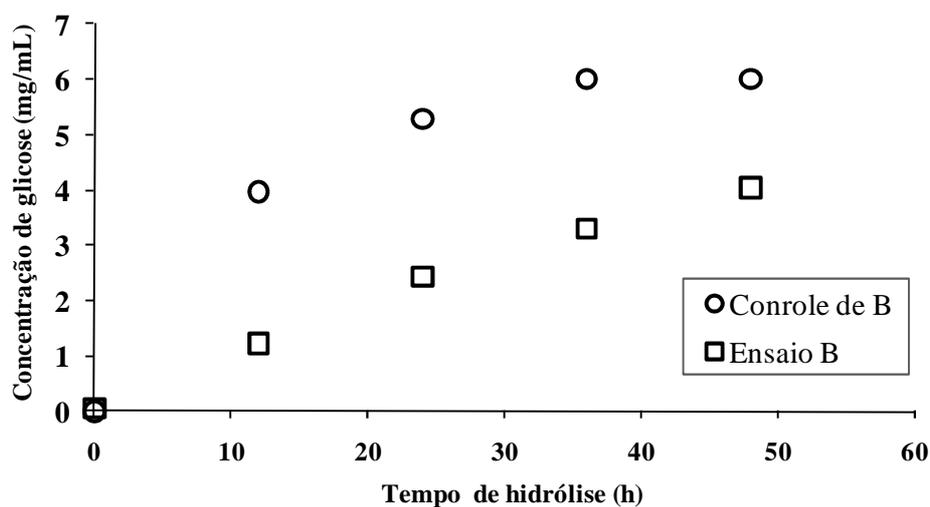
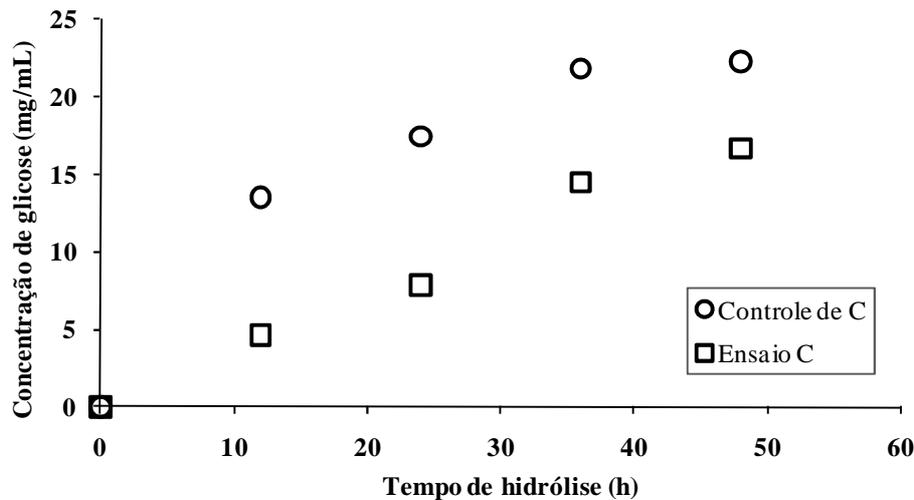


Figura 4.7 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio B e de seu Controle. Ensaio B (Batelada alimentada: 3% de bagaço total (m.s.), adições de quantidades iguais em 0, 12, 24, 36 horas, 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 48 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de B (Batelada convencional: 3% de bagaço, 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 48 horas, 50 °C, 150 rpm).



**Figura 4.8 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio C e de seu Controle.** Ensaio C (Batelada alimentada: 9% de bagaço total (m.s.), adições de quantidades iguais em 0, 12, 24, 36 horas, 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 48 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de B (Batelada convencional: 9% de bagaço, 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 48 horas, 50 °C, 150 rpm).

Do ponto de vista operacional do reator de hidrólise, o reator batelada alimentada, carece de um menor tempo de reação para as frações de bagaço alimentadas tardiamente, após o início da reação, de forma que o benefício da redução da inibição que existe na batelada convencional, causada pelo rápido acúmulo de glicose e celobiose, não foi suficiente para aumentar a velocidade da reação de hidrólise, até compensar pelo menor tempo de reação das frações de bagaço alimentadas tardiamente, e assim este tipo de reator não apresentou vantagem em relação ao reator batelada comum, nas condições testadas. Os resultados diferentes e contrastantes encontrados na literatura no que se refere à eficiência da operação batelada alimentada, assim como de outras técnicas adotadas para a obtenção de frações glicosídicas e/ou de etanol, a partir de materiais lignocelulósicos, em princípio podem ser justificadas por processos de pré-tratamento diferenciais. De acordo com alguns investigadores a etapa de pré-tratamento é determinante para o sucesso e a eficiência da hidrólise enzimática de material lignocelulósico de diferentes origens (HU e WEN, 2008; MARTIN et al., 2008; PETERSEN et al., 2009; RODGERS et al., 2009). Por outro lado, é importante considerar que a operação batelada alimentada foi recomendada como eficiente para a hidrólise de massa de lignocelulose de resíduos sólidos da indústria de papel (FAN et al., 2003), de palha de milho (VARGA et al., 2004; HODGE et al., 2009), de adubo orgânico (LIAO et al., 2005), de espécies diferentes de plantas lenhosas e de gramíneas

(ZHENG et al.; 2009). A composição química da massa de lignocelulose desses substratos, certamente é diferente da composição da massa de lignocelulose do bagaço da cana-de-açúcar.

No que se refere à massa de lignocelulose do bagaço da cana-de-açúcar, esta tem uma constituição elementar específica, por possuir uma organização e constituição de parede celular diferente da encontrada em outras espécies de monocotiledôneas e de dicotiledôneas. As plantas da ordem Poales, a exemplo da cana-de-açúcar, possuem as glicanas ligadas de uma maneira específica; as ligações mistas (1→3) e (1→4)  $\beta$ -D-glicanas são exclusivas das Poales (CARPITA e MCCANN, 2000). Além disso, a parede celular das Poales tem pouca pectina e menor quantidade de proteínas estruturais (por exemplo, de extensinas) quando comparadas com a parede celular de outras espécies de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. As microfibrilas de celulose nas Poales são encontradas interligadas por ácido glucoronico, arabinose, e xilose (GAXs), pouca pectina, e por ésteres aromáticos que estabelecem ligações cruzadas entre lignina e os polissacarídeos constituintes da parede celular; a lignina é covalentemente ligada pelos ésteres aromáticos a celulose e a xilano. Desta forma, é possível que os ésteres aromáticos (compostos fenólicos) liberados em solução a cada adição de bagaço na operação batelada alimentada, também possam interferir comprometendo a eficiência da ação das celulasas no processo de hidrólise da celulose.

