



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TIGRESSA HELENA SOARES RODRIGUES

**ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR PROCESSOS DE
SHF (FERMENTAÇÃO E HIDRÓLISE SEPARADAS) E SSF (FERMENTAÇÃO E
HIDRÓLISE SIMULTÂNEAS) DE BAGAÇO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)**

FORTALEZA

2014

TIGRESSA HELENA SOARES RODRIGUES

ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR PROCESSOS DE SHF (FERMENTAÇÃO E HIDRÓLISE SEPARADAS) E SSF (FERMENTAÇÃO E HIDRÓLISE SIMULTÂNEAS) DE BAGAÇO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)

Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Co-orientadora: Profª. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

R617e Rodrigues, Tigressa Helena Soares.

Estudo comparativo da produção de etanol por processos de SHF (fermentação e hidrólise separadas) e SSF (fermentação e hidrólise simultâneas) de bagaço de caju (*Anacardium occidentale* L.) / Tigressa Helena Soares Rodrigues. – 2014.

107 f. : il. , enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

1. Engenharia Química. 2. Fermentação alcoólica. 3. Bagaço de caju. I. Título.

TIGRESSA HELENA SOARES RODRIGUES

ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR PROCESSOS DE SHF (FERMENTAÇÃO E HIDRÓLISE SEPARADAS) E SSF (FERMENTAÇÃO E HIDRÓLISE SIMULTÂNEAS) DE BAGAÇO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.)

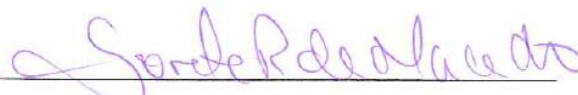
Tese de doutorado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Aprovada em 14 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA




Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará-UFC



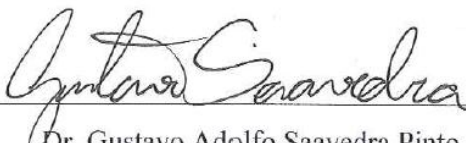
Prof. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN



Dr. Renato Carrhá Leitão
Embrapa Agroindústria Tropical



Prof. Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará-UFC



Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto
Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido saúde e disposição para os estudos.

À minha família, pelo apoio moral, compreensão, atenção e incentivo na minha formação pessoal e profissional.

Às instituições de ensino, pesquisa e formação de recursos humanos, Universidade Federal do Ceará, Embrapa Agroindústria Tropical e Programa de Recursos Humanos da ANP – PRH 31, pelo suporte intelectual, técnico, financeiro e por fornecer uma infraestrutura física que permitisse o desenvolvimento desta tese.

À Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela oportunidade, paciência e dedicação em fazer de sua experiência profissional e pessoal parte do meu crescimento, por sua confiança no meu trabalho ao longo de quase 10 anos de GPBio. Agradeço muito pelo incentivo para eu aceitar a convocação da Embrapa e por acreditar que seria capaz de conciliar as duas responsabilidades e concluir o doutorado.

À Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha, minha madrinha da pesquisa, quem esteve comigo na graduação, mestrado e doutorado, a que devo muito do meu conhecimento acadêmico e obrigada de coração pelas orientações, sugestões para o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, chefe de P&D da Embrapa Agroindústria Tropical, que sempre contribui com sua experiência para minha formação profissional e pessoal, obrigada pelas participações nas bancas de qualificação e defesa desta tese.

À Dra. Ana Irayde Santa Brígida, Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo, Profa. Dra. Sueli Rodrigues e Dr. Renato Carráh Leitão por aceitarem o convite em participarem da banca de qualificação e defesa desta tese para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Diego pela atenção, paciência, compreensão, e por toda ajuda dada para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do GPBio, pelas palavras de apoio, compreensão e toda ajuda oferecida para a realização dos experimentos. Em especial, obrigada Winnie, que sempre esteve disposta as noites e aos sábados para me ajudar na realização dos experimentos deste estudo. Obrigada também à Ariosvana pela amizade e companhia no laboratório às noites e sábados para realização dos experimentos. Obrigada Cristiane pela grande amizade e pelo apoio. Obrigada aos meus amigos Álvaro, Jocélia, Bete, Fátima e todos os membros do GPBio.

Aos amigos do Laboratório LEB (Laboratório de Bioengenharia – UFRN) da UFRN, pelo apoio e parceria no desenvolvimento deste o projeto que se estende desde o mestrado. Em especial, obrigada ao Alexandre Guilherme, pela amizade, troca de idéias para o desenvolvimento desta tese e pela realização das análises de MEV.

As minhas amigas da Embrapa, Myrella, Natália, Lilian, Ídila pela amizade e apoio. E a todos os amigos do Laboratório de Bioprocessos da Embrapa Agroindústria Tropical, em especial a Leise e Genilton pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos colegas e amigos do LMQPN, Paulo, Kirley, Edy, Camila, Noberto, Carol, Náyra, Patrícia, Adriana, Isabel, Jeferson, Karine, Marcelo, Ana Maria, Ana Cristina, e aos outros integrantes pela motivação para a conclusão do doutorado. Uma homenagem póstuma ao colega Flávio, pelo reconhecimento e valorização do meu trabalho no LMQPN.

RESUMO

Nesse trabalho, estudou-se a produção de etanol de bagaço de caju após pré-tratamento ácido seguido de álcali (CAB-OH) através dos processos de Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF) e Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF). No processo SHF, o hidrolisado obtido da hidrólise enzimática de CAB-OH foi submetido à etapa de fermentação com diferentes linhagens de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* CCA008, *Saccharomyces* sp. 1238, *S. cerevisiae* 01, *S. cerevisiae* 02), *Kluyveromyces* (*K. marxianus* CCA510, CE025 e ATCC36907) e *Hanseniaspora* sp. GPBio03. A fermentação do hidrolisado foi conduzida a 30 °C com concentração inicial de glicose de 50 g.L⁻¹. Após o *screening* de leveduras, a linhagem de *K. marxianus* ATCC36907 destacou-se com maior concentração de etanol de 20 g.L⁻¹ com consumo de toda glicose no hidrolisado. Resultados similares foram obtidos com *Saccharomyces* sp. 1238 e com a levedura isolada do caju (*Hanseniaspora* sp. GPBio03) com maiores concentrações de etanol de 22,41 g.L⁻¹ e 24,54 g.L⁻¹, respectivamente. Com o propósito de estudos posteriores de SSF, avaliou-se a influência da temperatura da levedura termotolerante *K. marxianus* ATCC36907 em glicose PA e hidrolisado enzimático de CAB-OH. Os resultados mostraram que para a glicose PA, a variação da temperatura (30, 35, 40, 45 e 50 °C) não influenciou nos valores de conversão de glicose em etanol ($Y_{E/G}$) obtendo-se valores na faixa de 0,45-0,46 g_{etanol}/g_{glicose}. Por outro lado, os resultados de $Y_{E/G}$ em hidrolisado enzimático foram ligeiramente influenciados pela temperatura, obtendo-se 0,39 g_{etanol}/g_{glicose} a 30°C e 0,43 g_{etanol}/g_{glicose} a 40 °C. Em seguida, realizou-se a SSF de CAB-OH com *K. marxianus* ATCC36907 a 40 °C e celulasas de Celluclast 1.5L a 15 FPU/g_{celulose}. A maior concentração de etanol (24,90 ± 0,89 g.L⁻¹) foi obtida em 76h de fermentação com produtividade de 0,33 g.L⁻¹.h⁻¹, conversão de glicose em etanol ($Y'_{E/G}$) de 0,34 e eficiência de produção de etanol de 66,3%. Contudo, visando aumentar a produção de etanol em estudos posteriores de SSF, realizou-se o estudo de hidrólise enzimática com outros complexos de celulasas (NS 22074) e celobiasas (NS 50010). Os resultados de hidrólise enzimática mostraram que a atividade de celulasas NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose} sem suplementação de celobiase resultou no rendimento de glicose de 93,77 ± 2,72% sendo resultado promissor para estudos de SSF com esse complexo enzimático. Nos ensaios de SSF com celulasas do complexo NS 22074, inicialmente realizou-se o estudo da temperatura (40, 42, 45 e 50 °C) com *K. marxianus* ATCC36907 utilizando celulose microcristalina; e, em contrapartida com os resultados SHF, na temperatura de 40 °C foi obtida a maior concentração de etanol de 19,86 ± 0,32 g.L⁻¹, em 72h de fermentação. Diante desses resultados, realizou-se o processo de SSF de CAB-OH nas seguintes condições: 40 °C de temperatura e 30 FPU/g_{celulose} do complexo de celulasas NS 22074. A maior concentração de etanol (37,35 ± 0,64 g.L⁻¹) foi obtida em 80h de fermentação, com produtividade de 0,46 g.L⁻¹.h⁻¹. Diante desses resultados, observa-se que a mudança do complexo enzimático de Celluclast 1.5L para NS 22074 proporcionou o aumento no valor de $Y'_{E/G}$ de 0,34 g_{etanol}/g_{glicose} para 0,49 g_{etanol}/g_{glicose} e no rendimento de etanol de 66,3% para 95,59%, o que torna o bagaço de caju pré-tratado promissor como matéria-prima para produção de etanol de segunda geração por processo SSF utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC36907.

Palavras chave: Bagaço de caju, Etanol, Fermentação e Hidrólise Separadas, Fermentação e Hidrólise Simultâneas, *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907.

ABSTRACT

In this work, the ethanol production from cashew bagasse was studied after acid followed by alkali pretreatment (CAB-OH) using the Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) processes. In SHF process, the hydrolysate obtained from enzymatic hydrolysis of CAB-OH was used as carbon source for fermentation with different strains of *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* CCA008, *S. cerevisiae* 01, *S. cerevisiae* 02 and *Saccharomyces* sp. 1238), *Kluyveromyces* (*K. marxianus* CCA510, CE025 and ATCC36907) and *Hanseniaspora* sp. GPBio03. The bioprocess was conducted at 30 °C and 50 g.L⁻¹ initial glucose concentration. The *K. marxianus* ATCC36907 achieved ethanol concentration of 20 g.L⁻¹ with consumption of all glucose in the hydrolysate. Similar results were obtained with *Saccharomyces* strains and higher ethanol concentration (23.43 g.L⁻¹) was obtained by *Saccharomyces* sp. 1238. The maximum ethanol concentration of 24.54 g.L⁻¹ was achieved by *Hanseniaspora* sp. GPBio03. Focused on further studies using SSF process, it was evaluated the temperature influence of thermotolerant yeast *K. marxianus* ATCC36907 in glucose and enzymatic hydrolysate from CAB-OH. The results showed that the temperature (30, 35, 40, 45 and 50 °C) did not affect the values of $Y'_{E/G}$ (0.45 to 0.46 g_{ethanol}/g_{glucose}) using glucose as substrate. Moreover, the ethanol yields obtained with enzymatic hydrolysate were slightly influenced by temperature, 0.39 and 0.43 g_{ethanol}/g_{glucose} were obtained at 30 and 40 °C, respectively. Based on this, the SSF of CAB-OH and *K. marxianus* ATCC36907 was conducted at 40 °C with cellulases from Celluclast 1.5L at 15 FPU/g_{cellulose}. The highest ethanol concentration (24.90 ± 0.89 g.L⁻¹) was obtained with 76h of fermentation with 0.33 g.L⁻¹.h⁻¹, 0.34 g_{ethanol}/g_{glucose} and 66.3% of productivity, $Y'_{E/G}$ and of ethanol efficiency, respectively. In enzymatic hydrolysis studies, the cellulase NS 22074 at 30 FPU/g_{cellulose} without cellobiases supplementation resulted in glucose yield of 93.77 ± 2.72% which is promising for studies of SSF with this enzyme complex. The temperature (40, 42, 45 and 50 °C) influence in SSF process using microcrystalline cellulose, in contrast with SHF results, higher ethanol concentration, 19.86 ± 0.32 g.L⁻¹, was obtained at 40 °C. The SSF using CAB-OH, 30 FPU/g_{cellulose} cellulases NS 22074 at 40 °C showed higher ethanol concentration of 37.35 ± 0.64 g.L⁻¹ at 80h, with productivity of 0.46 g.L⁻¹.h⁻¹. In this condition, there was an increase of $Y'_{E/G}$ from 0.34 to 0.49 g_{ethanol}/g_{glucose} and the ethanol efficiency from 66.3% to 95.59% when compared to results obtained with SSF using Celluclast 1.5L. Based on the results of efficiency and ethanol yield ($Y'_{E/G}$), the cashew apple bagasse showed as lignocelulose feedstock promising material for second generation ethanol production by SSF process using the yeast *K. marxianus* ATCC36907 and NS 22074 cellulases complex.

Keywords: Cashew apple bagasse, Ethanol, Separate Hydrolysis and Fermentation, Simultaneous Saccharification and Fermentation, *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907.

NOMENCLATURA

CAB	<i>Cashew apple bagasse</i>
CAB-H	<i>Cashew apple bagasse</i> pré-tratado com H_2SO_4
CAB-OH	<i>Cashew apple bagasse</i> pré-tratado com NaOH
SHF	<i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i>
SSF	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>
FPU/mL	Atividade enzimática expressa em unidades de papel de filtro por mL de enzima
U_{CMC}/mL	Atividade enzimática expressa em unidades de carboximetilcelulase por mL de enzima
UCB/mL	Atividade enzimática expressa em unidades de celobiose por mL de enzima
Q_{EtOH}	Produtividade de etanol
Y_{E/G}	Fator de conversão de substrato (glicose) em produto (etanol)
η	Eficiência da produção de etanol do processo fermentativo
Y'_{E/G}	Fator de conversão de substrato (glicose) em produto (etanol) para processos SSF
η'	Eficiência da produção de etanol do processo fermentativo para processos SSF
μ_X	Velocidades específica de crescimento microbiano
μ_S	Velocidades específica de consumo de glicose
μ_P	Velocidades específica de produção de etanol

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Os cenários de produção e consumo do biocombustível etanol.....	4
2.2 O Caju (<i>Anacardium occidentale L.</i>).....	5
2.3 A estrutura da biomassa lignocelulósica.....	8
2.3.1 Celulose.....	9
2.3.2 Hemicelulose.....	9
2.3.3 Lignina.....	10
2.4 Produção de etanol de lignocelulósicos.....	10
2.4.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	11
2.4.1.1 Pré-tratamento ácido.....	11
2.4.1.2 Pré-tratamento alcalino.....	12
2.4.2 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.....	13
2.2.1 Enzimas.....	14
2.4.2.2 Principais parâmetros que afetam a hidrólise enzimática.....	15
2.4.3 Estratégias para produção de etanol de biomassa lignocelulósica.....	17
2.5 Potencial de <i>Kluyveromyces marxianus</i> na produção de etanol.....	21
2.6 Produção de etanol de segunda geração de bagaço de caju.....	24
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Material.....	27
3.1.1 Matéria-prima.....	27
3.1.2 Enzimas.....	27
3.1.3 Micro-organismos.....	28
3.1.4 Meios de Cultura.....	29
3.1.4.1 Meios de manutenção e propagação do inóculo.....	29
3.2 Métodos.....	30
3.2.1 Pré-tratamento.....	30
3.2.1.1 Preparação da matéria-prima.....	30