Os compostos fenólicos, reconhecidos como moléculas específicas de diferentes tecidos e de diferentes espécies, importantes e determinantes do desenvolvimento das células e tecidos vegetais, frequentemente relacionados com o mecanismo de defesa contra patógenos dos tecidos das plantas, são também reconhecidos pelos seus efeitos marcantes como inibidores da ação de enzimas (CROTEAU et al., 2000). Como cada táxon e tecido vegetal possuem compostos fenólicos específicos que são liberados quando as células são rompidas mecanicamente ou quimicamente, os mecanismos pelos quais os compostos fenólicos interferem na ação de enzimas têm sido registrados desde a década de 1960 (LOOMIS e BATTAILE, 1966). Rohn et al. (2002) descreveram a ocorrência de ligações covalentes entre compostos fenólicos das plantas e sítios nucleofílicos de enzimas. Mais recentemente, Zhang et al. (2007) descreveram a inibição da enzima  $\beta$ -N-Acetil-D-glucosaminidase (NAGase, EC.3.2.1.52) que catalisa a clivagem de N-acetilglucosamina em oligossacarídeos; os investigadores mostraram que a enzima é inibida lentamente por concentrações crescentes de fenol, e que a taxa de inibição aumenta com o tempo de exposição da enzima ao fenol. A suposição de que ésteres aromáticos no bagaço da cana-

de-açúcar quando liberados em solução pela adição de massa sólida de substratos no meio de hidrólise podem inibir as enzimas celulases previamente adicionadas no meio, poderá ser testada futuramente.

Por outro lado, alguns autores têm mostrado a eficácia da operação batelada alimentada, com a adição simultânea de cargas de substratos e de celulases (LIAO et al., 2005); a alimentação do sistema com novas adições de celulases poderia ser considerada uma forma de disponibilizar enzimas no meio em que as enzimas previamente adicionadas estariam parcialmente inativadas.

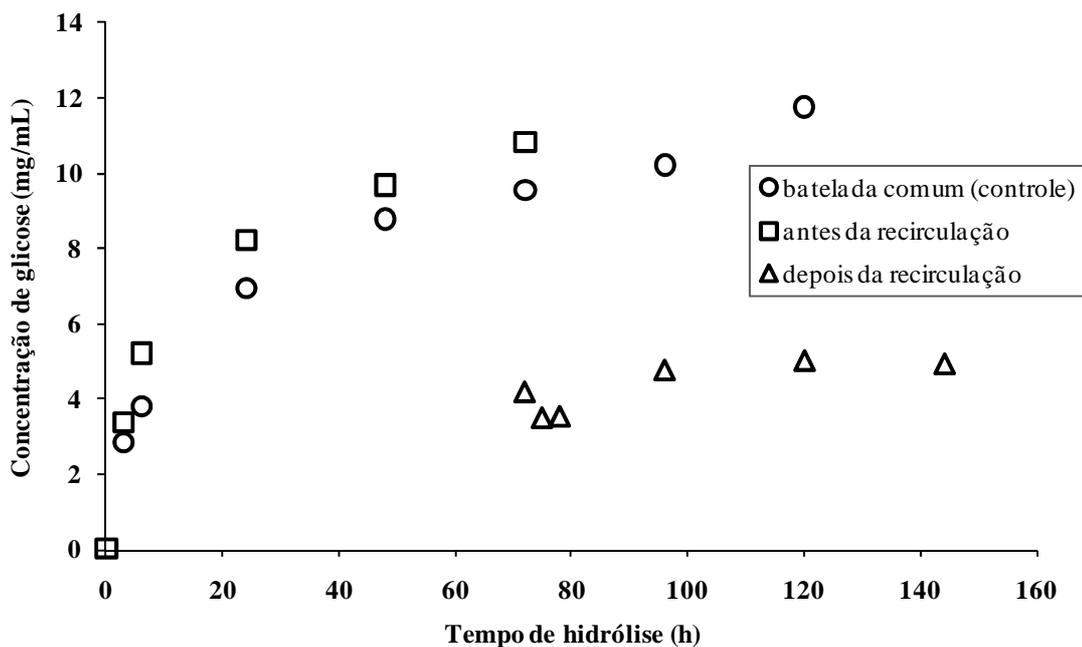
Diferentes métodos de pré-tratamento e de procedimentos para a hidrólise enzimática de material lignocelulósico têm sido desenvolvidos nas duas últimas décadas (KUMAR et al., 2009), os quais podem ajudar as enzimas a quebrar os carboidratos complexos em açúcares sem gerar compostos inibidores para as enzimas e microrganismos que promovem a sacarificação e/ou fermentação, respectivamente. Entretanto, as indicações são de que a eficiência destes métodos não pode ser generalizada porque a eficiência de determinado método parece estar diretamente relacionada com a origem do material lignocelulósico. Recentemente, Zheng et al. (2009) mostraram que o material lignocelulósico de espécies diferentes de plantas (duas espécies de lenhosas e duas espécies de gramíneas) responderam diferentemente às mesmas condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Considerando que foram feitos relativamente poucos investimentos com o uso do bagaço da cana-de-açúcar como biomassa lignocelulósica para obtenção de etanol (PANDEY et al., 2000; MARTIN et al., 2002; NEUREITER et al., 2002; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009), os resultados do presente estudo mostram que é importante que sejam feitos mais investimentos no sentido de adequar a hidrólise enzimática do bagaço de cana açúcar usando a operação de batelada alimentada, ou adotar outras metodologias alternativas que possam superar a eficiência do uso da adição de concentrações fixas de bagaço em reator batelada convencional. Os registros de que a parede celular de plantas como a cana-de-açúcar são específica e diferentemente organizadas (CARPITA e MCCANN, 2000), justificam que os métodos considerados como eficientes para os resíduos lignocelulósicos de outra natureza, ou de outras espécies de plantas, não possam ser considerados efetivos para o bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, existem evidências de falta de uniformidade genética nos clones de cana de cana-de-açúcar de variedades SP (COPERSUCAR) e variedades RB (RIDESA) (GARCIA et al., 2006; SILVA et al., 2008) usados para a produção de açúcar e álcool nas usinas brasileiras. A diversidade genética

estimada em nível de material genético (DNA), e também de características morfo-agronômicas nos clones de cana-de-açúcar de variedades SP e RB, podem ser refletidas em variações na composição química da massa de lignocelulose que revestem as células desses materiais selecionados, e podem ser importantes parâmetros norteadores para os futuros investimentos com hidrólise enzimática. Em termos práticos, a seleção de bagaço a partir de clones geneticamente uniformes, por exemplo, poderá ser útil para estabelecer uma previsão da repetibilidade e do alcance da eficiência de um e/ou outro(s) processo(s) empregado(s) para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em indústrias biotecnológicas.