3.2.1.2 Caracterização da matéria-prima.....	30
3.2.1.3 Pré-tratamento com H ₂ SO ₄ em autoclave.....	32
3.2.1.4 Pré-tratamento com NaOH em autoclave.....	32
3.2.2 Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF).....	33
3.2.2.1 Hidrólise enzimática.....	33
3.2.2.1.1 Determinação da concentração de proteínas nos complexos enzimáticos.....	33
3.2.2.1.2 Determinação da atividade enzimática nos complexos enzimáticos.....	33
a) Atividade de celulase nos complexos de celulasas NS 22074 e Celluclast 1.5L.....	33
b) Atividade de CMCase nos complexos de celulasas NS 22074 e Celluclast 1.5L.....	34
c) Atividade de celobiase no complexo de celobiasas NS 50010.....	34
3.2.2.1.3 Hidrólise enzimática de CAB-OH.....	35
a) Estudo da hidrólise enzimática de diferentes complexos enzimáticos.....	35
b) Hidrólise enzimática de CAB-OH utilizando Celluclast 1.5L com vistas a fermentação do hidrolisado.....	36
3.2.2.2 Fermentação do hidrolisado obtido da hidrólise enzimática de CAB-OH com Celluclast 1.5L.....	37
3.2.2.3 Fermentação utilizando glicose PA.....	37
3.2.3 Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF).....	38
3.2.4 Métodos Analíticos.....	39
3.2.4.1 Concentração de biomassa.....	39
3.2.4.2 Determinação da concentração de açúcares, etanol e inibidores.....	40
3.2.5 Determinação do rendimento e parâmetros cinéticos no processo fermentativo.....	40
4. Resultados e Discussão.....	42
4.1 Caracterização do bagaço de caju.....	42
4.2 Influência do pré-tratamento na estrutura do material (MEV)	45
4.3 Hidrólise enzimática do bagaço de caju com celulasas do complexo Celluclast 1.5L.....	46
4.4 Fermentação do hidrolisado enzimático de CAB-OH (<i>Screening</i> de leveduras produtoras de etanol).....	48
4.5 Influência da temperatura na produção de etanol de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 em glicose PA e hidrolisado enzimático de bagaço de caju.....	55
4.6 Produção de etanol de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC36907 por Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) a 40 °C utilizando Celluclast 1.5L e CAB-OH como	

substrato.....	65
4.7 Estudo da hidrólise enzimática de CAB-OH com diferentes complexos enzimáticos com vistas ao aumento da produção de etanol de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC36907.....	67
4.8 Influência da temperatura na produção de etanol de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC36907 por Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) utilizando celulase Novozymes NS 22074 e celulose microcristalina comercial.....	73
4.9 Produção de etanol de <i>K. marxinaus</i> ATCC36907 por Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) a 40 °C utilizando celulasas de Novozymes NS22074 e celulose de CAB-OH.....	75
5. Conclusões.....	79
6. Referências Bibliográficas.....	80
7. Anexos.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.).....	6
Figura 2.2 - Cajueiro.....	6
Figura 2.3 - Bagaço de caju <i>in natura</i>	7
Figura 2.4 - Organização geral da estrutura dos lignocelulósicos.....	8
Figura 2.5 - Estrutura da celulose.....	9
Figura 2.6 - Diagrama de blocos do processo de Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF).....	17
Figura 2.7 - Diagrama de blocos do processo de Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF).....	18
Figura 2.8 - Diagrama de blocos do processo de Hidrólise e Co-Fermentação Simultâneas (SSCF).....	18
Figura 2.9 - Diagrama de blocos do Bioprocesso Consolidado (BPC).....	20
Figura 2.10 – Rota metabólica de fermentação alcoólica em leveduras.....	22
Figura 4.1 - Análise de CAB (A/B), CAB-H (C/D) e CAB-OH (E/F) por MEV (Microscopia eletrônica por varredura) na ampliação de 500x (A,C e E) e 1000x (B, D e F).....	45
Figura 4.2 - Hidrólise enzimática de CAB-OH (celulose a 1% v/v) com Celluclast 1.5L (60 FPU/gcelulose) a 45 °C e 150 rpm. (A) Concentrações de glicose (●), celobiose (■) e xilose (▲). (B) Digestibilidade de celulose (●) e hemicelulose (▲) de CAB-OH. Digestibilidade de celulose de CAB <i>in natura</i> (▼) e CAB-H (◆).....	47
Figura 4.3 - Produção de etanol de diferentes espécies de <i>Kluyveromyces marxianus</i> . Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm. <i>K. marxianus</i> CE025 (■), ATCC36907 (●) e CCA510 (▲). Concentrações de (A) glicose e (B) etanol.....	50
Figura 4.4 - Produção de etanol de diferentes espécies de <i>Saccharomyces</i> . Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm. <i>S. cerevisiae</i> CCA008 (■), <i>S. cerevisiae</i> 01 (▲), <i>S. cerevisiae</i> 02 (▼) e <i>Saccharomyces</i> sp. 1238 (●). Concentrações de (A) glicose e (B) etanol.....	51
Figura 4.5 - Concentrações de glicose (■) e etanol (●) de <i>Hanseniaspora</i> sp. GPBio03 durante fermentação em hidrolisado enzimático de CAB-OH. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm.....	52

Figura 4.6 - Produção de biomassa, consumo de glicose (A) e produção de etanol (B) durante fermentação do hidrolisado enzimático de CAB-OH a 30 °C e 150 rpm. <i>K. marxianus</i> ATCC36907 (■), <i>Saccharomyces</i> sp. 1238 (●) e <i>Hanseniaspora</i> sp. GPBio03 (▲).....	54
Figura 4.7 - Produção de biomassa (A) e consumo de glicose (B) do estudo da influência da temperatura na produção de etanol de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 a 150 rpm utilizando glicose PA. 30 °C (■), 35 °C (●), 40 °C (◆), 45 °C (▲) e 50 °C (▼).....	56
Figura 4.8 - Produção de etanol do estudo da influência da temperatura no crescimento de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 a 150 rpm em meio com glicose PA. 30 °C (■), 35 °C (●), 40 °C (◆), 45 °C (▲) e 50 °C (▼).....	58
Figura 4.9 - Velocidades específicas para a produção de biomassa (A), consumo de glicose (B) e formação de etanol (C) no estudo da influência da temperatura na produção de etanol de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 em glicose PA. 30 °C (■), 35 °C (●), 40 °C (◆), 45 °C (▲) e 50 °C (▼).....	60
Figura 4.10 - Perfis de biomassa e glicose (A), concentração e produtividade de etanol (B) de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 em hidrolisado enzimático de CAB-OH a 150 rpm. Em (A), Biomassa a 30 °C (■) 40 °C (◆) e 50 °C (●) e Glicose a 30 °C (□), 40 °C (○) e 50 °C (◇). Em (B), Concentração de etanol a 30 °C (■), 40 °C (◆) e 50 °C (●) e produtividade a 30 °C (□), 40 °C (○) e 50 °C (◇).....	62
Figura 4.11 - Velocidades específicas para a produção de biomassa, etanol e consumo de glicose de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 em hidrolisado enzimático de bagaço de caju a 150 rpm e 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C). μ_X (■) μ_S (●) e μ_P (▲) em h^{-1}	64
Figura 4.12 - Produção de etanol de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 por SSF de CAB-OH com Celluclast 1.5L a 15 FPU/g _{celulose} ; 7,5% (m/v) de celulose (10% m/v de CAB-OH), a 40 °C e 150 rpm. Etanol (■), glicose (▼), celobiose (▲) e xilose (●).....	65
Figura 4.13 - Digestibilidade de glicose e xilose após a hidrólise enzimática de CAB-OH (1% m/v de celulose) com celulases de Celluclast 1.5L e NS 22074 a 60FPU/g _{celulose} a 45 °C e 150 rpm. Digestibilidade de celulose (●) e hemicelulose (▲) após hidrólise com o complexo Celluclast 1.5L. Digestibilidade de celulose (○) e hemicelulose (▲) após o uso do complexo de celulases NS 22074.....	68
Figura 4.14 - Digestibilidade de celulose de CAB-OH após a variação da atividade de celulase NS 22074 com suplementação de 60 UCB/g de celobiase NS 50010. Digestibilidade em 24h (■), 48h (●) e 72h (▲). Hidrólise enzimática realizada a 45 °C	

e 150rpm.....	69
Figura 4.15 – Digestibilidade de hemicelulose de CAB-OH da variação da atividade de celulase NS 22074 com suplementação de 60 UCB/g de celobiase NS 50010. Rendimentos de xilose após 24h (■), 48h (●) e 72h (▲). Hidrólise enzimática realizada a 45 °C e 150rpm.....	71
Figura 4.16 - Digestibilidade de celulose de CAB-OH da variação da atividade de celobiase NS 50010 e celulase NS 22074 a 30 FPU/g _{celulose} . Digestibilidade sem adição de de celobiase (controle) (■), 10 UCB/g (●), 30 UCB/g (▲), 60 UCB/g (▼), 100 UCB/g (◆). Hidrólise realizada a 45 °C e 150rpm.....	72
Figura 4.17 - Concentrações de glicose (A) e etanol (B) da variação da temperatura de fermentação de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 em processo SSF utilizando celulose microcristalina como substrato. Fermentação conduzida a 10% (m/v) de celulose microcristalina, celulasas de NS22074 a 15 FPU/g _{celulose} e 150 rpm. 50 °C (■), 45 °C (●), 42 °C (▼) e 40 °C (▲).....	74
Figura 4.18 - Produção de etanol de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 por SSF de CAB-OH com celulase NS 22074 a 30 FPU/g _{celulose} ; 7,5% (m/v) de celulose de CAB-OH, a 40 °C e 150 rpm. Glicose (▼), celobiose (■), xilose (●) e etanol (▲).....	76
Figura 4.19 – Balanço de massa da produção de etanol de segunda geração de bagaço de caju por processos SHF e SSF utilizando células <i>K. marxianus</i> ATCC36907.....	77
Figura A.1 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju <i>in natura</i> (CAB) (3700-800 cm ⁻¹)....	91
Figura A.2 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju <i>in natura</i> (CAB) (1900-900 cm ⁻¹)....	91
Figura A.3 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju após pré-tratamento ácido (CAB-H) (3700-800 cm ⁻¹).....	92
Figura A.4 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju após pré-tratamento ácido (CAB-H) (2000-800 cm ⁻¹).....	92
Figura A.5 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju após pré-tratamento ácido seguido de alcalino (CAB-OH) (3700-800 cm ⁻¹).....	93
Figura A.6 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju após pré-tratamento ácido seguido de alcalino (CAB-OH) (2000-800 cm ⁻¹).....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Procedência das culturas de leveduras utilizadas neste estudo.....	28
Tabela 3.2 - Composição do meio ágar YEPD para propagação de células das leveduras estudadas.....	29
Tabela 4.1 - Análise composicional em base seca do bagaço de caju <i>in natura</i> e após diferentes pré-tratamentos.....	43
Tabela 4.2 – Produtividade, rendimento e eficiência de produção de etanol da fermentação do hidrolisado enzimático por diferentes leveduras. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm.....	53
Tabela 4.3 - Produtividade, eficiência e conversão de glicose em etanol após fermentação do hidrolisado enzimático com as leveduras <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC36907, e <i>Saccharomyces</i> sp. 1238 e <i>Hanseniaspora</i> sp. GPBio03. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm.....	55
Tabela 4.4 - Produtividade, eficiência e conversão de glicose em etanol no estudo da influência da temperatura na produção de etanol de <i>K. marxianus</i> ATCC36907 a 150 rpm.....	58
Tabela 4.5 - Caracterização dos complexos enzimáticos utilizados nesse trabalho para a hidrólise enzimática de CAB-OH.....	67

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, ao longo das últimas décadas, a agroindústria do caju vivenciou um rápido crescimento nos seus indicadores quantitativos, passando a ocupar uma área de 700 mil hectares com a cultura, com capacidade instalada da indústria processadora de castanha de 280 mil toneladas/ano. Segundo dados da FAOSTAT (2013), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o Brasil é o quinto maior produtor mundial de castanha de caju com a produção de mais de 230 mil toneladas em 2011. Por outro lado, o processamento industrial de pedúnculo para a produção de bebidas resulta em torno de 15% (m/m) de bagaço, que representa nenhum valor comercial, sendo uma das principais fontes de resíduos do agronegócio local. Esses fatores agregam potencial para a utilização do bagaço de caju como matéria-prima alternativa e de baixo custo (<R\$ 0,25/Kg) para a produção de etanol de segunda geração (FERREIRA *et al.*, 2004; MATIAS *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Em geral, os lignocelulósicos são considerados materiais fibrosos, que formam matrizes complexas constituídas de celulose, hemiceluloses e pectinas. Adicionalmente, essa matriz é impregnada com lignina, cuja função é de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência. Esses materiais representam a fonte de biomassa mais abundante e de baixo custo do mundo, portanto, o seu uso possibilita a utilização de uma vasta gama de resíduos de atividades domésticas, agrícolas e industriais para a produção de um biocombustível renovável (ALZATE; TORO, 2006; HU; WEN, 2008; MORENO *et al.*, 2013; HAQUE *et al.*, 2013).

A tecnologia de conversão de biomassa lignocelulósica em carboidratos para posterior produção de etanol vem sendo considerada como uma das alternativas mais promissoras em substituição aos combustíveis convencionais derivados do petróleo (ZHU *et al.*, 2006; ALZATE; TORO, 2006; ALVIRA *et al.*, 2010; HASUNUMA; KONDO, 2012).

Para a produção do biocombustível desses materiais, em geral, o processo baseia-se na etapa inicial de pré-tratamento para aumentar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas durante a hidrólise enzimática. Em seguida, os monossacarídeos provenientes da celulose são convertidos em etanol por micro-organismos etanologênicos (LIN *et al.*, 2013). A literatura mostra uma diversidade de pré-tratamentos avaliados na remoção de açúcares de

lignocelulósicos: pré-tratamento com ácidos, álcalis, fluidos supercríticos, organosolv, explosão a vapor, auto-hidrólise, micro-ondas entre outros (ALVIRA *et al.*, 2010; GÍRIO *et al.*, 2010). Na etapa de fermentação, o processo pode ser conduzido em sequência, conhecido por Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF) ou em uma única etapa, Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF). Contudo, no processo simultâneo, a temperatura ótima para a sacarificação é mais elevada do que pode ser tolerada pela maioria das leveduras produtoras de etanol, fato que poderia ser otimizado através do uso de leveduras termotolerantes (LIN *et al.*, 2013).

A produção de etanol em temperaturas elevadas tem recebido merecido destaque devido ao potencial de leveduras termotolerantes, que podem produzir grandes quantidades de etanol em temperaturas favoráveis a hidrólise enzimática, tornando viável o processo de Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) (HASUNUMA; KONDO, 2012). Além disso, o processo simultâneo (SSF) possibilita a redução da inibição enzimática pela presença de glicose em virtude da sua conversão em etanol, além da produção contínua do biocombustível e redução dos riscos de contaminação (LIMTONG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012; MORENO *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013).

Atualmente, a produção industrial de etanol por fermentação emprega o uso da levedura *S. cerevisiae* em temperaturas de até 35 °C. *Kluyveromyces marxianus* é considerada uma levedura promissora sendo termotolerante em temperaturas de até 52 °C (LIMTONG *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2013). Nesse sentido, o desafio para produção de etanol por SSF é conciliar as condições favoráveis da hidrólise enzimática com as da fermentação mantendo a eficiência da produção do biocombustível.

Nesse trabalho, o potencial do bagaço de caju como matéria prima lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração foi avaliado pelos processos de Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF) e Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF). Para alcançar esse objetivo, os diferentes parâmetros da hidrólise enzimática e fermentação foram avaliados através das etapas que se encontram discriminadas a seguir:

- *Screening* de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Hanseniaspora* para avaliação do potencial na produção do etanol em hidrolisado enzimático de bagaço de caju após pré-tratamento;

- Avaliação da influência da temperatura na produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 por processo SHF em glicose PA e hidrolisado enzimático de bagaço de caju após pré-tratamento;
- Variação da atividade enzimática inicial de diferentes complexos enzimáticos (NS 22074 e NS 50010) da Novozymes na hidrólise enzimática de bagaço de caju pré-tratado;
- Estudo da influência da temperatura na produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 por processo SSF utilizando celulose microcristalina;
- Produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 por processo SSF utilizando bagaço de caju pré-tratado;
- Comparação da produção de etanol dos processos SHF e SSF de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 utilizando bagaço de caju pré-tratado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os cenários de produção e consumo do biocombustível etanol

O etanol, também denominado álcool etílico (C_2H_5OH) foi inserido na matriz energética brasileira no início do século XX face a necessidade de amenizar as sucessivas crises no setor açucareiro e na tentativa de reduzir a dependência do petróleo importado. Em 1933, o governo de Getúlio Vargas criou o Instituto do Açúcar e do Alcool – IAA tornando também obrigatória à mistura de etanol na gasolina (AGEITEC, 2013).

Na década de 1970, o Brasil implementou o programa “Proálcool” de substituição em larga escala dos combustíveis veiculares derivados de petróleo por álcool. Neste programa, a cana de açúcar foi escolhida como a matéria-prima para a produção de etanol, o que levou o país a uma posição de destaque em termos de avanços tecnológicos e segurança energética (SOCCOL *et al.*, 2010).

No mercado mundial de combustíveis, o etanol propicia uma oportunidade para a inserção da produção brasileira, haja vista a competitividade da indústria nacional. Em 2012, foram produzidos 23,5 bilhões de litros de etanol (volume 2,8% superior a 2011), sendo 9,7 bilhões de anidro e 13,9 de hidratado (EPE, 2013).

Em 2012, as exportações brasileiras de etanol totalizaram 3,1 bilhões de litros, sendo 2,0 bilhões para os EUA. O comércio de etanol entre Brasil e UE não tem sido expressivo, assim como no mercado asiático. Em 2012, o Brasil exportou 96 milhões de litros de etanol para a União Europeia, 18 milhões a menos do que em 2011. No Brasil, a principal via de exportação de etanol é a portuária, que representou 99,7% dos volumes exportados em 2012. Nos últimos anos, os maiores importadores de etanol produzido no Brasil foram Estados Unidos com aproximadamente 67% do volume total, e países da América Central (15%) e da Ásia (11%) (EPE, 2013).

Em relação às projeções de demanda por etanol, a OIA (Organização Internacional do Açúcar) prevê que a demanda dobrará até 2020. A entidade projeta que o consumo mundial dobrará até 167 bilhões de litros em 2020. Por mercados, a OIA espera demanda de 88 bilhões de litros nos EUA, 35 bilhões de litros no Brasil, 12 bilhões de litros

na União Europeia, 8 bilhões de litros na China e 24 bilhões de litros em outros mercados (BRASILAGRO, 2013a).

Diante dessa demanda, uma alternativa seria o aumento na produção de etanol com o uso de tecnologias para converter a celulose dos lignocelulósicos em etanol de segunda geração, especialmente os resíduos agroindustriais (HASUNUMA e KONDO, 2012; HAQUE *et al.*, 2013). No caso da cana-de-açúcar, as folhas, palhas e o bagaço representam dois terços da biomassa, sendo somente um terço utilizado para produção do biocombustível (SOCCOL *et al.*, 2010). Em relação ao bagaço de caju, a utilização do rejeito da agroindústria do caju para produção de etanol de segunda geração tem sido abordada em diferentes estudos, em que os autores avaliaram diferentes parâmetros que envolvem as etapas de pré-tratamento (alcalino, ácido de álcali e micro-ondas), hidrólise enzimática e fermentação para produção do biocombustível (ROCHA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010; CORREIA *et al.*, 2013).