#### 4.6.3 Reator tipo bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para reabsorção da enzima.

Os resultados do Ensaio I estão apresentados na Figura 4.9:



**Figura 4.9 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio I e de seu Controle.** Ensaio I (Bateladas consecutivas com reabsorção da enzima: 9% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 144 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de I (Batelada convencional: 9% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 120 horas, 50 °C, 150 rpm). OBS: neste ensaio as separações bagaço-hidrolisado foram feitas por centrifugação.

Neste experimento a separação do bagaço do hidrolisado não foi muito eficiente, uma vez que grande parte do líquido permaneceu junto com o bagaço, na primeira e na segunda separações. Devido à ineficiência do processo de separação, concluiu-se que a

glicose identificada na segunda batelada poderia ter vindo da primeira batelada. Propôs-se então outro método de separação, a filtração a vácuo, utilizando-se membrana filtrante de fibra de vidro, como indicado para o modo de operação da Figura 3.3, que foi utilizado em todos os outros ensaios descritos na Seção 3.8.3.

Os resultados dos Ensaio II, III e IV, estão apresentados nas figuras 4.10, 4.11 e 4.12, respectivamente.

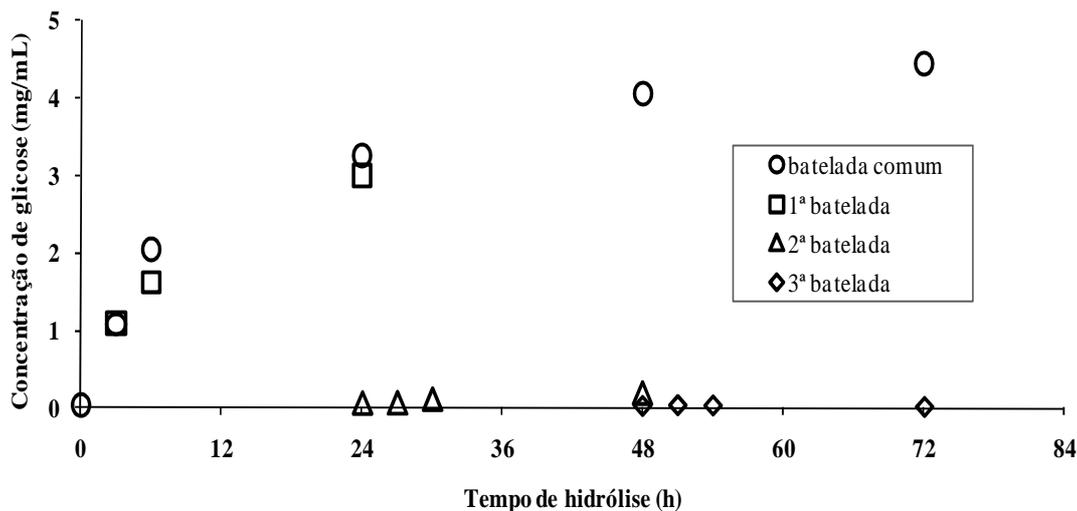


Figura 4.10 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio II e de seu Controle  
Ensaio II (Bateladas consecutivas com reabsorção da enzima: 3% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 72 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de II (Batelada comum: 3% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 72 horas, 50 °C, 150 rpm).

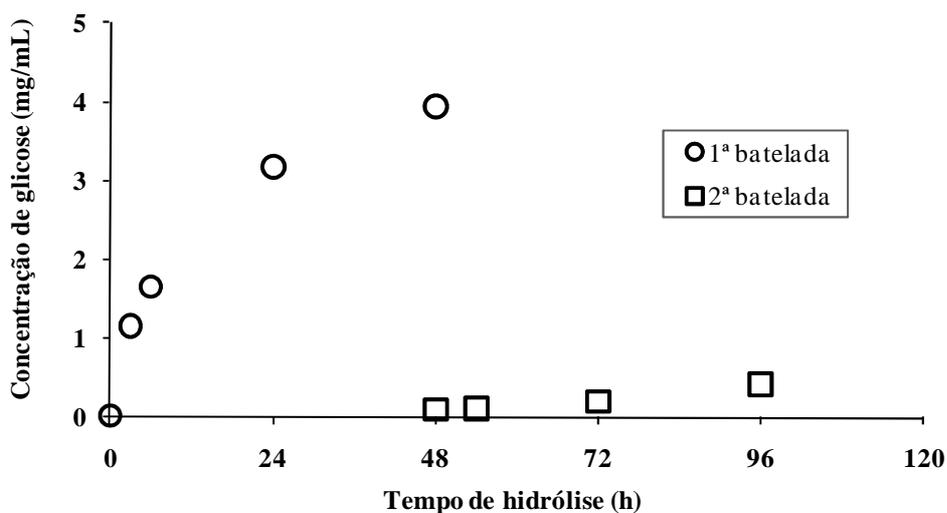


Figura 4.11 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio III.  
Ensaio III (Bateladas consecutivas com reabsorção da enzima: 3% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 96 horas, 50 °C, 150 rpm).

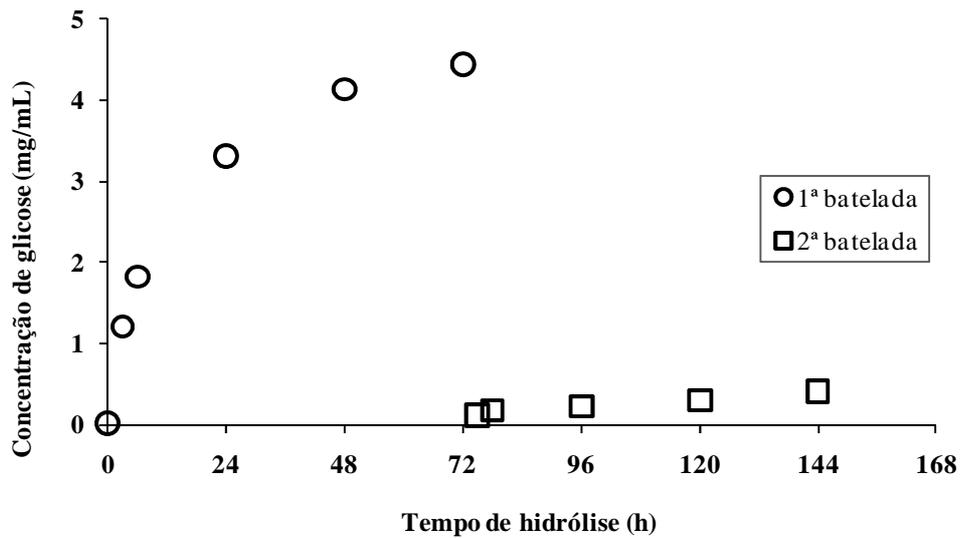


Figura 4.12 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio IV.