Contudo, a produção de etanol celulósico começa a deixar a fase de experimentos e vai ganhar escala comercial no Brasil. Três usinas para processamento de etanol celulósico devem entrar em operação no país entre 2014 e 2015. Juntas, vão produzir 160 milhões de litros por ano de etanol e demandar investimentos de cerca de R\$ 800 milhões. O desafio desses projetos será replicar em larga escala os custos competitivos, em tese, já alcançados nas escalas experimentais. Para chegar ao valor almejado, será instalada uma planta em Alagoas ao lado de usinas de etanol de primeira geração (BRASILAGRO, 2013b).

2.2 O Caju (*Anacardium occidentale* L.)

O caju (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família botânica Anacardiaceae e ao gênero *Anacardium* (Figura 2.1). É considerado muitas vezes como o fruto do cajueiro, embora seja um pseudofruto ou pedúnculo. É constituído pela castanha que é a fruta propriamente dita, e o pedúnculo floral que apresenta aspecto piriforme (em forma de pêra), sendo comumente comercializado nas cores amarelo e vermelho (RODRIGUES *et al.*, 2007).



Figura 2.1 - Caju (*Anacardium occidentale* L.) (Fonte: <http://www.agrosoft.org.br/agropag/210201.htm>).

O cajueiro (Figura 2.2) é originário do Brasil, tendo como centro de dispersão o litoral nordestino, mas também sendo encontrado na América Central, África e Ásia (principalmente na Índia e Vietnã). Na África, espalhou-se no final do século XVI para outros países, como Moçambique, Índia, Angola e Quênia. A área ocupada com essa plantação no País é estimada em 700.000 ha, dos quais mais de 90% encontra-se na região Nordeste (ASSUNÇÃO e MERCADANTE, 2003; LEITÃO, 2011).



Figura 2.2 - Cajueiro (Fonte: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fi8wxjm202wyiv80z4s4730ed235b.html>).

A cajucultura nacional representa uma atividade de expressiva importância socioeconômica, considerando que a indústria de beneficiamento de castanha de caju, com uma capacidade de processar 280 mil toneladas/ano, são responsáveis pelo emprego de 37.500 pessoas no meio rural e 15.000 empregos nas indústrias de beneficiamento de castanha. Esses números são mais expressivos ainda quando se considera o incremento do

beneficiamento da castanha em minifábricas e nas indústrias de sucos, doces e derivados no agronegócio caju (MONTENEGRO *et al.*, 2007).

Segundo dados estatísticos de FAOSTAT (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), em 2011 o Brasil foi o quinto maior produtor de castanha de caju com a produção de mais de 230 mil toneladas. Essa produção foi a maior do país entre 2007-2011. O país ficou depois dos países Vietnam, líder mundial com produção de mais de 1 milhão de toneladas seguido da Nigéria, Índia e Costa do marfim.

Por outro lado, a produção de pedúnculos de caju no Brasil é estimada em torno de 1,8 milhão de toneladas por ano. No entanto, o aproveitamento desse pedúnculo que representa cerca de 90% do fruto, é de apenas 10-15% do total. Uma das razões para o baixo aproveitamento do pedúnculo do caju é sua rápida deterioração. Considerando o processamento industrial do pedúnculo do caju, em torno de 15% (m/m) de bagaço são gerados, representado em torno de 40.500 toneladas de resíduo por ano (ASSUNÇÃO e MERCADANTE, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2011; LEITÃO, 2011).

De acordo com MATIAS *et al.* (2005), o bagaço de caju (Figura 2.3) desidratado é constituído de açúcares totais (16,86 mg/100g) dos quais 13,32 mg/100g são açúcares redutores, proteínas (3,25%), fibras (41,53%) e lipídios (1,3%), o que o torna uma matéria-prima em potencial para diversas aplicações além do aproveitamento de um rejeito.



Figura 2.3 – Bagaço de caju *in natura*.

Vários são os estudos na literatura para o aproveitamento do bagaço de caju. Estes incluem a obtenção de produtos de alto valor agregado, biocombustíveis e alimentos, o que

diversifica e amplia as oportunidades do uso do rejeito. Destacam-se a produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido (RODRIGUES *et al.*, 2007 e 2008), extração de carotenóides e flavonóides (BARBOSA, 2010), produção de hambúrguer de caju (LIMA, 2007) e produção de bioetanol (PINHEIRO *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009; 2011; RODRIGUES *et al.*, 2010) e biogás (LEITÃO, 2011).

2.3 A estrutura da biomassa lignocelulósica

Em geral, os lignocelulósicos são constituídos majoritariamente de polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) e de lignina (Figura 2.4). Pectina, extraíveis, proteínas e minerais compreendem uma pequena proporção em um arranjo complexo que os tornam recalcitrantes à hidrólise. As cadeias de celulose e hemicelulose correspondem a dois terços dos lignocelulósicos sendo os substratos para produção de etanol de segunda geração (GÍRIO *et al.*, 2010). Os lignocelulósicos, alvo dos estudos para produção do etanol, em geral constituem os resíduos agrícolas, como palha de milho, bagaço de cana, madeira, grama, os resíduos urbanos orgânicos além dos resíduos das atividades agroindustriais (GOMEZ *et al.*, 2008; VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

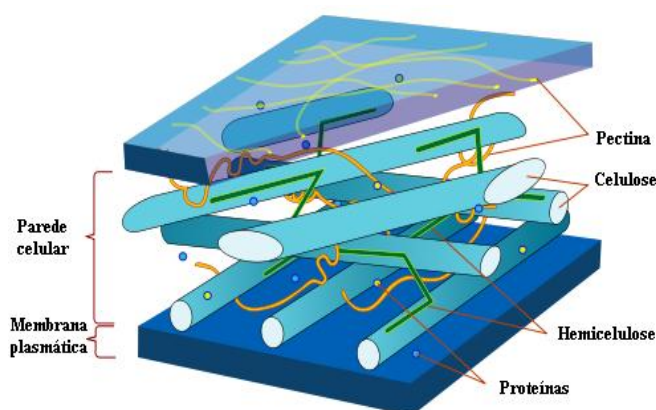


Figura 2.4 - Organização geral da estrutura dos lignocelulósicos (Fonte: www.nature.com/nrg/journal/v9/n6/full/nrg2336.html).

2.3.1 Celulose

Celulose é um homopolímero linear formado de unidades de β -D-glicose que são ligadas por interações β -1,4-glicosídicas (Figura 2.5). As cadeias de celulose nos lignocelulósicos são unidas por ligações de hidrogênio que formam microfibrilas devido a forte interação da ligação, tornando a sua natureza cristalina muito recalcitrante à degradação, sendo essa característica uma barreira para sua hidrólise. Por outro lado, algumas partes da estrutura da celulose podem ser de natureza amorfa, que é mais fácil para se degradar (VAN DYK e PLETSCHEKE, 2012).

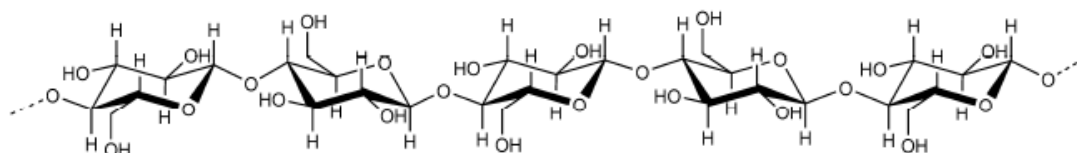


Figura 2.5 - Estrutura da celulose.

2.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são uma classe heterogênea de polímeros que representam, em geral, 15-35% da biomassa da planta e que pode conter pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -D-glicurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e os ácidos α -D-galacturônicos). Outros carboidratos, como a α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades sendo que os grupos hidroxil destes componentes podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil. Homopolímeros de xilose, também conhecidos por homoxilanas só ocorrem em algumas algas. As hemiceluloses mais relevantes são xilanas e glucomanas, sendo as xilanas mais abundante, especialmente na madeira das folhosas que são predominantes nas zonas tropicais (GÍRIO *et al.*, 2010).

2.3.3 Lignina

Em contraste com a celulose e a hemicelulose, a lignina é um polímero complexo formado de compostos fenólicos, que são também chamados de monolignóis. As ligações aleatórias carbono-carbono entre os monolignóis resultam na formação de dímeros, trímeros e tetrameros que definem a estrutura complexa da lignina. A composição da lignina varia bastante entre os lignocelulósicos, sendo seu arranjo tridimensional desconhecido. A presença de elevados níveis de lignina na parede celular dos vegetais proporciona rigidez, resistência além de uma proteção eficaz contra patógenos (GOSSELINK *et al.*, 2004; VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

2.4 Produção de etanol de lignocelulósicos

Embora o bioetanol produzido a partir do milho ou da cana-de-açúcar domine os mercados de biocombustíveis no momento, o espaço para o desenvolvimento dessas cultivares para produção de etanol tem sido limitado pela demanda de terra para o fornecimento de alimentos. Dessa forma, o uso dos lignocelulósicos provenientes das diversas atividades agroindustriais se enquadra como uma alternativa na produção de etanol (SHEN *et al.*, 2011).

Contudo, o processo para a produção de etanol a partir de lignocelulósicos é mais complexo do que a sua produção a partir da sacarose da cana ou amido do milho. A estrutura cristalina e recalcitrante da biomassa, que torna a parede celular da planta resistente à biodegradação, dificulta a sua hidrólise em açúcares monoméricos para a subsequente conversão por fermentação, o que agrega ao processo algumas etapas para a obtenção do biocombustível. De forma simplificada, a produção de etanol de lignocelulósicos compreende as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática da celulose, fermentação e purificação do etanol para atender as especificações do biocombustível (WEN *et al.*, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010).

2.4.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Para se obter um elevado rendimento global de etanol de segunda geração, o pré-tratamento é considerado, por muitos autores, uma etapa crucial para melhorar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas as cadeias de celulose da biomassa, pois a digestibilidade da celulose é dificultada por fatores físico-químicos, estruturais e composicionais (ALVIRA *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2011). Em alguns trabalhos de revisão sobre pré-tratamento, os autores destacam que a hemicelulose e lignina são os maiores obstáculos para o sucesso da etapa de hidrólise enzimática dos lignocelulósicos (SUN e CHENG, 2002; CARVALHEIRO *et al.* 2008; GÍRIO *et al.*, 2010).

2.4.1.1 Pré-tratamento ácido

O principal objetivo do pré-tratamento ácido é a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa com a finalidade de tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática. Nesse tipo de pré-tratamento, pode ser utilizado ácido concentrado ou diluído, entretanto a utilização de ácido concentrado é menos viável devido a elevada formação de compostos inibidores da fermentação (ALVIRA *et al.*, 2010). Além disso, o uso de ácido concentrado requer investimentos adicionais na fabricação e manutenção dos equipamentos em escala industrial (WYMAN *et al.*, 2005).

Contudo, o pré-tratamento com ácido diluído pode ser considerado o método mais apropriado para uso industrial por ser aplicável a uma grande variedade de lignocelulósicos (ALVIRA *et al.*, 2010). Os ácidos mais utilizados são o ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3) e ácido fosfórico (H_3PO_4).

Na literatura, existem estudos recentes com o ácido sulfúrico no pré-tratamento das frondes da palma (KRISTIANI *et al.*, 2012) e no caso do sorgo (HEREDIA-OLEA *et al.*, 2012), os autores compararam a influência dos ácido clorídrico e sulfúrico no pré-tratamento do lignocelulósico, e observaram que o H_2SO_4 permite o pré-tratamento de maiores quantidades de sólidos sem prejudicar a eficiência da hidrólise embora o tempo do processo

ainda seja o dobro em relação ao uso de HCl. KIM *et al.* (2014) avaliaram o potencial do ácido nítrico no pré-tratamento de palha de arroz com a finalidade de usar o hidrolisado para aumentar a produção de etanol. No trabalho de VASCONCELOS *et al.* (2013), os autores obtiveram elevados níveis (96-98%) de solubilização da hemicelulose do bagaço-de-cana utilizando o pré-tratamento com ácido fosfórico.

Durante o pré-tratamento com ácido diluído, as frações de celulose e lignina podem permanecer quase inalteradas na fase sólida. Dependendo das condições operacionais, na fase líquida dos hidrolisados serão constituídos por monossacarídeos (xilose, glicose e arabinose), produtos de decomposição das hemiceluloses (formação de ácido acético a partir da hidrólise de grupos acetil) e/ou o produtos de decomposição dos monossacáridos (tais como o furfural, produto da degradação das pentoses, e 5-hidroximetilfurfural, produto da degradação das hexoses) (GÁMEZ *et al.*, 2006; CARDONA *et al.*, 2010).

Alguns ácidos orgânicos como os ácidos fumárico e ácido maleico foram avaliados em comparação com o ácido sulfúrico quanto a formação de inibidores após pré-tratamento de palha de trigo. Os autores (KOOTSTRA *et al.*, 2009) destacaram que menor quantidade de furfural foi produzida após o pré-tratamento com os ácidos orgânicos além de apresentarem elevada eficiência de hidrólise.

2.4.1.2 Pré-tratamento alcalino

Um dos principais efeitos dos álcalis no pré-tratamento dos lignocelulósicos consiste na ruptura das ligações de hidrogênio intermoleculares entre as cadeias de xilanas e de outros componentes da biomassa, tais como a lignina ou outra cadeia hemicelulósica, resultando no aumento da porosidade do material. Além disso, o uso do álcali em solução geralmente promove uma expansão da parede celular do material aumentando a área acessível da matriz do lignocelulósico. Esses efeitos favorecem a ação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática (HAQUE *et al.*, 2013).

Álcalis como o hidróxido de sódio, potássio, cálcio e hidróxidos de amônio são as bases mais exploradas no pré-tratamento alcalino. A remoção da lignina reduz à presença dos sítios de adsorção irreversível das celulasas favorecendo a acessibilidade dessas enzimas a

cadeia de celulose. O hidróxido de sódio (NaOH) geralmente provoca inchaço no material com o aumento da superfície da celulose, reduzindo seu grau de polimerização e cristalinidade, favorecendo a ruptura da estrutura da lignina (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

O pré-tratamento alcalino pode ser realizado à temperatura ambiente e conduzido em tempos que variam de segundos a dias. É conhecido por causar menos degradação dos açúcares do que o pré-tratamento ácido e mostra-se mais eficaz em resíduos agroindustriais do que em madeiras (KUMAR e WYMAN, 2009). No entanto, as possíveis perdas de açúcares fermentescíveis e a produção de compostos inibidores devem ser levados em consideração na otimização das condições do pré-tratamento.

2.4.2 Hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica

Desde muito tempo a hidrólise enzimática da lignocelulose vem sendo estudada como um método para despolimerizar a biomassa para posterior conversão dos açúcares obtidos em biocombustíveis e bioquímicos. No processo de produção de etanol de segunda geração, a hidrólise enzimática consiste numa etapa intermediária cujo objetivo é a obtenção de elevados rendimentos de açúcares no hidrolisado enzimático que subsequentemente servirão de fonte de nutrientes para a conversão em etanol por micro-organismos.

A hidrólise enzimática ainda é considerada o gargalo do processo de produção de etanol de lignoceluloses em termos de tempo e investimento, uma vez que as enzimas apresentam alto valor agregado e exigem um determinado período de tempo para atuarem nas cadeias da biomassa e produzirem glicose o suficiente para a etapa de fermentação (MODENBACH e NOKES, 2013).

A principal fonte de celulasas para a hidrólise enzimática de lignocelulósicos é o fungo *Trichoderma reesei*, primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial de celulase, permanecendo ainda como a fonte mais utilizada. De várias maneiras, este sistema foi o sistema arquétipo desenvolvido de celulase. Muito da pesquisa subsequente neste campo focou em mutação/seleção de melhores descendências para comercialização da enzima,

incluindo conversão em biomassa. Além de celulases de fungos, há celulases produzidas por bactérias aeróbicas e anaeróbicas (OGEDA e PETRI *et al.*, 2010).

2.2.1 Enzimas

Para se realizar a hidrólise enzimática dos lignocelulósicos, é necessária uma grande variedade de enzimas com especificidades diferentes para degradar todos os constituintes da biomassa. No caso da hidrólise das cadeias de celulose, geralmente três enzimas são suficientes para hidrolisar a celulose em monômeros de glicose, exo-1,4- β glucanases, EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176 (celobio-hidrolases), endo-1,4- β -glucanases, EC 3.2.1.4 e β -glicosidases, EC 3.2.1.21 (celobiasas).

Celobio-hidrolases são capazes de hidrolisar as extremidades das cadeias de celulose para formar glicose, celobiose e celotriose, enquanto as endoglucanases hidrolisam as cadeias de celulose randomicamente reduzindo o grau de polimerização da celulose. A β -glicosidase possui a função de conversão da molécula de celobiose em duas moléculas de glicose, e sua ausência pode provocar inibição pelo produto devido ao excesso de celobiose formado (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; VAN DYK e PLETSCHKE, 2012). No mecanismo sinérgico exo-endo, as endoglucanases clivam randomicamente cadeias na superfície da celulose, fornecendo assim numerosos sítios (terminais) adicionais para ataque das celobio-hidrolases. Logo, cada evento hidrolítico catalisado por uma celobio-hidrolase resulta em novos sítios para as celobio-hidrolases (OGEDA e PETRI *et al.*, 2010).

No caso da hemicelulose, por apresentar composição mais variada em relação à celulose, requer um maior número de enzimas para ser hidrolisada. As enzimas que apresentam esse papel podem ser divididas em enzimas de despolimerização que hidrolisam a cadeia principal de hemicelulose e as enzimas que removem os constituintes que podem representar impedimento estérico à ação das enzimas de despolimerização (VAN DYK e PLETSCHKE, 2012). Dentre as enzimas que realizam a hidrólise da hemicelulose, destacam-se as endoxilanases, que hidrolisam a cadeia principal de xilana em oligossacarídeos mais curtos, e β -xilosidase, que converte os xilo-oligossacarídeos de cadeia curta em xilose. Do mesmo modo, as enzimas que realizam a hidrólise da cadeia de manana são endomananases e

β -manosidase. Contudo, as cadeias de xilanas e mananas geralmente possuem vários constituintes diferentes ligados à cadeia principal, tais como arabinose, galactose e glicose, que requerem enzimas específicas para serem removidas. Algumas destas enzimas são α -L-arabinofuranosidases, α -glicuronidase, α -galactosidase dentre outras (MEYER *et al.*, 2009).

Na hidrólise enzimática da pectina, a enzima pectina metil esterase remove os grupos metil de pectina promovendo o acesso das demais enzimas de despolimerização da pectina, tais como a poligalacturonase e pectinases (JAYANI *et al.*, 2005).

2.4.2.2 Principais parâmetros que afetam a hidrólise enzimática

Visto que as enzimas desempenham um papel vital na conversão das lignoceluloses, muito da integração do processo de hidrólise e fermentação depende destes catalisadores biológicos. Deve existir um equilíbrio entre a carga enzimática utilizada, custo da enzima e eficiência do processo de conversão. Nesse contexto, a pesquisa na busca por combinações de complexos enzimáticos de elevada atividade e eficiência de hidrólise beneficiaria demasiadamente todo o processo de hidrólise enzimática. Além disso, é importante considerar outros parâmetros relevantes na hidrólise, além da atividade enzimática, como oncentração de sólidos, agitação, temperatura e tempo de hidrólise.

Ao lidar com substratos lignocelulósicos que são insolúveis no meio reacional, durante a hidrólise enzimática a agitação pode exercer influência sobre a ação das enzimas reduzindo as limitações de transferência de massa (VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Alguns autores da literatura (SAMANIUK *et al.* 2011) observaram que a o aumento da velocidade de agitação favorece a hidrólise enzimática. No caso de elevadas concentrações de substrato, WANG *et al.* (2011) destacaram que o aumento na intensidade de agitação pode favorecer a hidrólise. Por outro lado, outros autores contradizem essa afirmação (KRISTENSEN *et al.*, 2009). CHAMPAGNE e LI (2009) observaram que a agitação acima de 200 rpm, resultou numa diminuição da taxa de hidrólise atribuído ao decréscimo na atividade enzimática.

Devido ao custo significativo das enzimas na bioconversão, a quantidade total de proteína utilizada na sacarificação é importante. A carga enzimática aplicada varia bastante de

acordo com a composição do substrato, e do tipo de pré-tratamento empregado. Lignocelulósico com elevada composição de lignina podem exigir maiores quantidades de enzimas devido à sua adsorção na mesma durante a hidrólise (ZHENG *et al.*, 2013). Nesse sentido, vários fatores podem reduzir a carga inicial de enzima na hidrólise enzimática: a lavagem do substrato para remover quaisquer compostos inibidores antes da hidrólise, adição de compostos tais como Tween 20, BSA e PEG 6000 que reduzem adsorção da enzima na lignina (KUMAR e WYMAN, 2009; VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

O uso de elevadas concentrações de substrato pode influenciar a taxa de hidrólise. Dentre as possíveis causas, destacam-se as limitações difusionais devido à baixa quantidade de líquido no meio reacional. No decorrer da hidrólise, o meio torna-se mais viscoso o que também reduz a capacidade de mistura e, portanto, a mobilidade das enzimas (ROSGAARD *et al.*, 2007; KUMAR e WYMAN, 2009; WANG *et al.*, 2011).

A temperatura é um parâmetro crítico na hidrólise enzimática que pode ser influenciada pelo tipo de processo de produção de etanol de segunda geração aplicado. No processo conduzido por Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF), em que as etapas de hidrólise e fermentação ocorrem de forma independente, a maioria dos trabalhos da literatura utiliza entre 45-50 °C na hidrólise, temperatura que favorece a ação das enzimas (ROCHA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2013; CASPETA *et al.*, 2014). Em contrapartida, no caso do processo de Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF), na qual a hidrólise da celulose e fermentação do hidrolisado ocorrem conjuntamente, a temperatura do processo é geralmente reduzida devido a limitações de crescimento microbiano, o que pode influenciar negativamente a hidrólise enzimática (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

2.4.3 Estratégias para produção de etanol de biomassa lignocelulósica

Na produção de etanol de segunda geração, diferentes configurações de processos podem ser definidas de acordo com a integração das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, que seguem detalhadas.

No processo de Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF) o sólido resultante do pré-tratamento após ser submetido às etapas posteriores de lavagem para remoção dos inibidores, é conduzido à etapa de hidrólise enzimática pela adição de enzimas celulolíticas. O hidrolisado resultante é convertido em etanol por leveduras de fermentação convencionais ou outros micro-organismos em potencial (Figura 2.6). Nesse caso, os processo de hidrólise e fermentação podem ocorrer em temperaturas distintas e favoráveis para cada processo, 45-50 °C para hidrólise e cerca de 32-37 °C para fermentação (BRETHAUER e WYMAN, 2010).

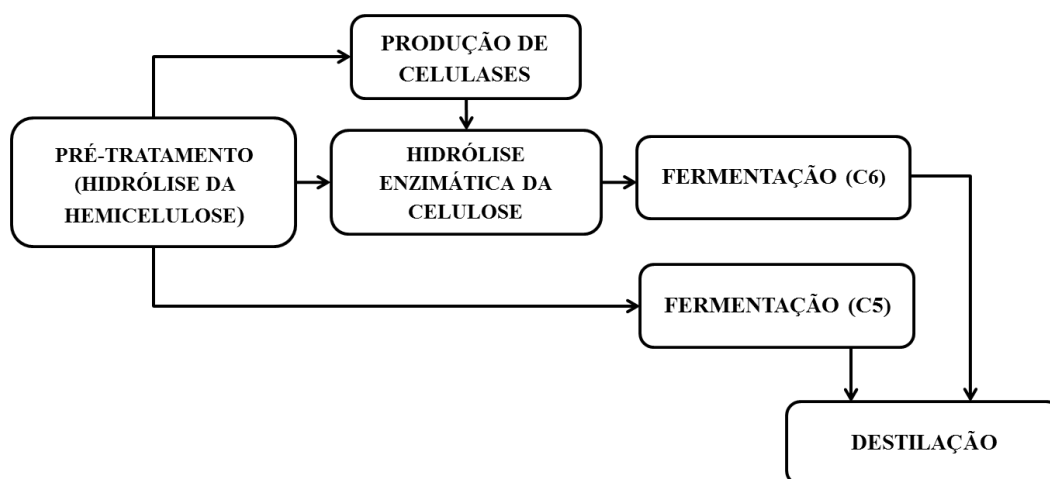


Figura 2.6 – Diagrama de blocos do processo de Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF).

No processo SSF (Fermentação e Hidrólise Simultâneas), a hidrólise enzimática e fermentação são realizadas em um único equipamento, assim, a glicose proveniente da ação de celulases é convertida diretamente para etanol o que minimiza a os efeitos de inibição pelo produto (Figura 2.7).

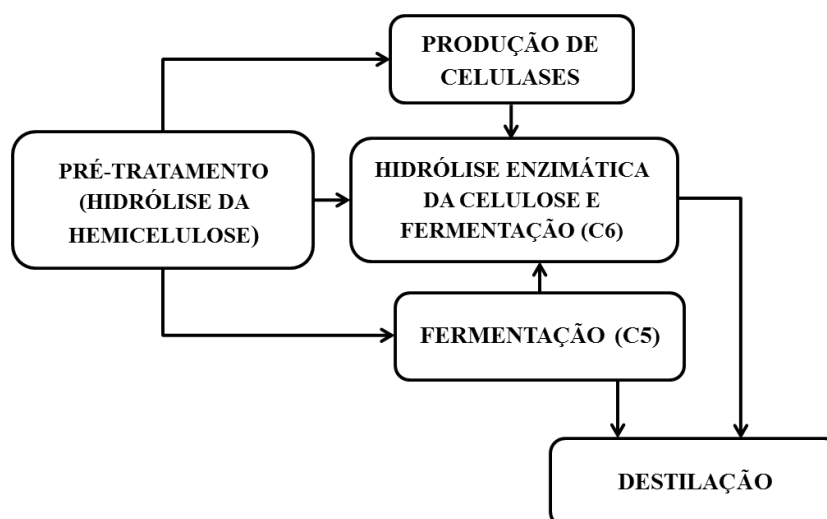


Figura 2.7 – Diagrama de blocos do processo de Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF).

No caso do processo Hidrólise e Co-Fermentação Simultâneas (SSCF), a hidrólise enzimática da celulose e co-fermentação de pentoses e hexoses são conduzidas em um mesmo biorreator com auxílio de micro-organismos capazes de fermentar tanto pentoses quanto hexoses (Figura 2.8).

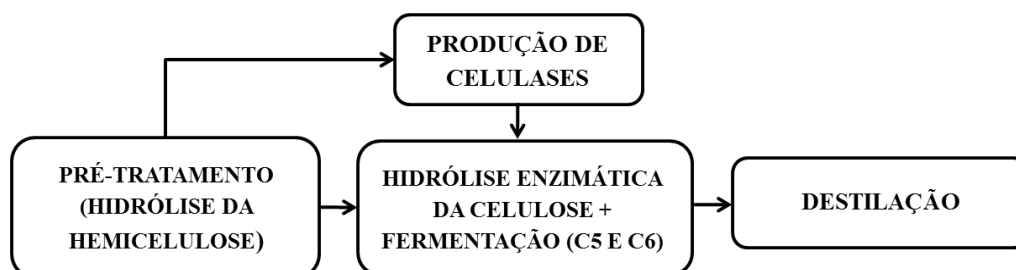


Figura 2.8 – Diagrama de blocos do processo de Hidrólise e Co-Fermentação Simultâneas (SSCF).

Apesar da necessidade da redução da temperatura no processo SSF pelas limitações microbianas, o sistema SSF pode proporcionar maior rendimento e concentração de etanol por superar os principais efeitos de inibição. Além disso, os sistemas SSF e SSCF reduzem a demanda de equipamentos, bem como a presença de etanol impede os riscos de contaminação (BRETHAUER e WYMAN, 2010; SPATARI *et al.*, 2010; OJEDA *et al.*, 2011; HASUNUMA e KONDO, 2012).

Ao estudar os processos de SHF e SSF com *S. cerevisiae* e bagaço de sorgo pré-tratado com vapor de SO₂ seguido de deslignificação com H₂O₂, SHEN *et al.* (2011) obtiveram maiores concentrações de etanol de 31,2 g.L⁻¹ e 27,6 g.L⁻¹, com rendimentos de 90% e 55%, respectivamente. Ao suplementarem ambos os processos com xylanase, os autores observaram que o processo SSF foi prejudicado com a adição da enzima, sendo a concentração de etanol obtida de 2,2 g.L⁻¹. Segundo a literatura, devido à elevada concentração da enzima no processo SSF, a sua bio-atividade prejudicou o crescimento microbiano deixando-o em uma condição de estresse em resposta à presença da proteína.

Nos estudos de ASK *et al.* (2012), os autores compararam os resultados de SHF e SSF de cana-do-reino após pré-tratamento por explosão a vapor em duas etapas. Os autores obtiveram melhores resultados para o material submetido às duas etapas de pré-tratamento. Após 96h os resultados para ambos os processos (SHF e SSF) foram similares, a concentração de etanol obtida foi de 18,5 e 17,0 g.L⁻¹ com valores de Y_{P/S} de 0,25 e 0,21 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹ para SHF e SSF, respectivamente. Vale ressaltar que esses autores também realizaram suplementação com hemicelulases em ambos os processos, não sendo notada nenhuma influência negativa no processo SSF.

Em outros trabalhos da literatura (TOMÁS-PEJO *et al.*, 2009), os autores monitoraram o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 para avaliação da influência da presença da enzima celulase (0,5–3,5 FPU/mL) no crescimento da levedura. Os autores destacaram que a atividade de enzima (Celluclast 1.5L) de 2,5–3,5 FPU/mL exerce um efeito negativo no número de células viáveis de *K. marxianus* atribuído a presença de sorbitol e glicerol no complexo enzimático, o que certamente influenciaria a produção de etanol por SSF.

WIRAWAN *et al.* (2012) realizaram também ensaios de SHF e SSF com células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio e em álcool polivinílico (PVA). No caso do processo SHF, melhores resultados foram obtidos com células imobilizadas em PVA, obtendo-se maior concentração de etanol de 6,24 g.L⁻¹ com o rendimento de etanol de 79,09% e máxima produtividade de 3,04 g.L⁻¹.h⁻¹. Os resultados de SSF embora pouco inferiores aos resultados por SHF, foram obtidos também por células imobilizadas em PVA. Os autores obtiveram maior concentração, rendimento e produtividade de etanol de 5,53 g.L⁻¹, 70,09% e 1,31 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.

Na produção de etanol pela concepção do Bioprocesso Consolidado (BPC), a produção da enzima, hidrólise enzimática e fermentação integram um único processo (Figura 2.9). É considerada a estratégia mais promissora na produção de etanol de lignocelulósicos, pois os custos de investimento de capital, utilitários e outras matérias-primas associados a produção de enzimas pode ser evitada (XU *et al.*, 2009; HASUNUMA e KONDO, 2012).

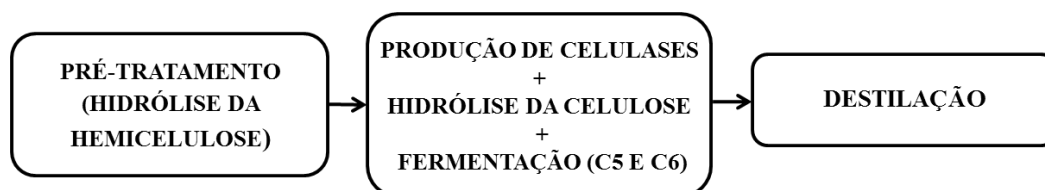


Figura 2.9 – Diagrama de blocos do Bioprocesso Consolidado (BPC).

Para o desenvolvimento desse tipo de processo, é necessário que um único micro-organismo seja capaz de realizar todas as etapas para produção de etanol. Contudo, esse tipo de processo ainda não pode ser desenvolvido a nível industrial com os micro-organismos disponíveis atualmente, necessitando-se do desenvolvimento de contínuas técnicas de engenharia genética para o desenvolvimento de linhagens que possuam maiores níveis de expressão tanto de atividade enzimática quanto de fermentação (OLSON *et al.*, 2012).

Nesse sentido, o uso de linhagens de micro-organismos termotolerantes capazes de produzir grandes quantidades de etanol em temperaturas favoráveis à sacarificação é uma alternativa para a inserção de genes que permitam a produção de celulases e aplicação em BPC. Para tanto, linhagens de *K. marxianus* tem sido submetidas a estudos de modificação genética para a introdução de genes responsáveis pela expressão de enzimas celulolíticas na superfície celular dessas leveduras como uma alternativa ao uso de *S. cerevisiae* (NONKLANG *et al.*, 2008; YANASE *et al.*, 2010; HASUNUMA e KONDO, 2012).

2.5 Potencial de *Kluyveromyces marxianus* na produção de etanol

Em geral, as leveduras são utilizadas para obtenção de vários produtos de interesse, como alimentos, bebidas, enzimas, fármacos, biocombustíveis etc. Dentre as leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada em bioprocessos para a produção de bebidas e etanol, embora existam outros gêneros de potencial aplicação em processos biotecnológicos. Nesse contexto, *Kluyveromyces marxianus* possui atributos desejáveis para aplicações biotecnológicas. Estes incluem uma taxa de crescimento rápido, termotolerância, capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares, alta capacidade de secreção de proteínas e a produção de etanol por fermentação (FONSECA *et al.*, 2008; LANE e MORRISSEY, 2010).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica de leveduras é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas (Figura 2.10). Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de uma molécula de gás carbônico. O rendimento teórico desse processo é 0,511 g de etanol e 0,489 g de gás carbônico em relação a 1 g de glicose metabolizada. Além de etanol e gás carbônico, vários subprodutos também são produzidos durante a fermentação, sendo o glicerol, o principal deles. A formação destes subprodutos, bem como o crescimento celular, inevitavelmente direciona alguns intermediários glicolíticos para as suas correspondentes rotas metabólicas, diminuindo o rendimento de produção do etanol (BAI, ANDERSON E MOO-YOUNG, 2008).

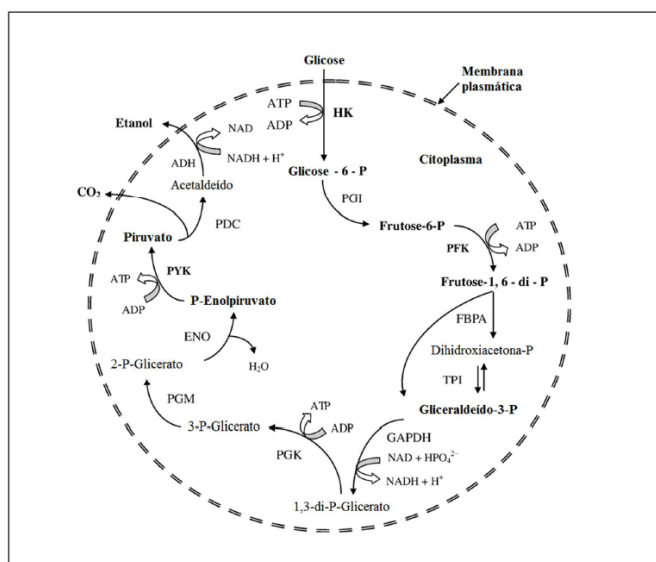


Figura 2.10 – Rota metabólica de fermentação alcoólica em leveduras (CASTANHEIRA, 2013).