Ensaio IV (Bateladas consecutivas com readsorção da enzima: 3% (m/m) de bagaço (m.s.); 5,6 FPU/g de celulose, 12,4 UI/g de celulose, 144 horas, 50 °C, 150 rpm).

Os resultados dos Ensaios V e VI estão apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14, respectivamente.

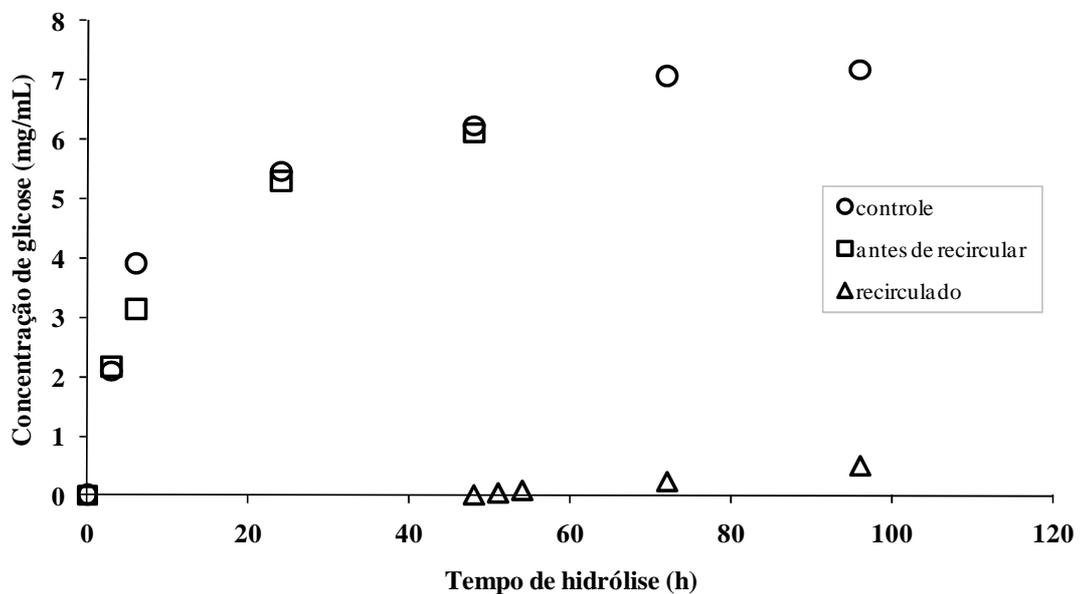
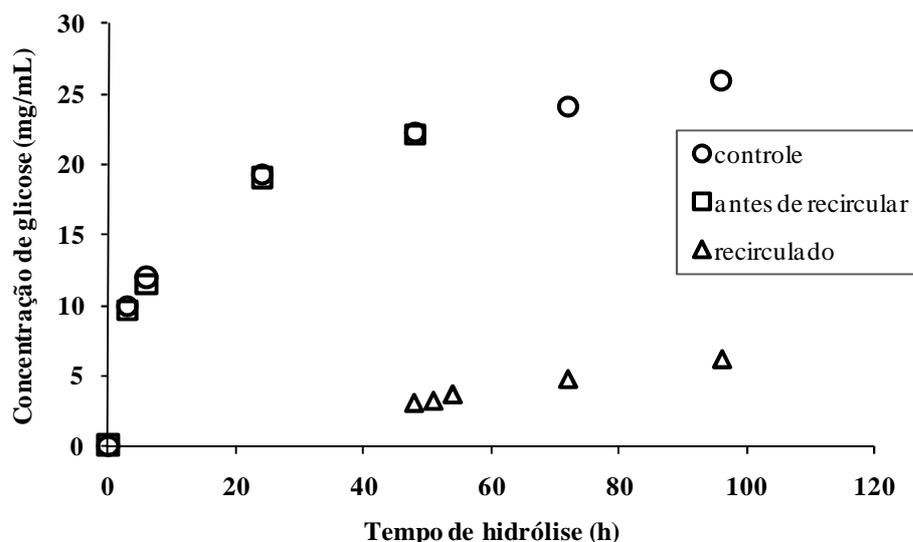


Figura 4.13 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio V e de seu Controle.

Ensaio V (Bateladas consecutivas com readsorção da enzima: 3% (m/m) de bagaço (b.s), 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 96 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de V (Batelada convencional: 3% (m/m) de bagaço (b.s), 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 96 horas, 50 °C, 150 rpm).



**Figura 4.14 - Concentração de glicose (mg/mL) com o tempo do Ensaio VI e de seu Controle. Ensaio VI (Bateladas consecutivas com reabsorção da enzima: 9% (m/m) de bagaço (b.s), 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 96 horas, 50 °C, 150 rpm) e Controle de VI (Batelada convencional: 9% (m/m) de bagaço (b.s), 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 96 horas, 50 °C, 150 rpm.**

Ao comparar os Ensaio II, III e IV, como o Ensaio V, observa-se que um aumento na atividade da celulase de 5,6 FPU/g de celulose e 12,4 UI/g de celulose para 15 FPU/g de celulose e 150 UI/g de celulose, é perceptível o aumento do grau de conversão da celulose para uma carga de sólidos de 3%. O que está de acordo com Tengborg et al. (2001b) que constataram que uma adição de celobiase de até 50 UI/g de celulose à hidrólise enzimática de Pinheiro, a uma carga de celulase de até 48 FPU/g de celulose resulta em um maior grau de conversão da celulose. Os autores ainda concluíram a importância de melhorar o pré-tratamento da matéria-prima e desenvolver um sistema enzimático eficiente para a hidrólise da madeira, tornando possível diminuir o carregamento de enzima; ao verificar que atividades muito altas de celulase e celobiase (120 FPU/g de celulose e 120 UI/g de celulose) a completa hidrólise do material pré-tratado por vapor não foi observada.