K. marxianus é descrita como uma levedura hemiascomiceta, homotálica, filogeneticamente relacionada a *S. cerevisiae* e das espécies conhecidas a mais próxima é *Kluyveromyces lactis*. No caso de *K. marxianus*, assim como *S. cerevisiae*, é uma levedura respiro-fermentativa, que pode gerar energia tanto pelo ciclo do ácido cítrico (TCA) quanto por fermentação produzindo etanol (LANE e MORRISSEY, 2010). No caso de *S. cerevisiae*, quando a concentração de açúcar é elevada, a tendência do metabolismo é fortemente para a fermentação, ou seja, mesmo em presença de oxigênio, o NADH é reoxidado preferencialmente pela via fermentativa em detrimento da via respiratória, esse fenômeno metabólico é conhecido por efeito Crabtree (PISKUR *et al.*, 2006).

Diferente de *S. cerevisiae*, que é classificada como Crabtree positiva, linhagens de *K. lactis* e *K. marxianus* são geralmente classificadas como Crabtree negativa, ambas as espécies carregam os genes necessários para a produção de etanol e podem assumir um perfil mais voltado para fermentação de acordo com as condições empregadas (FONSECA *et al.*, 2008).

A produção de etanol em elevadas temperaturas tem recebido destaque pelas vantagens econômicas do processo, destacando-se a redução nos riscos de contaminação, redução do investimento com sistemas de resfriamento e recuperação contínua do etanol (LIMTONG *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008). Nesse sentido, *K. marxianus*, devido a sua

capacidade termotolerante, é a levedura mais indicada para a produção de etanol de segunda geração, especialmente por SSF.

Em leveduras termotolerantes, o aumento da temperatura estimula a modificação da estrutura dos ácidos graxos presentes na membrana celular. Essas modificações incluem o aumento do tamanho médio da cadeia e/ou aumento da insaturação do ácido graxo. Além das alterações na membrana, a temperatura induz na formação das proteínas de choque térmico (HSPs), que desempenham um importante papel citoprotetor na tolerância tanto à temperatura quanto à presença de etanol. O acúmulo de trealose, dissacarídeo formado por uma ligação α, α -1,1-glicosídeo entre duas unidades de α -glicose, nas células também contribui para a resistência à temperatura em leveduras (BANAT *et al.*, 1998).

De acordo com dados da literatura, existem linhagens de *K. marxianus* capazes de produzir etanol em temperaturas de 40-47 °C (ANDERSON *et al.*, 1986), 49 °C (HUGHES *et al.*, 1984) e até 52 °C (BANAT *et al.*, 1996).

SURYAWATI *et al.* (2009) obtiveram resultados de rendimento e concentração de etanol de 72% e de 16,8 g.L⁻¹, respectivamente ao avaliaram o potencial de *K. marxianus* IMB4 no processo SSF a 45 °C utilizando gramínea (*switchgrass*) após pré-tratamento hidrotérmico. Resultado similar foi reportado por SOUZA *et al.* (2012), que obtiveram 15 g.L⁻¹ de etanol pela levedura *K. marxianus* UFV-3 a 42 °C após SSF de bagaço-de-cana após pré-tratamento ácido seguido de álcali.

LIN *et al.* (2013) avaliaram a produção de etanol de *K. marxianus* var. *marxianus* na produção de etanol por SSF de bagaço de cana após pré-tratamento alcalino. Inicialmente os autores avaliaram a influência da temperatura (37, 42 e 45°C) no rendimento de etanol conduzida em frascos Erlenmeyers. Os autores obtiveram para as temperaturas de 37, 42 e 45 °C, valores de eficiência na produção de etanol 85,1%; 92,2% e 76,2%, respectivamente. Ao realizarem o *scale-up* em um biorreator de 100L, foi obtido do processo SSF a 42 °C após 72h de processo, maior concentração de etanol de 24,6 g.L⁻¹ e eficiência de produção do biocombustível de 79%.

2.6 Produção de etanol de segunda geração de bagaço de caju.

Neste tópico serão abordados os principais aspectos da produção de etanol de segunda geração de bagaço de caju, como pré-tratamento, hidrólise e fermentação do hidrolisado por *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*.

RODRIGUES *et al.* (2011) avaliaram o potencial do pré-tratamento alcalino (NaOH) combinado com micro-ondas de bagaço de caju, no qual os autores estudaram a influência da concentração do álcali (0,2 e 1,0 mol.L⁻¹), potência do micro-ondas (600 e 900W) e tempo de pré-tratamento (15 e 30 minutos). De acordo com os resultados de hidrólise enzimática, a variação da concentração do álcali não afetou os rendimentos de glicose obtidos, obtendo-se 372 mg.g_{celulose}⁻¹ para concentração de 0,2 mol.L⁻¹ e 355 mg.g_{celulose}⁻¹ para a concentração de 1,0 mol.L⁻¹. Contudo foi observado que rendimentos de celobiose foram duas vezes superior na concentração de 1,0 mol.L⁻¹ em relação a concentração de 0,2 mol.L⁻¹, resultado atribuído à limitações do complexo enzimático utilizado (Celluclast 1.5L). Segundo os autores, os demais parâmetros avaliados não exerceram influência expressiva na digestibilidade de celulose. Em relação à produção de etanol, o hidrolisado enzimático obtido foi convertido em etanol por *S. cerevisiae* com maior concentração de etanol de 5,6 g.L⁻¹, produtividade de 1,41 g.L⁻¹.h⁻¹ e fator de conversão de glicose em etanol de 0,48 g_{etanol}/g_{glicose}.

Outro pré-tratamento alcalino de bagaço de caju foi avaliado por CORREIA *et al.* (2013). Os autores realizaram a impregnação do bagaço com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), variando-se o percentual do álcali (0 – 4,3% v/v), percentual de bagaço (2,5 – 10% m/v) e tempo de incubação (30 minutos – 24h). Dentre os resultados, os autores destacaram que a condição que melhor favoreceu a produção de glicose na etapa de hidrólise enzimática foi 4,3% (v/v) de H₂O₂, 5% (m/v) de bagaço por 6h de pré-tratamento. Após a hidrólise enzimática, o rendimento de glicose obtido foi de 431 mg.g_{CAB-AHP}⁻¹, o que corresponde a 894 mg.g_{celulose}⁻¹. Nesse caso, o percentual de celulose aumentou de 20,56% para 48,23% e o percentual de lignina reduziu de 35,26% para 7,83%.

Nos estudos de ROCHA *et al.* (2014), os autores estudaram o pré-tratamento ácido (H₂SO₄) de bagaço de caju e o potencial do hidrolisado ácido, rico em glicose (16,08 g.L⁻¹) e xilose (24,48 g.L⁻¹), na obtenção de bioprodutos como o etanol e xilitol. No pré-

tratamento ácido, foram estudados os seguintes parâmetros: concentração do ácido (0 – 1 mol.L⁻¹), percentual de bagaço (15 – 35% m/v) e tempo de pré-tratamento (15, 30 e 45 minutos). Os autores definiram como melhores parâmetros do pré-tratamento, a concentração de ácido de 0,6 mol.L⁻¹, 30% (m/v) de bagaço por 15 minutos. A partir do hidrolisado obtido desse pré-tratamento, foram obtidos 10 g.L⁻¹ de etanol de *S. cerevisiae*, rendimento de etanol de 0,49 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹. Na fermentação com *K. marxianus* CCA510, a levedura produziu etanol e xilitol do hidrolisado ácido com maiores concentrações de 11,89 g.L⁻¹ e 6,76 g.L⁻¹ respectivamente, em 96h de fermentação.

O hidrolisado ácido de bagaço de caju, alvo do estudo de ROCHA *et al.* (2014), foi também avaliado por ROCHA *et al.* (2011), no qual os autores estudaram a produção de etanol de *K. marxianus* CE025 e sua termotolerância em diferentes temperaturas (30, 34, 37, e 40 °C). Segundo os autores, melhores resultados foram obtidos a 30 °C, resultando na maior concentração de etanol de 12,36 g.L⁻¹ e rendimento do biocombustível de 0,417 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹.

Vale destacar que no pré-tratamento ácido estudado por ROCHA *et al.* 2014, os autores verificaram na melhor condição de pré-tratamento, o aumento do percentual de celulose de 20,9% para 25,4%; e lignina, de 33,6% para 56,7% do bagaço devido à solubilização de parte da hemicelulose, o que resultou no acúmulo dos demais constituintes da biomassa. Em estudos de hidrólise enzimática desse material (CAB-H), realizados pelos mesmos autores (ROCHA *et al.* 2009), foi obtido rendimento de glicose de 82 mg.g_{CAB-H}⁻¹, equivalente a 185 mg.g_{celulose}⁻¹. Por outro lado, devido ao elevado percentual de lignina após o pré-tratamento ácido, os autores realizaram o pré-tratamento álcali de CAB-H, utilizando 1,0 M de NaOH a 121 °C por 30 minutos em autoclave, nomeando o material resultante de CAB-OH.

A hidrólise enzimática de CAB-OH de ROCHA *et al.* (2009), nas mesmas condições realizadas para CAB-H, aumentou em quase 10 vezes o rendimento de glicose, obtendo-se 730 mg.g_{CAB-OH}⁻¹, equivalente a 1015 mg.g_{celulose}⁻¹, maior rendimento de glicose obtido com bagaço de caju pré-tratado dentre os estudos abordados nesse tópico. A fermentação do hidrolisado enzimático de CAB-OH por *S. cerevisiae*, com concentração inicial de glicose de 52,4 g.L⁻¹, resultou em maior concentração de etanol de 20 g.L⁻¹, com rendimento de 0,38 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹.

Nesse sentido, visando estudos de SHF e SSF de bagaço de caju, objeto deste trabalho, selecionou-se o pré-tratamento ácido seguido de álcali dos estudos de ROCHA *et al.* (2009) como condição de partida para o desenvolvimento deste estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Matéria-prima

O bagaço de caju utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos do Brasil situada no estado do Ceará, Brasil. A matéria-prima doada foi estocada em freezer na temperatura -10°C até seu uso.

3.1.2 Enzimas

Nesse estudo, os complexos enzimáticos estudados foram cordialmente doados pela empresa Novozymes (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) na forma de extrato enzimático. Foram utilizados os complexos de celulases Celluclast 1.5L e NS 22074, constituídos majoritariamente de celulases e β -glicosidases. O complexo NS 22074 é proveniente do kit de biomassa desenvolvido pela Novozymes, assim como o complexo de celobiasas NS 50010, também utilizado na realização dos experimentos.

3.1.3 Micro-organismos

Neste trabalho, estudou-se a produção de etanol em hidrolisado enzimático de CAB-OH de oito cepas de leveduras, três de *Kluyveromyces marxianus* (ATCC36907, CCA510 e CE025), três de *Saccharomyces cerevisiae* (01, 02 e CCA008), uma linhagem de *Saccharomyces* sp. 1238 e uma de *Hanseniaspora* sp. GPBio03. A procedência das culturas encontra-se detalhada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Procedência das culturas de leveduras utilizadas neste estudo.

Levedura	Procedência
<i>K. marxianus</i> ATCC36907	Coleção de culturas norte-americana. Adquirida com recursos de projeto.
<i>K. marxianus</i> CCA510	Doação do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFSCar.
<i>K. marxianus</i> CE025	Doação do Laboratório de Microbiologia da UFC.
<i>S. cerevisiae</i> 01	Proveniente do fermento comercial Saf-momento - SAF Argentina, Buenos Aires.
<i>S. cerevisiae</i> 02	Proveniente da Usina Brigadeiro situada na cidade de Crato - CE.
<i>S. cerevisiae</i> CCA008	Doação do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFSCar.
<i>Saccharomyces</i> sp. 1238	Doação do Laboratório de Antibióticos da UFPE.
<i>Hanseniaspora</i> sp. GPBio03	Isolada no Laboratório GPBio da UFC. Proveniente da fermentação natural do suco de caju. Levedura depositada no GenBank com número de acesso KF791566.

3.1.4 Meios de Cultura

3.1.4.1 Meios de manutenção e propagação do inóculo

Para manutenção das leveduras, utilizou-se o meio ágar YEPD como descrito na Tabela 3.2. A cultura foi mantida em estoque sob refrigeração a 4°C. Para a obtenção da biomassa inicial do ensaio fermentativo ($5 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$), preparou-se o meio de cultura YEPD caldo com composição descrita na Tabela 2 sem a adição do ágar. Adicionou-se cerca de 100 mL de meio em Erlenmeyers de 250 mL após o ajuste do pH para uma faixa de 4,5 – 5,0. Em seguida, os Erlenmeyers foram esterilizados a 110°C por 10 minutos.

Tabela 3.2 - Composição do meio ágar YEPD para propagação de células das leveduras estudadas.

Componente	Concentração (g.L^{-1})
Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	20,0
Extrato de Levedura	10,0
Peptona Bacteriológica	20,0
Ágar	20,0

3.2 Métodos

3.2.1 Pré-tratamento

3.2.1.1 Preparação da matéria-prima

O bagaço de caju inicialmente foi umidificado com água mantendo a relação massa úmida/água 1:1 seguido de prensagem em prensa hidráulica, procedimento realizado cinco vezes para retirada de suco residual, pigmentos e antioxidantes. Segundo a literatura (ABREU, 2001; BARBOSA, 2010), o extrato aquoso obtido da prensagem do bagaço de caju, além de açúcares redutores, é rico em carotenoides (xantofilas), flavonoides (miricetina, quercetina e canferol) e vitamina C que pode ser utilizado como matéria-prima em outros processos.

Posteriormente, o bagaço de caju foi seco a 50-60°C em estufa com circulação de ar, triturado, peneirado e estocado a temperatura ambiente até seu uso. Após peneiramento do material, as partículas que ficaram retidas entre as peneiras de Mesh 20-80 foram estocadas e utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos.

3.2.1.2 Caracterização da matéria-prima

O bagaço de caju após o pré-tratamento ácido seguido de álcali (ROCHA *et al.*, 2009), material denominado CAB-OH, foi caracterizado quanto a sua composição de extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina. Empregaram-se na sua quantificação, duas metodologias: a metodologia associada aos protocolos (SLUITER *et al.*, 2008a,b) do instituto NREL (National Renewable Energy Laboratory) e a metodologia descrita por GOUVEIA *et al.* (2009), validada para caracterização de bagaço de cana-de-açúcar, metodologia esta baseada também nos protocolos do instituto NREL. As principais equações utilizadas na

caracterização do bagaço de caju antes e após diferentes pré-tratamentos para as duas metodologias estão descritas abaixo. Na determinação dos percentuais de celulose e hemicelulose utilizou-se as equações 1 e 2, respectivamente.

$$\% Celulose = \frac{Glucose(g.L^{-1}) \times V_{reacional}(L) \times 0,90}{R_{glicose+celobiose}} \times 100 \quad (1)$$

Onde $R_{glicose+celobiose}$ é o fator de degradação dos açúcares que compõe a celulose devido à presença do ácido sulfúrico.

$$\% Hemicelulose = \frac{[Xilose(g.L^{-1}) + Arabinose(g.L^{-1})] \times V_{reacional}(L) \times 0,88}{R_{xilose+arabinose}} \times 100 \quad (2)$$

Onde $R_{xilose+arabinose}$ é o fator de degradação dos principais açúcares que compõe a hemicelulose devido à presença do ácido sulfúrico.

O percentual de lignina do lignocelulósico foi quantificado pelo somatório do percentual de lignina solúvel e insolúvel após a acidificação do material durante a caracterização, segundo as equações 3 a 5.

$$\% Lignina = \% Lignina_{solúvel} + \% Lignina_{insolúvel} \quad (3)$$

$$\% Lignina_{solúvel} = \frac{ABS(240nm) \times V_{reacional}(L) \times Diluição}{\epsilon \times Massa_{inicial}(g)} \times 100 \quad (4)$$

Na qual ϵ é a absorvidade para o comprimento de onda a 240 nm recomendada pelo protocolo, $\epsilon = 25$.

$$\% Lignina_{insolúvel} = \frac{Massa_{filtro+lignina} - Massa_{filtro}}{Massa_{inicial}(g)} \times 100 \quad (5)$$

O percentual de extraíveis da biomassa foi determinado utilizando etanol PA sendo definido pela equação 6.

$$\% Extraíveis = \frac{Massa_{extraíveis}}{Massa_{inicial}(g)} \times 100 \quad (6)$$

Realizou-se também a análise dos materiais por espectroscopia na região do infravermelho ($3700\text{-}800\text{ cm}^{-1}$) através de um espectrofotômetro de FTIR, modelo 610/620-IR, Varian/Agilent.

3.2.1.3 Pré-tratamento com H_2SO_4 em autoclave

O pré-tratamento ácido do bagaço de caju consistiu na imersão do bagaço seco em solução de H_2SO_4 0,6 M, mantendo a concentração de sólidos de 30 g.L^{-1} , procedimento realizado em frascos erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, realizou-se a impregnação do material com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, os frascos foram para autoclave para o tratamento térmico a 121°C durante 15 minutos (ROCHA *et al.*, 2009). Após o pré-tratamento, realizaram-se três lavagens com H_2O destilada para remoção do excesso de ácido na proporção material úmido/água 1:2. Em seguida, o material foi seco a 50°C por 24 horas, triturado e estocado até seu uso. O material foi nomeado CAB-H.