A análise das Figuras 4.10 a 4.14 demonstra que em todos os testes, o reator batelada convencional foi mais eficiente que o modo de operação do reator com bateladas consecutivas, para produzir um maior teor de glicose num mesmo tempo de reação.

A análise quantitativa da comparação dos desempenhos do reator batelada convencional (Controle) e do reator bateladas consecutivas foi feita com o auxílio das Equações (3-18) e (3-19) para os Ensaio V e VI. Os resultados dessa análise estão sumarizados nas Tabelas 4.7 e 4.8.

**Tabela 4.7 - Ensaio V: Bateladas consecutivas com readsorção da enzima com 3% (m/m, m.s.) de bagaço, 15 FPU/g de celulose e 150UI/g de celulose.**

Bateladas Consecutivas			Batelada Convencional		
<b>1<sup>a</sup></b>	V <sub>1</sub> (mL)	67	<b>Batelada única</b>	V (mL)	80
<b>batelada</b>	C <sub>1i</sub> (mg/mL)	0		C <sub>i</sub> (mg/mL)	0,017
48 horas	C <sub>1f</sub> (mg/mL)	6,110		C <sub>f</sub> (mg/mL)	7,174
<b>2<sup>a</sup></b>	V <sub>2</sub> (mL)	83	96 horas		
<b>batelada</b>	C <sub>2i</sub> (mg/mL)	0			
48 horas	C <sub>2f</sub> (mg/mL)	0,506			
Glicose total (mg)			450,21	Glicose total (mg) 569,00	

**Tabela 4.8 - Ensaio VI: Bateladas consecutivas com readsorção da enzima com 9% (m/m, m.s.) de bagaço, 15 FPU/g de celulose e 150UI/g de celulose.**

Bateladas Consecutivas			Batelada Convencional		
<b>1<sup>a</sup></b>	V <sub>1</sub> (mL)	51	<b>Batelada única</b>	V (mL)	63
<b>batelada</b>	C <sub>1i</sub> (mg/mL)	0,0775		C <sub>i</sub> (mg/mL)	0,031
48 horas	C <sub>1f</sub> (mg/mL)	22,135		C <sub>f</sub> (mg/mL)	25,953
<b>2<sup>a</sup></b>	V <sub>2</sub> (mL)	61	96 horas		
<b>batelada</b>	C <sub>2i</sub> (mg/mL)	3,088			
48 horas	C <sub>2f</sub> (mg/mL)	6,159			
Glicose total (mg)			1316,45	Glicose total (mg) 1628,77	

Observando as Tabelas 4.7 e 4.8, conclui-se novamente que o modelo de bateladas consecutivas, com aproveitamento do hidrolisado para readsorção da enzima, também é menos eficiente em termos de produção de glicose, do que a batelada convencional, com base no mesmo tempo de reação.

Os resultados apresentados neste item concordam com Palonen et al. (2004) que afirmam que o reciclo de celulasas depois da hidrólise enzimática tem se mostrado difícil devido à baixa recuperação das enzimas. Os resultados dos testes com operação, na forma de bateladas consecutivas, demonstraram claramente que a enzima, que poderia se encontrar tanto no meio líquido reacional, como adsorvida na lignina do resíduo de bagaço não reagido, não é eficientemente transferida para o bagaço fresco das bateladas sucessivas, fazendo com que a produção de glicose na segunda ou terceira batelada sucessiva, seja muito ineficiente, em face de um baixo nível de hidrólise do bagaço, na presença de baixa concentração de enzima.

O modo de operação do reator batelada, na forma de bateladas consecutivas visava reduzir o efeito de inibição da hidrólise pela glicose e celobiose, separando-se o meio reacional líquido do sólido não convertido. Supunha-se que ao final do tempo pré-estipulado de reação, a enzima estivesse no meio reacional líquido, e por isso foi providenciado os passos de separação do sobrenadante e do resíduo sólido de bagaço não

reagido, para a adsorção da enzima por bagaço fresco e a continuação da hidrólise com bateladas sucessivas e sem adicionar-se mais enzima. No entanto, devido à baixa eficiência de hidrólise das bateladas sucessivas, pode-se concluir que não houve a transferência adequada da enzima para as bateladas sucessivas, provavelmente porque a maior parte da enzima estava adsorvida no resíduo de bagaço não reagido, ou alternativamente o tempo de contato de adsorção de uma hora foi insuficiente.

Outro problema deste tipo de operação é a dificuldade de se operar com elevadas concentrações de bagaço que devem ser utilizadas para a recuperação da enzima, a fim de não se trabalhar nas bateladas sucessivas, com um teor muito baixo de bagaço. As elevadas concentrações de bagaço necessárias dificultam a agitação e homogeneização do meio reacional, prejudicando por sua vez a transferência da enzima do meio reacional líquido, para o bagaço fresco.

Em função dos dados apresentados e dos argumentos apresentados para a sua interpretação, conclui-se que, a melhor forma de operação do reator batelada, para se atingir a maior eficiência de produção de glicose, na hidrólise de bagaço de cana, pré-tratado por explosão a vapor e lavado, é a batelada convencional, que chegou a produzir 26 g/L de glicose, no teste com 9% de bagaço (m/m, m.s.), 15 FPU/g de celulose, 150 UI/g de celulose, 96 horas de reação a 50 °C.

## Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões

### 5.1 Conclusões

As conclusões obtidas na realização deste trabalho são expostas a seguir:

- A necessidade de lavagem do material pré-tratado para a remoção de inibidores torna o processo mais caro. Dessa forma, a otimização dos pré-tratamentos no sentido de minimizar a produção de inibidores, e suprimir a necessidade desse processo de separação, pode contribuir com a consolidação da tecnologia.
- A aplicação de outros tipos de pré-tratamento que não aumentem o teor líquido de lignina, como acontece com a explosão a vapor, podem retardar o decrescimento da velocidade de sacarificação com o tempo, uma vez que a lignina é um importante inibidor da reação.
- A eficiência dos métodos de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica não pode ser generalizada, porque a eficiência de determinado método parece estar diretamente relacionada com a origem do material lignocelulósico e ao pré-tratamento a que é exposto esse material.
- Este estudo demonstrou que, nas condições testadas para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por explosão a vapor e lavado, a operação do reator batelada no modo convencional é mais eficiente do que a operação em batelada alimentada, ou em bateladas consecutivas com adsorção da enzima, para alcançar uma maior produção de glicose num dado tempo de reação.
- Do ponto de vista operacional do reator batelada, a batelada alimentada causa um tempo de reação menor para as frações de bagaço alimentadas com maior tempo de reação e por isso a produção de glicose é menor do que a batelada convencional. A expectativa de que a batelada alimentada fosse aumentar a velocidade média de hidrólise, por retardar o aparecimento de inibidores da reação, não foi confirmada, nas condições testadas.
- A batelada consecutiva que foi realizada na perspectiva de que a recuperação da enzima e separação da solução de glicose pudessem, respectivamente, aumentar a produtividade de glicose e reduzir a inibição da reação de hidrólise pela glicose e celobiose, não correspondeu às expectativas, provavelmente porque não houve suficiente transferência da enzima adsorvida no resíduo de bagaço não reagido, para as novas porções de bagaço fresco das bateladas sucessivas, além de

apresentar dificuldade de agitação, em função das elevadas concentrações de bagaço necessárias durante a tentativa de recuperação da enzima.