3.2.1.4 Pré-tratamento com NaOH em autoclave

O bagaço de caju pré-tratado CAB-H foi submetido ao pré-tratamento alcalino pela imersão do CAB-H em solução de NaOH 1,0 M; mantendo a concentração de sólidos de $7,5\text{ g.L}^{-1}$, procedimento realizado em frascos erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, realizou-se a homogeneização do conteúdo com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, os frascos foram para autoclave para o tratamento térmico a 121°C durante 30 minutos (VÁSQUEZ *et al.*, 2007). Após o pré-tratamento, realizaram-se lavagens com H_2O destilada até a neutralização do pH do material na proporção material úmido/água 1:2. Em seguida, o material foi seco a 50°C por 24 horas, triturado e as partículas que ficaram retidas entre as peneiras de Mesh 20-80 e +80 foram estocadas separadamente a temperatura ambiente e utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos. O material foi nomeado CAB-OH.

3.2.2 Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF)

3.2.2.1 Hidrólise enzimática

3.2.2.1.1 Determinação da concentração de proteínas nos complexos enzimáticos

A concentração de proteínas totais nos complexos enzimáticos comerciais utilizados nesse estudo foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.2.2.1.2 Determinação da atividade enzimática nos complexos enzimáticos

a) Atividade de celulase nos complexos de celulases NS 22074 e Celluclast 1.5L

Na determinação da atividade de celulases, a atividade foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo segundo a metodologia proposta por GHOSE (1987). Em tubos de ensaio, adicionou-se tiras de 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº 1 e 1,0 mL de tampão para pré-incubação à 50 °C. Em seguida, a reação de hidrólise foi iniciada pela adição de 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas responsáveis por liberar cerca de 2 mg de glicose. Nas mesmas condições experimentais, realizou-se a reação do branco das diluições enzimáticas (sem a presença do substrato) e branco do substrato (sem a presença da enzima). Transcorrido o tempo de 60 min, as reações foram interrompidas pela adição do reagente DNS. A leitura das amostras foi realizada a 620 nm sendo posteriormente determinadas as concentrações de glicose obtidas. Em seguida, a atividade foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo segundo a metodologia de GHOSE (1987).

b) Atividade de CMCase nos complexos de celulases NS 22074 e Celluclast 1.5L

A atividade de CMCase nos extratos enzimáticos foi determinada segundo a metodologia proposta por GHOSE (1987). Utilizou-se como substrato, solução de carboximetilcelulase a 2% (m/v). Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,5 mL da solução de CMC sendo pré-incubados à 50 °C. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de diferentes diluições do extrato enzimático. Sob mesmas condições experimentais, também foram realizados os brancos das diluições enzimáticas (sem a presença do substrato) e o branco do substrato (sem a presença da enzima). Transcorridos 60 min, as reações foram interrompidas pela adição do reagente DNS, sendo posteriormente determinadas as concentrações de glicose obtidas. Em seguida, a atividade foi expressa em unidade internacional de atividade (UI) por mL do complexo enzimático segundo a metodologia de GHOSE (1987).

c) Atividade de celobiase no complexo de celobiasas NS 50010

A determinação da atividade de celobiase foi conduzida segundo a metodologia proposta por GHOSE (1987), com modificações. Utilizou-se solução de celobiose a 15 mM como substrato para a hidrólise. Adicionou-se aos tubos de ensaio 1,0 mL da solução de celobiose, sendo pré-incubados à 50 °C. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de diferentes diluições enzimáticas, as quais com a capacidade de produzir cerca de 1,0 mg de glicose. Sob mesmas condições experimentais, também foram realizados os brancos das diluições enzimáticas e o branco do substrato. Transcorridos 30 min, os tubos foram colocados em água fervente por 5 min para interromper a reação. Após centrifugação (6000 rpm/15 min) seguida de filtração, os sobrenadantes foram analisados por CLAE, para quantificação de glicose produzida.

Para calcular atividade de celobiase, determinou-se a massa de glicose presente no meio reacional, convertendo assim em quantidade absoluta de glicose (mg). Através de um gráfico semilog da concentração do extrato enzimático versus massa de glicose gerada, estimou-se a concentração enzimática necessária para liberar exatamente 1,0 mg de glicose

(C_{Enzima}). Encontrada a concentração enzimática desejada, utilizou-se a equação abaixo para determinar a atividade de celobiase (GHOSE, 1987):

$$UCB / mL = \frac{0,0926}{C_{Enzima}} \quad (7)$$

3.2.2.1.3 Hidrólise enzimática de CAB-OH

a) Estudo da hidrólise enzimática de diferentes complexos enzimáticos

A hidrólise enzimática de CAB-OH foi realizada utilizando extratos enzimáticos comerciais doados pela empresa Novozymes, através da adição de quantidade de enzima suficiente para se obter a atividade desejada em termos de FPU ou UCB/g de celulose de CAB-OH (SELIG *et al.*, 2008). Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL contendo CAB-OH a 1,0% (m/v) de celulose, celulasas (Celluclast 1.5L ou NS 22074) com suplementação ou não de celobiasas (NS 50010), em tampão citrato de sódio na concentração de 50 mM e pH 4,8. Para evitar a proliferação de bactérias, adicionou-se ao meio reacional 120 µL de solução de tetraciclina de 10 mg/mL preparada em etanol 70% (v/v). Posteriormente, os frascos foram incubados em agitador orbital sob agitação de 150 rpm, a 45°C por 96 h. Em intervalos de tempo pré-determinados, retirou-se 1,0 mL da mistura reacional para determinação da concentração açúcares (celobiose, glicose e xilose) por CLAE.

Após a quantificação dos açúcares na amostra, em $g \cdot g_{CAB-OH}^{-1}$, ou seja gramas dos açúcares (celobiose, glicose e xilose) por gramas de CAB-OH, determinou-se a digestibilidade de celulose e hemicelulose, durante a hidrólise como descrito na metodologia do instituto NREL (SELIG *et al.*, 2008) e detalhado nas equações 8 e 9:

$$\%digestibilidade_{CEL} = \frac{Glicose(g.L^{-1}) \times volume(L) \times 0.90}{Celulose_{inicial}(g)} \times 100 \quad (8)$$

$$\%digestibilidade_{HEM} = \frac{Xilose(g.L^{-1}) \times volume(L) \times 0.88}{Hemicelulose_{inicial}(g)} \times 100 \quad (9)$$

b) Hidrólise enzimática de CAB-OH utilizando Celluclast 1.5L com vistas a fermentação do hidrolisado

A hidrólise enzimática de CAB-OH foi conduzida segundo os protocolos do Instituto NREL (SELIG *et al.*, 2008) utilizando Celluclast 1.5L a 60 FPU/g_{celulose} e 16% (m/v) de CAB-OH (11,5% m/v de celulose) para se obter em torno de 50 g.L⁻¹ de concentração de glicose para posterior fermentação. Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL com tampão citrato de sódio a 50 mM e pH 4,8. Adicionou-se 120 µL de solução de tetraciclina a 10 mg/mL para evitar contaminação por bactérias. O processo foi realizado a 150 rpm, 45°C por 72 horas.

Ao final do processo, realizou-se filtração em papel de filtro de filtração rápida e membrana de éster de celulose para separação dos sólidos do hidrolisado obtido. Em seguida, retirou-se 1,0 mL da mistura reacional para determinação da concentração açúcares por CLAE sendo este estocado na temperatura de -10°C até seu uso na etapa de fermentação.

3.2.2.2 Fermentação do hidrolisado obtido da hidrólise enzimática de CAB-OH com Celluclast 1.5L

A partir da concentração de glicose+xilose no hidrolisado, realizou-se a diluição do mesmo utilizando água destilada para uma concentração de glicose de 50 g.L^{-1} e ajuste do pH para 4,5 - 5,0. Posteriormente, o meio de cultivo foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 250 mL com cerca de 50 mL de meio suplementado com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato e amônio e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de extrato de levedura. Em seguida, realizou-se a esterilização a 110°C por 10 minutos em autoclave.

O crescimento celular do inóculo foi realizado adicionando 3 alçadas a partir do *slant* contendo o micro-organismo em 100 mL de meio YEPD caldo. Em seguida, realizou-se a incubação dos frascos a 150 rpm, 30°C por 24 horas, em agitador orbital. Posteriormente, realizou-se a recuperação da biomassa do meio em centrífuga a 10.000 rpm por 15 min.

A fermentação do hidrolisado foi conduzida com concentração inicial de micro-organismo de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ (biomassa seca), a 30°C e 150 rpm. Após a etapa de *screening* de leveduras, realizou-se o estudo da influência da temperatura da levedura selecionada na faixa de temperatura de $30\text{-}50^\circ\text{C}$. Amostras do meio de cultivo (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise de biomassa, concentração de açúcares e etanol por CLAE.

3.2.2.3 Fermentação utilizando glicose PA

Para a avaliação da influência da temperatura na produção de etanol da levedura selecionada após *screening* em hidrolisado enzimático de CAB-OH, utilizou-se glicose PA como fonte de carbono em meio de cultivo com composição similar ao hidrolisado contendo a mesma suplementação de fonte de nitrogênio. A concentração de glicose foi fixada em 50 g.L^{-1} com suplementação de extrato de levedura ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e sulfato e amônio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$). Realizou-se a diluição das fontes de carbono e nitrogênio em tampão citrato de sódio 30 mM, concentração aproximada do tampão após diluição do hidrolisado, seguido do ajuste do pH

para 4,5 - 5,0. Transferiu-se cerca de 50 mL de meio em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Em seguida, realizou-se a esterilização dos frascos a 110°C por 10 minutos em autoclave.

Após as etapas de propagação do inóculo, a fermentação em meio de glicose PA foi conduzida com concentração inicial de biomassa de 5,0 g.L⁻¹ a 150 rpm na faixa de temperatura de 30-50°C. Amostras do meio de cultivo (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise de biomassa, concentração de açúcares e etanol por CLAE.

3.2.3 Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF)

A preparação do meio de cultivo SSF com CAB-OH foi realizada em solução tampão citrato 50 mM e pH 4,8; suplementado com 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 1 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de solução tampão e fontes de nitrogênio (5,0 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 1,0 g.L⁻¹ de sulfato e amônio). Posteriormente, adicionou-se CAB-OH com percentual de sólidos de 10% (m/v) equivalente a 7,5% (m/v) de celulose. Em seguida, os frascos foram esterilizados a 110°C/10 minutos. Mesmo procedimento foi adotado para preparação do meio de cultivo SSF utilizando celulose microcristalina (fabricante Vetec), mantendo-se o percentual de celulose fixo de 10% (m/v).

A propagação do inóculo da levedura foi realizada em meio de cultivo YEPD conforme descrito no subitem 2.2.2.2. Ao meio SSF, primeiramente adicionou-se volume de celulasas (Celluclast 1.5L ou NS 22074) segundo atividade pré-definida (15 - 30 FPU/g_{celulose}), seguido da adição da biomassa (5,0 g.L⁻¹) obtida após a centrifugação do inóculo a 10.000 rpm por 15 min. A fermentação do hidrolisado foi conduzida em agitador rotativo a 150 rpm e temperatura de estudo na faixa de 40 - 50°C. Amostras do meio de cultivo (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise.

3.2.4 Métodos Analíticos

3.2.4.1 Concentração de biomassa

Nos ensaios de fermentação conduzidos com hidrolisado enzimático, devido à presença de uma levedura floculante na etapa de *Screening*, a concentração celular foi determinada através da análise da massa seca, realizada segundo a metodologia proposta por ATALA *et al.* (2001) com modificações. Amostras do meio de cultura (1,0 mL) foram coletadas e centrifugadas a 6.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para análise de carboidratos. O precipitado foi lavado com 0,5 mL de água destilada para remoção de excedente de meio de cultura, e novamente centrifugado (6.000 rpm/15 minutos) e seco a 60°C em estufa até peso constante.

Nos ensaios utilizando glicose PA, a concentração celular foi determinada por espectrofotometria, uma vez que nessa etapa nenhuma levedura floculante foi utilizada. Inicialmente determinou-se a curva-padrão de crescimento celular de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 a 660 nm. Para a quantificação da concentração celular, amostras do meio de cultura foram retiradas e submetidas à leitura da absorbância em espectrofotômetro. Posteriormente, realizou-se a centrifugação da amostra a 6.000 rpm por 15 min para utilização do sobrenadante para quantificação de açúcares e etanol por CLAE.

3.2.4.2 Determinação da concentração de açúcares, etanol e inibidores

As concentrações de carboidratos (celobiose, glicose e xilose), etanol, ácido acético, ácido fórmico, furfural e HMF (hidroximetilfurfural) após os ensaios de caracterização, hidrólise enzimática e fermentação foram medidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês HPLC), utilizando um sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração (Modelo 2414) e uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

A solução de H_2SO_4 a 5 mmol.L^{-1} preparada com Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizada como fase móvel com fluxo de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ a 65°C para os ensaios de hidrólise enzimática e fermentação. No caso dos ensaios de caracterização do material, o fluxo foi fixado em $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ segundo metodologia de SLUITER *et al.*, 2008a,b. O volume de injeção das amostras foi padronizado em $20 \mu\text{L}$. As concentrações foram calculadas através de curva de calibração previamente definida dos constituintes de interesse identificados.

3.2.5 Determinação do rendimento e parâmetros cinéticos no processo fermentativo

Realizou-se o acompanhamento do comportamento cinético através da determinação do rendimento e parâmetros cinéticos do processo fermentativo (HASHIZUME; AQUARONE, 2005). Os parâmetros monitorados foram a produtividade (Q_{EtOH}), conversão de glicose em etanol ($Y_{\text{E/G}}$), eficiência (η) e velocidades específicas (μ_X , μ_S , μ_P). Esses parâmetros foram calculados segundo as equações 10 a 12, respectivamente.

$$Q_{\text{EtOH}} = \frac{\text{EtOH}_t - \text{EtOH}_0}{t} \quad (10)$$

Na equação 3, Q_{EtOH} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) é a produtividade, EtOH_0 é a concentração de etanol (g.L^{-1}) no início da fermentação e EtOH_t é a concentração de etanol definida no tempo t (h) de fermentação.

$$Y_{\text{E/G}} = - \frac{\text{EtOH}_f - \text{EtOH}_0}{(\text{Gli}_f - \text{Gli}_0)} \quad (11)$$

Onde $Y_{\text{E/G}}$ é o fator de conversão de substrato em produto ($\text{g}_{\text{etanol}}.\text{g}_{\text{glicose}}^{-1}$), EtOH_f e EtOH_0 são as concentrações de etanol (g.L^{-1}) no final e no início da fermentação, respectivamente. Gli_0 e Gli_f são as concentrações inicial e final de glicose, respectivamente.

$$\eta = \frac{Y_{E/G}}{0,511} \times 100 \quad (12)$$

Sendo η (%) a eficiência da fermentação, $Y_{E/G}$ é a conversão de glicose em etanol, ou seja, a conversão de glicose em etanol definida pela equação 4. O fator 0,511 está relacionado a estequiometria da equação, em que a produção anaeróbica máxima possível de etanol é de 0,511g para 1g de glicose convertido (HASHIZUME; AQUARONE, 2005).

Nos ensaios de SHF em hidrolisado enzimático de CAB-OH de *K. marxianus* ATCC36907, as velocidades específicas de crescimento microbiano, consumo de glicose e produção de etanol foram determinadas segundo as equações 13 a 15, respectivamente.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (13)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (14)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (15)$$

Nos ensaios de SSF (Fermentação e Hidrólise Simultâneas), o fator de conversão de substrato em produto ($Y'_{E/G}$) e a eficiência da fermentação (η') foram calculadas segundo as equações 16 e 17, respectivamente.

$$Y'_{E/G} = \frac{EtOH_f(g.L^{-1}) - EtOH_0(g.L^{-1})}{Celulose_{inicial} \times CAB - OH(g.L^{-1}) \times 1,11} \quad (16)$$

$$\eta' = \frac{Y'_{E/G} \times 100}{0,511} \quad (17)$$

Segundo as equações, $EtOH_f$ e $EtOH_0$ são as concentrações de etanol ($g.L^{-1}$) no final e no início da fermentação, respectivamente e 1,11 representa o fator de conversão de celulose em glicose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do bagaço de caju

A Tabela 4.1 apresenta os resultados da composição centesimal de bagaço de caju *in natura*, após o pré-tratamento ácido, e após o pré-tratamento ácido seguido do alcalino segundo os protocolos do instituto NREL e metodologia de GOUVEIA *et al.* (2009). Observa-se na Tabela 4.1, que o pré-tratamento ácido promoveu a solubilização de parte da hemicelulose presente do bagaço *in natura* pela redução do seu percentual de 16,33% (CAB) para 3,72% (CAB-H), resultando na solubilização de 86% da hemicelulose do bagaço *in natura* (CAB). Por outro lado, houve recuperação de 74% da celulose presente no bagaço, sendo o restante disponível no hidrolisado ácido como destacaram ROCHA *et al.* (2009, 2014). Já o pré-tratamento alcalino proporcionou o aumento expressivo da porcentagem de celulose do bagaço de caju em relação ao material sem pré-tratamento (CAB), de 20,91% para 71,93%, o que corresponde ao enriquecimento de celulose de 244%. O acúmulo de celulose, por sua vez, pode ser atribuído a redução de 53% na porcentagem de lignina em relação ao percentual inicial presente no bagaço *in natura*. Por outro lado, observou-se uma perda expressiva de celulose após o pré-tratamento alcalino em relação ao bagaço de caju *in natura*, 68%. Contudo, ROCHA *et al.*, 2009, verificou a importância do pré-tratamento alcalino do bagaço de caju com vistas à hidrólise enzimática do material, na redução da demanda por enzimas, inibição pela presença de lignina e aumento na eficiência do processo de produção de glicose para etapa de fermentação.