- Os objetivos do trabalho foram alcançados, uma vez que as concentrações de glicose no hidrolisado para cada configuração de reator pôde ser determinada com segurança pelo método GOD-POD, os modos de operação do reator batelada puderam ser comparados e foram levantadas hipóteses, fundamentadas na literatura, com o objetivo de propor explicações para os resultados obtidos e nortear a continuidade das pesquisas, nesta área de grande importância nacional.
- A tecnologia de produção de etanol de materiais lignocelulósicos em geral, por meio da hidrólise enzimática, constitui-se em um vasto campo de pesquisa, em que muitos experimentos e investimentos ainda devem ser feitos até sua completa viabilização comercial.

## 5.2 Sugestões

O desenvolvimento dessa dissertação permitiu a formulação de algumas sugestões de continuidade da pesquisa.

Frente aos resultados apresentados para o reator tipo bateladas consecutivas com aproveitamento do hidrolisado para reabsorção da enzima, a recomendação para investigar a hipótese de que a enzima não passou para a batelada seguinte por estar adsorvida no bagaço descartado entre uma batelada e outra, é realizar um experimento em que o bagaço de uma batelada, também esteja na batelada seguinte. Poderão ser feitas três bateladas consecutivas, de 24 horas cada, com uma única carga enzimática no início. Na primeira batelada serão alimentados 3% de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, e uma carga enzimática equivalente à alimentação de 9% de substrato. Passadas as 24 horas, o meio é filtrado, utilizando-se papel filtro de fibra de vidro, o volume do sobrenadante é medido e a quantidade de açúcares nele contida, é dosada. O bagaço é reservado para a próxima batelada, à qual são adicionados mais 3% de bagaço novo, 10 g de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8 e solução de benzoato de sódio 1g/L para completar 100g. Mais 24 horas na incubadora a 50 °C e 150 rpm, e repete-se o procedimento do final da 1ª batelada para o início da 2ª, para a constituição da 3ª batelada, que também é incubada por 24 horas. Em paralelo, deve ser feita uma batelada única com carga de substrato de 9%, e carga enzimática suficiente para os 9% de bagaço, a reação deve ser desenvolvida por 72

horas. Por fim, é verificado se a soma dos açúcares produzidos com as três bateladas é maior que no caso da batelada única.

Num segundo experimento, podem ser conduzidas bateladas únicas, com 3, 6, 9 e 12% (m/m) de bagaço pré-tratado, com período de sacarificação igual a 72 horas, das quais sejam feitas várias amostragens, uma para cada tempo de reação. A concentração de glicose em cada tempo deve ser então determinada, e os dados obtidos, ajustados ao Modelo Cinético tipo Langmuir-Michaelis-Menten, que se baseia na cinética de Michaelis-Menten com substrato sólido. O modelo poderá ser então utilizado para determinar os tempos adequados de adições de substrato e melhorar o desempenho do reator tipo “fed-batch”, ou batelada alimentada.

Baseado nos indícios de que a lignina é um importante inibidor da hidrólise enzimática, um terceiro teste ainda pode ser proposto. Neste caso, o bagaço pré-tratado por explosão a vapor deve ter seu desempenho comparado com o bagaço pré-tratado por outros métodos que primem pela remoção da lignina, como a ozonólise e o pré-tratamento alcalino. Para isso três ensaios devem ser conduzidos em reator batelada convencional, por 72 horas, estes devem manter as mesmas características quanto às cargas enzimáticas e de sólidos, variando apenas o tipo de pré-tratamento.

Por último, ainda pode ser sugerido, que se verifique a hipótese de que a lignina é responsável pela inativação das enzimas, fazendo operar um reator batelada convencional, contendo apenas lignina isolada do bagaço de cana pré-tratado, a mistura enzimática contendo celulase e celobiase, tampão e bactericida. Amostras retiradas de tempos em tempos seriam analisadas para medir-se tanto a atividade enzimática de celulase quanto a de celobiase. Testes controles poderiam ser realizados na presença de celulase ou hemicelulase, em apenas tampão, em lugar da lignina. Os resultados seriam analisados para determinar-se a perda de atividade das enzimas em função do tempo e dos diferentes meios de reação.

## Referências

ADNEY, B.; BAKER, J. LAP-006: Measurement of Cellulase Activities. **National Renewable Energy Laboratory**, 1996. Disponível em :<[http://www.eere.energy.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html)>. Acesso em: 30 jul. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (ANEEL). **Atlas de Energia Elétrica do Brasil**. Segunda Edição, 2005. Disponível em <<http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/Atlas/index.html>>. Acesso em: 30 jul. 2007.

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 and Biotechnology**, v. 25, p. 184-192, 2000.

ALIZADEH, H.; TEYMOURI, F.; GILBERT, T. I.; DALE, B. E. Pretreatment of switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1133-1141, 2005.

ANSELMO FILHO, P.; BADR, O. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. **Applied Energy**, v. 77, p. 51-67, 2004.

AZIZ, S.; SARKANEN, K. Organosolv pulping: a review. **Tappi Journal**, v. 72, 169-175, 1989.

AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. **Journal of Environmental Science and Health. Part B**, v. 24, n. 4, p. 421-433, 1989.

BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 717-732, 2002.

BAUDEL H. M. **Pré-tratamento e hidrólise**. 2006. Palestra apresentada no III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol, 2006. Disponível em: <[http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/docs-IIIworkshop\\_hidrolise.php](http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/docs-IIIworkshop_hidrolise.php)>. Acesso em: 30 jul. 2007.

BHATTACHARYA, D.; GERMINARIO, L. T.; WINTER, W. T. Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 371-377, 2008.