Tabela 4.1 - Análise composicional em base seca do bagaço de caju *in natura* e após diferentes pré-tratamentos.

Componentes	CAB ¹ (%)	CAB-H ¹		CAB-OH ²		CAB-OH ³	
		Teor (%)	M _{recuperada} (g)	Teor (%)	M _{recuperada} (g)	Teor (%)	M _{recuperada} (g)
Massa seca	100,0	100,0	61,38	100,0	9,34	100,0	9,34
Celulose	20,91 ± 2,03	25,37 ± 1,62	15,57	71,93 ± 0,49	6,72	74,72 ± 1,16	6,98
Hemicelulose	16,33 ± 3,00	3,72 ± 0,91	2,28	8,51 ± 0,13	0,79	5,58 ± 0,04	0,52
Lignina + Cinzas	36,88 ± 0,09	56,70 ± 0,07	34,80	17,27 ± 1,87	1,61	12,04 ± 0,08	1,12
Extraíveis	5,64 ± 0,07	0,71 ± 0,05	0,44	0,93 ± 0,18	0,09	0,93 ± 0,18	0,09
Total	79,76 ± 1,30	86,50 ± 0,66	53,09	98,64 ± 0,67	9,21	93,27 ± 0,37	8,71

¹Rocha, 2010.²Resultados obtidos pela metodologia de SLUITER *et al.*, 2008a,b.³Resultados obtidos pela metodologia de GOUVEIA *et al.*, 2009.

Outros trabalhos na literatura abordaram sobre a presença de pectina no bagaço de caju (SANTOS, 2007; BARBOSA, 2010) na faixa de 13,41-78,82%, e como pode ser evidenciado na Tabela 4.1, o somatório dos percentuais de extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina é inferior a 100%, indicando a presença de outro constituinte, possivelmente pectina.

Realizou-se também a análise dos sólidos CAB, CAB-H e CAB-OH por espectroscopia na região do infravermelho, e os espectros encontram-se no Anexo deste trabalho. Como as principais ligações químicas dos lignocelulósicos são detectadas na região de 1800-800 cm⁻¹, esta região foi selecionada para a análise dos diferentes materiais deste trabalho.

De acordo com os resultados, as bandas de absorção do CAB em 1359, 1146 e 1016 cm⁻¹ podem ser atribuídas à presença de carboidratos no bagaço de caju *in natura* (CAB). A absorção em 1359 cm⁻¹ corresponde presença da ligação C-H presente na celulose. Ligações assimétricas de C-O foram observadas em 1146 cm⁻¹. Após o pré-tratamento ácido CAB-H, observa-se que nenhuma diferença expressiva no espectro foi observada. Por outro lado, após pré-tratamento alcalino, a absorção em 895 cm⁻¹ corresponde à vibração das ligações β-glicosídicas com uma contribuição vibracional do anel de hexose e/ou pentoses, característica das ligações glicosídicas em carboidratos.

As bandas que representam a estrutura da lignina foram visíveis no espectro de infravermelho do bagaço de caju *in natura* em 1608 e 1535 cm⁻¹, e estão associadas com vibrações na estrutura dos anéis aromáticos que compõe a lignina. No material CAB-OH,

observa-se uma expressiva redução na intensidade dessas bandas devido a solubilização da lignina pelo NaOH, que nesse material está representada pela absorção em 1637 cm^{-1} .

Na literatura, muitos são os trabalhos sobre a influência do pré-tratamento alcalino na solubilização da lignina, considerada uma etapa fundamental no pré-tratamento de lignocelulósicos (CHEN; DIXON, 2007; RUZENE *et al.*, 2008; MCINTOSH; VANCOV, 2010; LI *et al.*, 2012).

A lignina é o constituinte dos lignocelulósicos que negativamente influencia a hidrólise enzimática da celulose. Contudo diferentes aplicações da lignina estão em investigação para obtenção de produtos com potencial de mercado (ALVIRA *et al.*, 2010).

O pré-tratamento alcalino é capaz de aumentar a hidrólise enzimática da celulose, pois as bases, dependendo da concentração do álcali, são eficientes na solubilização da lignina, mantendo as cadeias de celulose e hemicelulose quase intactas quando comparado aos pré-tratamentos com ácidos ou hidrotérmicos (CARVALHEIRO *et al.*, 2008). O NaOH provoca um inchaço no material aumentando a superfície interna de celulose e diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade de sua estrutura, o que provoca rompimento da cadeia de lignina. O NaOH é capaz de aumentar a digestibilidade de alguns materiais lignocelulósicos de 14% a 55%, reduzindo o percentual de lignina de 24–55% para 20% (CARVALHEIRO *et al.*, 2008, TAHERZADEH; KARIMI, 2008, KUMAR e WYMAN, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010).

Na Tabela 4.1, os resultados obtidos de celulose para CAB-OH em ambas as metodologias utilizadas são similares, entretanto os percentuais de hemicelulose e lignina são pouco diferentes. Embora ambos os protocolos não sejam específicos para caracterização de bagaço de caju, os resultados da análise composicional indicam que os protocolos do instituto NREL determinaram a composição de 98,64% do material CAB-OH. O protocolo de GOUVEIA *et al.* (2009), determinou somente 93,27%. Diante disso, as etapas subsequentes deste trabalho foram conduzidas de acordo com os resultados obtidos da caracterização segundo protocolos do instituto NREL.

4.2 Influência do pré-tratamento na estrutura do material (MEV)

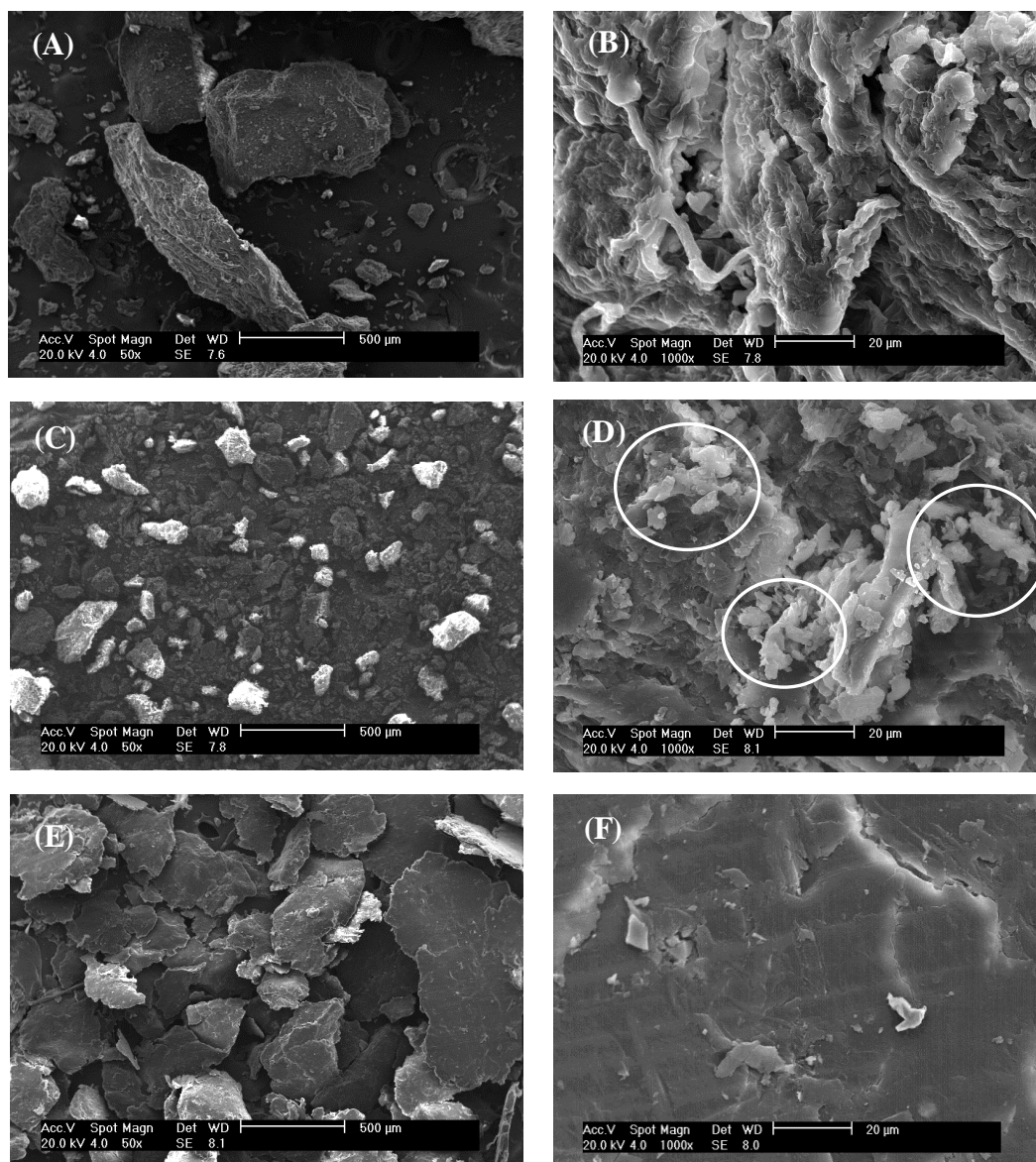


Figura 4.1 - Análise de CAB (A/B), CAB-H (C/D) e CAB-OH (E/F) por MEV (Microscopia eletrônica por varredura) na ampliação de 500x (A,C e E) e 1000x (B, D e F).

A Figura 4.1 apresenta os resultados da visualização dos materiais CAB, CAB-H e CAB-OH por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Como pode ser visualizada na Figura 4.1B, a superfície do bagaço de caju *in natura* apresenta-se de forma irregular e rugosa. Após o pré-tratamento ácido (Figura 4.1C/D), a superfície da estrutura apresenta uma aparência mais granular destacada pelos círculos em branco, podendo ser atribuído ao

rompimento parcial das estruturas de hemicelulose do lignocelulósico mantendo especialmente a lignina facilmente disponível ao ataque de álcalis. O efeito do pré-tratamento alcalino (Figura 4.1E/F) alterou expressivamente a estrutura do material, pois a solubilização de parte da lignina deixou a superfície do material uniforme e homogênea. Resultados similares de MEV após o pré-tratamento em micro-ondas com água seguido de álcali (NaOH) de uma gramínea (*Panicum virgatum*) foram obtidos por HU e WEN (2008). Os autores destacaram a presença de uma superfície granular no material após o uso de água em micro-ondas, que em seguida foi removida após o uso do NaOH combinado com micro-ondas.

4.3 Hidrólise enzimática do bagaço de caju com celulasas do complexo Celluclast 1.5L

A hidrólise enzimática de CAB-OH foi conduzida sem a suplementação de celobiasas, na temperatura de 45 °C com agitação de 150 rpm. A Figura 4.2 mostra os resultados da evolução da concentração de açúcares (Figura 4.2A) e da digestibilidade de celulose e hemicelulose (Figura 4.2B) do sólido CAB-OH com o tempo de hidrólise. Observa-se que a concentração de açúcares, exceto a celobiose, e a digestibilidade da celulose de CAB-OH são crescentes com o tempo de hidrólise, sendo o mesmo resultado observado em outros trabalhos da literatura para outros materiais como palha e farelo de milho, grama (*Cynodon dactylon* L.) e bagaço de cana-de-açúcar (UM *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; MAEDA *et al.*, 2011). Maiores concentrações de glicose e xilose foram obtidos após 96h de hidrólise; $10,80 \pm 0,12$ e $0,96 \pm 0,09$ g.L⁻¹, respectivamente.

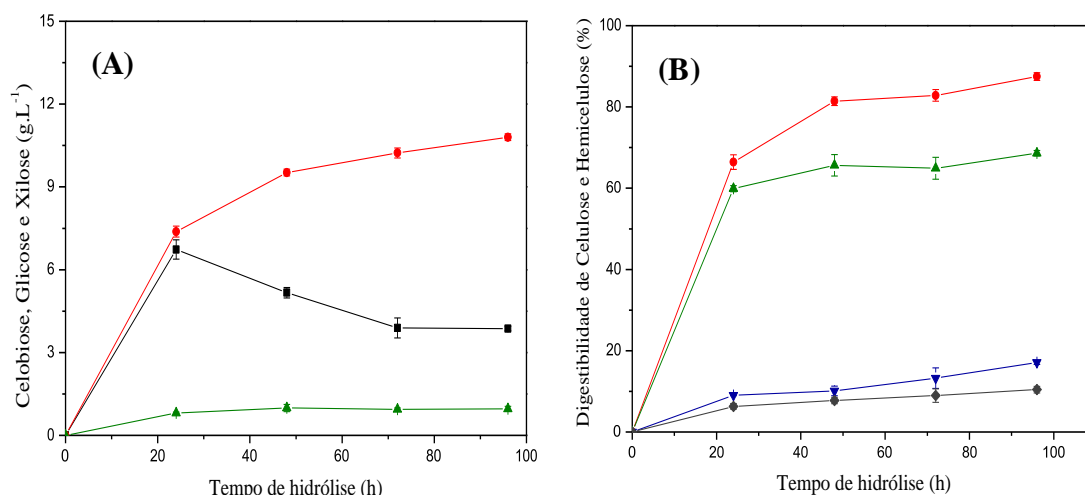


Figura 4.2 - Hidrólise enzimática de CAB-OH (celulose a 1% v/v) com Celluclast 1.5L (60 FPU/g_{celulose}) a 45 °C e 150 rpm. (A) Concentrações de glicose (●), celobiose (■) e xilose (▲). (B) Digestibilidade de celulose (●) e hemicelulose (▲) de CAB-OH. Digestibilidade de celulose de CAB *in natura* (▼) e CAB-H (◆) dos estudos de ROCHA, 2010.

Na Figura 4.2A, observa-se que a concentração de celobiose é máxima em 24h ($6,73 \pm 0,35 \text{ g.L}^{-1}$) e diminui até a concentração de $3,87 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$ em 96h de hidrólise enzimática. A redução da concentração de celobiose após 24h de hidrólise pode ser atribuída ao sinergismo das enzimas que hidrolisam a celulose, uma vez que é necessário inicialmente haver a hidrólise da celulose em celobiose pelas celobio-hidrolases para que as celobiasas atuem na conversão de celobiose em glicose. Por outro lado, o acúmulo de celobiose no decorrer do processo é resultado da deficiência de celobiasas que é observado na maioria dos complexos de celulasas comerciais, especialmente Celluclast 1.5L (MARTINS *et al.*, 2008; PIERRE *et al.*, 2011a,b). Para tanto, a maioria dos autores optou pela suplementação de celobiasas utilizando o complexo enzimático Novozymes 188. Neste trabalho, no complexo Celluclast 1.5L utilizado, a atividade de celobiasas era de 5,63 UCB/mL. A Figura 4.2B mostra que a maior digestibilidade de celulose foi de $87,48 \pm 0,96\%$, obtido em 96h de hidrólise enzimática. O controle, ou digestibilidade de celulose de CAB *in natura* nas mesmas condições de hidrólise que CAB-OH encontra-se na Figura 4.2B, resultado de ROCHA (2010). Observa-se que o pré-tratamento aumentou expressivamente a digestibilidade de celulose de 17% (CAB *in natura*) para 87% (CAB-OH). Ainda na Figura 4.2B, observa-se que a digestibilidade de CAB-H (ROCHA, 2010) foi inferior não somente aos resultados de

CAB-OH como também do controle. Nesse sentido, destaca-se a importância da remoção da lignina do bagaço para otimização das etapas posteriores de hidrólise, uma vez que de acordo com os resultados da Figura 4B, o pré-tratamento alcalino aumentou em 5 vezes a digestibilidade de CAB e em 9 vezes a digestibilidade de CAB-H.

A maior digestibilidade de hemicelulose obtida de CAB-OH foi de $68,60 \pm 0,68\%$ em 96h do processo. A hidrólise da hemicelulose observada pela presença de xilose no hidrolisado enzimático pode ser atribuído a presença de xilanases no complexo Celluclast 1.5L, fato constatado pela literatura (MARTINS *et al.*, 2008; ASK *et al.*, 2012; ESCARNOT *et al.*, 2012; RANA *et al.*, 2014), na qual os autores mencionaram atividade de xilanase de 680 a 1367,1 U/mL nos complexos comerciais de Celluclast 1.5L.

Baseado nos resultados de digestibilidade obtidos para CAB-OH, realizou-se a hidrólise enzimática do material com percentual de sólidos de 16% (m/v), equivalente a 11,5% (m/v) de celulose (ROCHA *et al.*, 2010) para obtenção de elevada concentração de glicose no hidrolisado. A partir do hidrolisado enzimático, realizou-se a diluição para concentração de glicose de 50 g.L^{-1} e avaliou-se o potencial de leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Hanseniaspora* em produzir etanol por processo SHF (Fermentação e Hidrólise Separadas).