BISARIA, V. S. Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. In: Martin, A.M. (Ed.), **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. Elsevier, London, p. 210-213, 1991.

BRECCIA, J. D.; CASTRO, G. R.; BAIGORÍ, M. D.; SIÑERIZ, F. Detection of endo-xylanase activities in electrophoretic gels with congo red staining. **Biotechnology Techniques**, v. 9: p. 145-148, 1995.

CALSAVARA L. P. V.; MORAES F. F.; ZANIN G. M. Modeling cellobiose hydrolysis with integrated kinetic models. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 789-806, 1999.

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

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007, Natal. **Anais do XLVII Congresso Brasileiro de Química**, 2007.

CARPITA, N; MCCANN, M. The cell wall. In: Buchanan, B., Gruissem, W.; Jones, R. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p. 52-108, Courier Companies, Inc. U.S.A., 2000.

CASTANO, H. I.; MEJIA, C. E. Ethanol production from cassava starch using the process strategy simultaneous saccharification-fermentation. **Vitae-Revista de La Facultad de Química Farmacêutica**, v. 15, p. 251-258, 2008.

CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G.; MEIRELES, C. S. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 579-582, 2007.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 5-37, 2000.

CHEN, M.; WANG, Z. F.; XIA, L. M. Ethanol fermentation on xylose by immobilized recombinant yeast. **J. Zhejiang University (Eng. Sci.)**, v. 42, p. 290-293, 2008.

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

CHUM, H. L.; JOHNSOON, D. K.; BLACK, S. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: 1. enzyme hydrolysis of cellulosic residues. **Biotechnololy Bioengineering**, v. 31, p. 643-649, 1988.

CONVERSE, A. O.; OOSHIMA, H.; BURNS, D. S. Lignin kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on and cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24/25, p. 67, 1990.

COSTA, S. M.; GONÇALVES, A. R.; ESPOSITO, E. Action of White-rot fungus *Panus tigrinus* on sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 357-364, 2002.

COUGHLAN, M. P.; LJUNGDAHL, L. G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. In: Aubert, J.-P., Beguin, P., Millet, J., **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**, p. 11-30, 1988.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: Buchanan, B., Grissem, W.; Jones, R. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p. 1250-1318, Courier Companies, Inc. U.S.A., 2000.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P.  $\beta$ -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4929-4936, 2000.

DEMAIN, A. L.; NEWCOMB M.; WU J. H. D. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124-154, 2005.

DEPARTMENT OF ENERGY (DOE). **Energy efficiency and Renewable Energy Biomass Program**. Disponível em <[http://www1.eere.energy.gov/biomass/sugar\\_platform.html](http://www1.eere.energy.gov/biomass/sugar_platform.html)>. Acesso em: 30 jul. 2007.

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

ESTEGHLALIAN, A.; HASHIMOTO, A. G.; FENSKE, J. J.; PENNER, M. H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 129-136, 1997.

FAN, L.-T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y.-H. Cellulose Hydrolysis In: **Biotechnology Monographs**. Springer, Berlin, v. 3, p. 57, 1987.

FAN, Z.; SOUTH, C.; LYFORD, K.; MUNSIE, J.; VAN WALSUM, P.; LYND, L. R. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. **Bioprocess Biosystem and Engineering**, v. 26, p. 93-101, 2003.

FINGUERUT, J. **Produção de álcool de bagaço por hidrólise enzimática**. Abr-Jun de 2007. Disponível em: <<http://www.revistaopinioes.com.br/aa/materia.php?id=153>>. Acesso em: 11 ago. 2009.

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

GARCIA, A. A.; KIDO, E. A.; MEZA, A. N.; SOUZA, H. M.; PINTO, L. R.; PASTINA, M.; LEITE, C. S.; SILVA, J. A.; ULIAN, E. C.; FIGUEIRA, A.; SOUZA, A. P. Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum spp.*) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. **Theoretical Applied Genetics**, v. 112, p. 298-314, 2006.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p. 257-268, 1987.

GRAF, A.; KOEHLER, T. **Oregon cellulose ethanol study: An evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstocks**. Oregon Office of Energy, 30p + anexos, 2000. Disponível em <<http://www.oregon.gov/ENERGY/RENEW/Biomass/study.shtml>>. Acesso em: 30 jul. 2007.

GUIMARÃES, J. L.; FROLLINI, E.; SILVA, C. G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K. G.; Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 407-415, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I. GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007.

HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HODGE, D. B.; KARIM, M. N. SCHELL, D. J. MCMILLAN, J. D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 88-107, 2009.

HOLTZAPPLE, M. T.; COGNATA, M.; SHU, Y.; HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology Bioengineering**, v. 36, p. 275-287, 1990.

HOLTZAPPLE, M. T.; JUN, J-H.; ASHOK, G.; PATIBANDLA, S. L.; DALE, B. E. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/29, p. 59-74, 1991.

HU, Z.; WEN, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 38, p. 369-378, 2008.

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

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY C., Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities; **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

KALDERIS, D.; KOUTOULAKIS, D.; PARASKEVA, P.; DIAMADOPOULOS, E.; OTAL, E.; OLIVARES DEL VALLE, J.; FERNÁNDEZ-PEREIRA, C. Adsorption of polluting substances on activated carbons prepared from rice husk and sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 144, p. 42-50, 2008.

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

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

LIAO, M. W.; WEN, Z.; HURLEY, S.; LIU, Y.; LIU, C.; CHEN, S. Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1017-1030, 2005.

LOOMIS, W. D.; BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and isolation of plant enzymes. **Phytochemistry**, v. 5, p. 423-427, 1966.

LORA, E. S.; ANDRADE, R. V. Biomass as energy source in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 4, p. 777-788, 2009.

LU, Y., YANG, B, GREGG, D. J., SADDLER, J. N., MANSFIELD, S. D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during the hydrolysis of steam-exploded softwood residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 641-654, 2002.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-65, 1996.

MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

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

MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJODE, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 339-352, 2007.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.; HAHN-HAGERDAL, B.; JONSSON, L. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MARTIN, C.; MARCET, M.; THOMSEN, A. B. Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresources**, v. 3, p. 670-683, 2008.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresourche Technology**, v. 100, p. 2392-2398, 2009.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Overend, R.P., **Enzymatic Conversion of Biomass for fuels production**, v. 566, p. 292-324, American Chemical Society, Washington, DC, 1994.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M.; GROHMANN, K.; WYMAN, C. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 33, p. 67-81, 1992.

MONONMANI, H. K.; SREEKANTIAH, K. R. Saccharification of sugar-cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viride*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 484-488, 1987.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MULINARI, D. R.; SILVA, M. L. C. P. Adsorption of sulphate ions by modification of sugarcane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 617-620, 2008.

NEELY, W. C. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. **Biotechnololy Bioengineering**, v. 20, p. 59-65, 1984.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98/100, p. 49-58, 2002.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIE, J. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. **Oil and Gas Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 67-94, 1999.

PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v.107, p. 65-72, 2004.

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1069-1079, 2005.

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

PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6305-6317, 2009.

PENNER, M. H.; LIAW, E. T. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma* cellulase, Enzymatic conversion of biomass for fuels production **ACS Symposium Series**, v. 566, p. 363-371, 1994.

- PEREIRA, F. V.; GURGEL, L. V. A.; DE AQUINO, S. F.; GIL, L. F. Removal of Zn<sup>2+</sup> from Electroplating Wastewater Using Modified Wood Sawdust and Sugarcane Bagasse. **Journal of Environmental Engineering-ASCE**, v. 135, p. 341-350, 2009.
- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HAGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. **Proceeding Biochemistry**, v. 26, p. 65-74, 1991.
- PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 834-840, 2009.
- PIRES, A. J. V.; REIS, R. A.; DE CARVALHO, G. G. P.; SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p. 953-957, 2006.
- RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H., et al. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p.484-489, 2006.
- RASUL, M. G.; RUDOLPH, V.; CARSKY, M. Physical properties of bagasse. **Fuel**, v. 78, p. 905-910, 1999.
- RODGERS, M.; HU, Z.; ZHAN, X. Enhancing enzymatic hydrolysis of maize stover by bayer process sand pretreatment. **Energy and Fuels**, v. 23, p. 2284-2289, 2009.
- ROHN, S.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Inhibitory Effects of Plant Phenols on the Activity of Selected Enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3566-3571, 2002.
- ROSGAARD, L.; ANDRIC, P.; DAM-JOHANSEN, K.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. S. Effects of Substrate Loading on Enzymatic Hydrolysis and Viscosity of Pretreated Barley Straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143, p. 27- 40, 2007.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDEN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 37, p. 195-204, 2005.

RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DE AMORIM, M. T. P.; GONÇALVES A. R. Cellulosic films obtained from the treatment of sugarcane bagasse fibers with N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 154, p. 217-226, 2009.

SAHA, B. C., COTTA, M. A. Fuel ethanol production from agricultural residues: current status and future prospects. **Journal of Biotechnology**, v. 136(S), p. S285-S286, 2008.

SAHA, B.C. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 403-423, 2000.

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

SARKANEN, K.V. Acid-catalyzed delignification of lignocellulosics in organic solvents. **Progress in Biomass Conversion**, v. 2, p. 127-144, 1980.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2009.

SCHELL, D. J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J. D. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 69-85, 2003.

SCHELL, D. J.; RUTH, M. F.; TUCKER, M. P. Modeling the enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated Douglas Fir. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 67-81, 1999.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol**. Master of Science Thesis. Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden, 2005.

SILVA, C. M.; MANGOLIN, C. A.; MOTT, A. S.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic diversity associated with in vitro and conventional bud propagation of *Saccharum* varieties using RAPD analysis. **Plant Breeding**, v. 127, p.160-165, 2008.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Imprensa Universitária, 166 p., 1990.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **O Setor Sucroalcooleiro e o domínio tecnológico**, Vol. 2, Nova Série, NAIPPE/USP. Disponível em: <[http://www.naippe.fm.usp.br/arquivos/livros/Livro\\_Naippe\\_Vol2.PDF](http://www.naippe.fm.usp.br/arquivos/livros/Livro_Naippe_Vol2.PDF)>. Acesso em: 30 jul. 2007.

SÖDERSTRÖM, J.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 744-749, 2004.

STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, p. 35-53, 1976.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 110-117, 2001b.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 835-844, 2001a.

THRING, R. W.; CHORENT, E.; OVEREND, R. Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature. **Biomass**, v. 23, p. 289-305, 1990.

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnololy Bioengineering**, v. 15; p. 1122-1131, 2008.

VARGA, E.; KLINKE, H. B.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A. B. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 567- 574, 2004.

VASQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 141-153, 2007.

VESSIA O. **Biofuels from lignocellulosic material** - In the Norwegian context 2010 - Technology, Potential and Costs. 2005. 101 p. Project report - Faculty of information technology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, NO, 2005.

VIDAL, P. F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin: improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, v. 16, 1-17, 1988.

WRIGHT, J. D.; POWER, A. J.; DOUGLAS, L. J. Design and parameter evaluation of an enzymatic hydrolysis process (separation hydrolysis and fermentation). **Biotechnology Bioengineering**, v. 17, p. 285-302, 1986.

WU, Z., LEE Y. Y. Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 10, p. 977-979, 1997.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, p. 189-226, 1999.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1959-1966, 2005.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 1115-1126, 2004.

XIN, Z.; YINBO, Q.; PEIJI, G. Acceleration of ethanol production from paper mill waste fiber by supplementation with  $\beta$ -glucosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 62-65, 1993.

YANG, B.; LU, Y. The promise of cellulosic ethanol production in China. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 6-10, 2007.

YANG, B.; WILLIES, D. M.; WYMAN, C. E. Changes in the enzymatic hydrolysis rate of avicel cellulose with conversion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, p. 1122-1128, 2006.

YUN, S. I.; JEONG, C. S.; CHUNG, D. K.; CHOI, H.S. Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.65, p. 2028-2032, 2001.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BON, E. P. S.; GIORDANO, R. C. L.; DE MORAES, F. F., ANDRIETTA, S. R.; NETO, C. C. D.; MACEDO, I. C.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ZHANG, J.; HEISSB, C.; THORNEA, P. G.; BALB, C.; AZADIB, P.; LYND, L. R. Formation of ethyl-xylopyranoside during simultaneous saccharification and co-fermentation of paper sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 196-202, 2009.

ZHANG, J-P.; YAN, Y-W.; XIE, J-J.; WANG, Q.; CHEN, Q-X. Inhibitory kinetics of phenol on the enzyme activity of  $\beta$ -N-acetyl-d-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 139-143, 2007.

ZHENG, Y. Z.; LIN, H. M.; TSAO, G .T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 890-896, 1998.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. **Applied Energy**, v. 86, p. 2459-2465, 2009.

ZHU, Y.; LEE, Y. Y.; ELANDER, R. T. Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 1045-1054, 2005.