4.4 Fermentação do hidrolisado enzimático de CAB-OH (Screening de leveduras produtoras de etanol)

A hidrólise enzimática de CAB-OH para a produção do hidrolisado enzimático foi conduzida utilizando a porcentagem de sólidos de 16% (m/v) equivalente a 11,5% (m/v) de celulose, Celluclast 1.5L a 60 FPU/g_{celulose}, 45 °C e 150 rpm por um período de 72h. Ao final da hidrólise enzimática, a concentração de glicose+xilose no hidrolisado era de $88,07 \pm 3,11 \text{ g.L}^{-1}$ e celobiose de $30,34 \pm 0,79 \text{ g.L}^{-1}$. Não foi identificada a presença de inibidores (ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural). O hidrolisado obtido para produção de etanol foi inicialmente diluído com água destilada para a concentração inicial de glicose+xilose de 50 g.L^{-1} .

Em relação ao crescimento microbiano, todas as leveduras estudadas apresentaram produção de biomassa pelo aumento da concentração durante o processo fermentativo (dados não apresentados). Maior produção de biomassa foi obtida após a fermentação do hidrolisado enzimático pelas leveduras *K. marxianus* ATCC36907 (12 g.L⁻¹) e *Saccharomyces* sp. 1238 (11 g.L⁻¹). As demais linhagens de *Saccharomyces* apresentaram uma concentração celular de 10 g.L⁻¹. As leveduras *K. marxianus* CE025, *K. marxianus* CCA510 e *Hanseniaspora* sp. GPBio03 apresentaram maior concentração de biomassa de 8 g.L⁻¹, o que ainda representa um aumento de 1,6-2,0 vezes o valor inicial da concentração de biomassa.

As Figuras 4.3A e 4.3B mostram os resultados do consumo de glicose e produção de etanol, respectivamente, após a fermentação do hidrolisado enzimático pelas cepas de *Kluyveromyces*. Observa-se que a espécie *K. marxianus* ATCC36907 foi a única levedura dentre as linhagens de *Kluyveromyces* que consumiu toda a glicose do hidrolisado enzimático, observado em 4h de fermentação, tempo em que se inicia a fase estacionária da levedura, com produção de etanol de 22,46 g.L⁻¹, produtividade de 5,15 g.L⁻¹.h⁻¹, fator de conversão de glicose em etanol de 0,39 e eficiência da fermentação de 76,32%. A literatura (TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2009; BRETHAUER; WYMAN, 2010; LANE e MORRISSEY *et al.*, 2010) tem demonstrado interesse em produzir etanol de leveduras termotolerantes como as espécies de *K. marxianus*. Essas leveduras apresentam rápido crescimento e produção de etanol em temperaturas na faixa de 40 – 50 °C sendo uma alternativa interessante para aplicação em processos de produção de etanol por SSF (Fermentação e Hidrólise Simultâneas). Dentre as vantagens de um processo conduzido a temperaturas mais elevadas, destacam-se a economia de energia obtida através da redução nos custos com sistemas de resfriamento, elevados rendimentos de hidrólise, produção contínua do biocombustível e significativa redução dos riscos de contaminação (LIMTONG *et al.*, 2007).

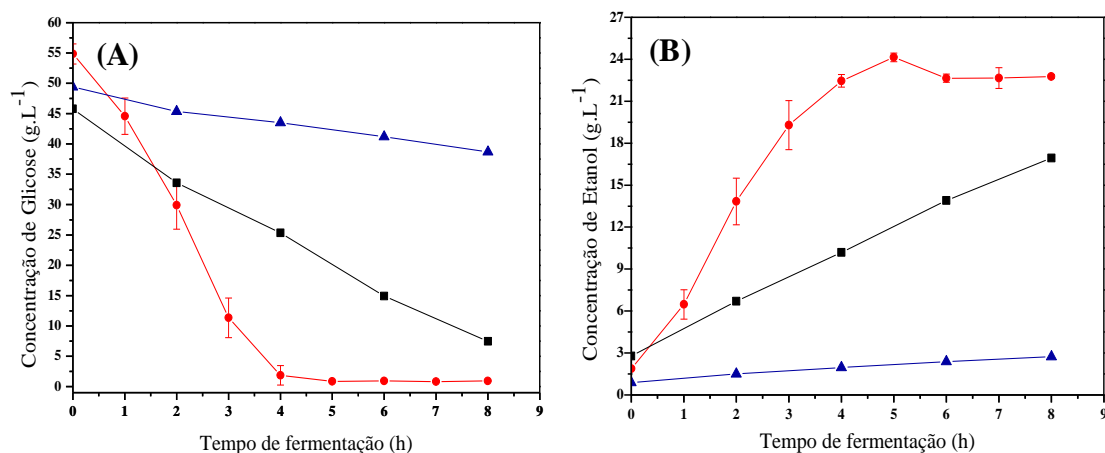


Figura 4.3 – Produção de etanol de diferentes linhagens de *Kluyveromyces marxianus*. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm. *K. marxianus* CE025 (■), ATCC36907 (●) e CCA510 (▲). Concentrações de (A) glicose e (B) etanol.

Nas Figuras 4.4A e 4.4B estão presentes os perfis de glicose e etanol obtidos após a fermentação do hidrolisado enzimático por cepas de *Saccharomyces*. De acordo com os resultados, com exceção da espécie *S. cerevisiae* CCA008, as demais leveduras consumiram toda a glicose do hidrolisado após 4h de fermentação. Maior concentração de etanol (23,40 g.L⁻¹) foi obtida no ensaio fermentativo utilizando a levedura *Saccharomyces* sp. 1238 em 4h de fermentação com produtividade de 5,53 g.L⁻¹.h⁻¹, fator de conversão de glicose em etanol de 0,40 g_{etanol}/g_{glicose} e eficiência da fermentação de 78,28%. Em outros estudos em que os autores submeteram a levedura *Saccharomyces* sp. 1238 a condições de temperatura superiores a 30 °C (WANDERLEY *et al.*, 2013), mostraram que a mesma apresenta potencial de produção de etanol a 34 °C, obtendo-se 23 g.L⁻¹ de etanol para concentração de glicose inicial de 59,7 g.L⁻¹, proveniente da hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar após pré-tratamento por explosão a vapor seguido de deslignificação com NaOH. Atualmente, a produção industrial de etanol emprega em sua maioria cepas de *S. cerevisiae* em temperaturas em torno de 35 °C. Por outro lado, linhagens de *K. marxianus* são leveduras termotolerantes capazes de fermentar até 52 °C (LIMTONG *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2010). Entretanto, algumas linhagens de *K. marxianus* podem apresentar concentrações de etanol e produtividade inferiores as espécies de *S. cerevisiae* na temperatura de 30 °C, o que não foi observado após a fermentação com a levedura *K. marxianus* ATCC36907 neste estudo.

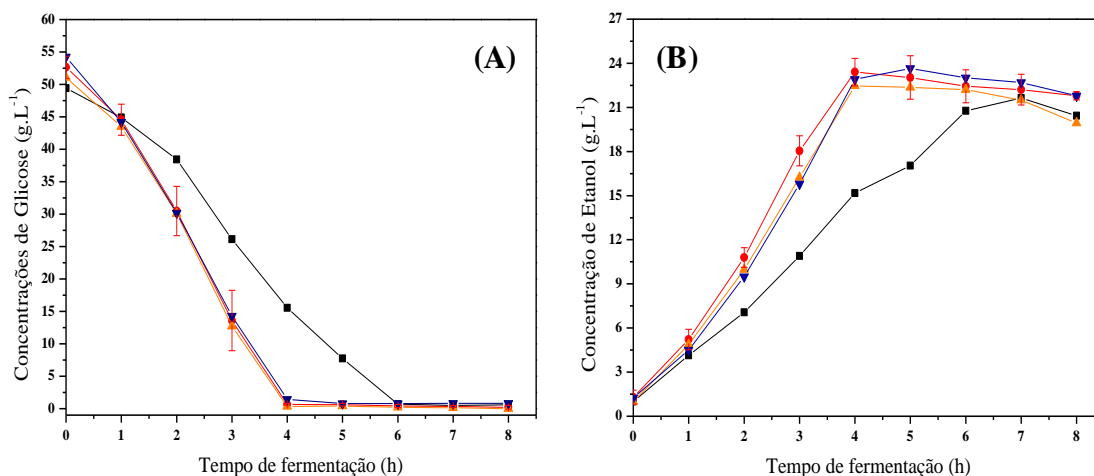


Figura 4.4 - Produção de etanol de diferentes espécies de *Saccharomyces*. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm. *S. cerevisiae* CCA008 (■), *S. cerevisiae* 01 (▲), *S. cerevisiae* 02 (▼) e *Saccharomyces* sp. 1238 (●). Concentrações de (A) glicose e (B) etanol.

A Figura 4.5 descreve os resultados de consumo de glicose e produção de etanol da levedura *Hanseniaspora* sp. GPBio03, levedura isolada da fermentação natural do suco de caju pelo grupo GPBio (DEQ-UFC, Ceará) em estudos anteriores. A maior concentração de etanol (24,54 g.L⁻¹) foi obtida após 3h de fermentação, com produtividade de 7,68 g.L⁻¹.h⁻¹. Nesse período, não havia mais glicose no meio hidrolisado enzimático de CAB-OH.

Em geral, o gênero *Hanseniaspora*, presente nos primeiros estágios da produção do vinho pela fermentação natural do suco de uva, apresenta tempo de crescimento limitado em função da sua baixa tolerância a elevadas concentrações de etanol. Espécies como *Hanseniaspora guilliermondii* e *Hanseniaspora uvarum* apresentam crescimento entre 4 e 6 dias de fermentação e em seguida morrem em grande parte como um resultado do aumento da concentração de etanol produzida por *S. cerevisiae*, que possui maior tolerância ao álcool. Geralmente, as espécies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* encontradas no suco de uva não são tolerantes em concentrações de etanol superiores a 4 e 7% (FLEET, 2003; JOLLY *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, nos estudos de PINA *et al.* (2004), *H. guilliermondii* NCYC2380 apresentou tolerância a etanol próxima a da espécie *S. cerevisiae*, quando submetida a condições de *stress* na presença de etanol na concentração de 22,5% (v/v). No presente trabalho, a concentração de etanol obtida (24,54 g.L⁻¹), equivalente a 2,45% (v/v), não foi o suficiente para inibir o crescimento celular de *Hanseniaspora* sp. GPBio03, pois foi observado produção de biomassa

até 4h de fermentação ($8,0 \text{ g.L}^{-1}$), condição em que não havia mais glicose no meio fermentativo.

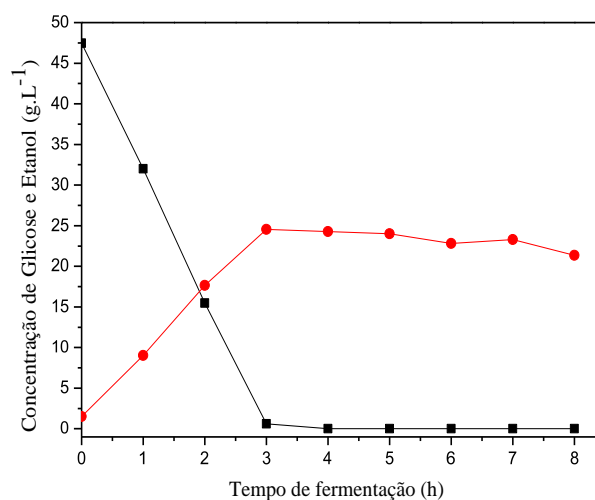


Figura 4.5 – Concentrações de glicose (■) e etanol (●) de *Hanseniaspora* sp. GPBio03 durante fermentação em hidrolisado enzimático de CAB-OH. Fermentação conduzida a 30°C e 150 rpm.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados de produtividade, rendimento e eficiência da produção de etanol de diferentes leveduras em hidrolisado enzimático de CAB-OH. Embora a levedura *S. cerevisiae* 02 tenha apresentado rendimento de etanol ($0,41 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$) similar ao da levedura *Saccharomyces* sp. 1238 ($0,40 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$), maior concentração de etanol ($23,40 \text{ g.L}^{-1}$) e produtividade ($5,59 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram obtidas pela *Saccharomyces* sp. 1238, levando a uma análise desses resultados em conjunto com os obtidos por *K. marxianus* ATCC36907 e *Hanseniaspora* sp. GPBio03.

Tabela 4.2 – Produtividade, rendimento e eficiência de produção de etanol da fermentação do hidrolisado enzimático por diferentes leveduras. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm.

Levedura	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ¹	Y _{E/G} (g _{etanol} /g _{glicose})	Eficiência (%)
<i>K. marxianus</i> ATCC36907	5,80	0,39	76,32
<i>K. marxianus</i> CE025	1,89	0,37	72,41
<i>K. marxianus</i> CCA510	0,28	0,18	35,23
<i>S. cerevisiae</i> CCA008	3,30	0,39	76,32
<i>S. cerevisiae</i> 01	5,08	0,40	78,27
<i>S. cerevisiae</i> 02	4,85	0,41	80,23
<i>Saccharomyces</i> sp. 1238	5,59	0,40	78,28
<i>Hanseniaspora</i> sp. GPBio03	7,68	0,41	80,23

¹Produtividade calculada em 3h de fermentação.

Nas Figuras 4.6A e 4.6B são apresentados os resultados para crescimento microbiano, consumo de glicose e produção de etanol de fermentação com as leveduras que apresentaram bom desempenho na produção de etanol em hidrolisado enzimático: *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907, *Saccharomyces* sp. 1238 e *Hanseniaspora* sp. GPBio03. Ao final do processo fermentativo, a levedura *Saccharomyces* sp. 1238 alcançou a maior concentração de biomassa ($11,87 \pm 0,61$ g.L⁻¹) dentre as leveduras anteriormente citadas. A levedura *K. marxianus* ATCC36907, apresentou maior concentração de biomassa 10,7 g.L⁻¹, enquanto que para a *Hanseniaspora* sp. GPBio03 obteve-se 8,87 g.L⁻¹ de biomassa no final do processo, apresentado perfil de crescimento inferior quando comparado ao das outras espécies estudadas. Para a *Hanseniaspora* sp. GPBio03, nas condições de cultivo estudadas, provavelmente a levedura tem preferência em produzir etanol, deslocando o metabolismo da via glicolítica para a produção do biocombustível.

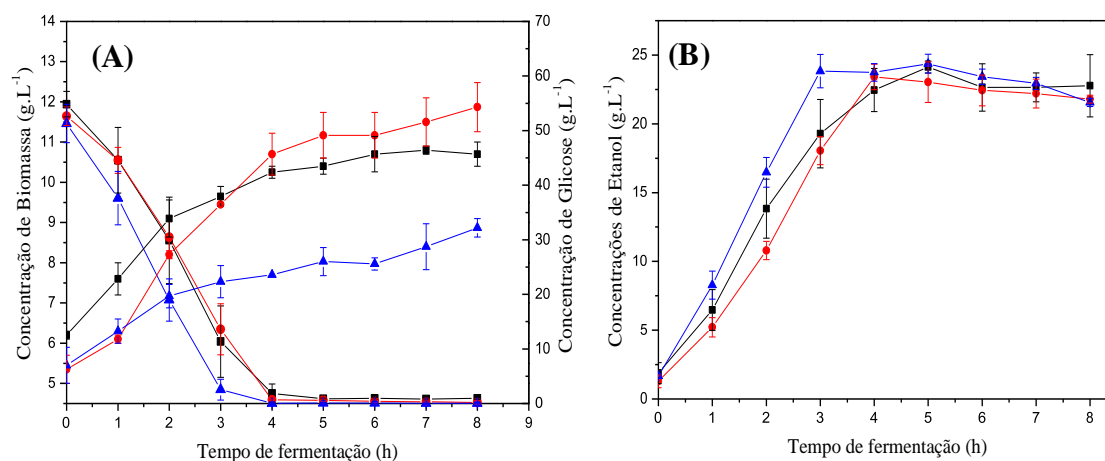


Figura 4.6 - Produção de biomassa, consumo de glicose (A) e produção de etanol (B) durante fermentação do hidrolisado enzimático de CAB-OH a 30 °C e 150 rpm. *K. marxianus* ATCC36907 (■), *Saccharomyces* sp. 1238 (●) e *Hanseniaspora* sp. GPBio03 (▲).

As leveduras estudadas apresentaram perfis semelhantes para a produção de etanol (Figura 4.6B), com maiores concentrações de etanol obtidas de $24,14 \pm 0,43$; $23,40 \pm 0,93$ e $24,37 \pm 0,68$ g.L⁻¹ com *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907, *Saccharomyces* sp. 1238 e *Hanseniaspora* sp. GPBio03, respectivamente. Contudo, a levedura *Hanseniaspora* sp. GPBio03 apresentou maior produtividade de 7,39 g.L⁻¹.h⁻¹ (Tabela 4.3) em 3h de fermentação. Os melhores resultados de eficiência (80,23%) e de conversão de glicose em etanol (0,41 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹) também foram obtidos com a levedura isolada do suco de caju. O valor do fator de conversão de glicose em etanol obtido pela *Saccharomyces* sp. 1238 (0,40 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹) foi muito semelhante ao obtido por WANDERLEY *et al.* (2013), 0,39 g_{etanol}.g_{glicose}⁻¹. Em relação a concentração de xilose, para as leveduras citadas, houve o acúmulo do açúcar durante a fermentação na concentração de $2,28 \pm 0,07$ g.L⁻¹, indicando que não se observou o seu consumo durante o processo.

Tabela 4.3 – Produtividade, eficiência e conversão de glicose em etanol da fermentação do hidrolisado enzimático com as leveduras *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907, e *Saccharomyces* sp. 1238 e *Hanseniaspora* sp. GPBio03. Fermentação conduzida a 30 °C e 150 rpm.

Levedura	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ¹	Y _{E/G} (g _{etanol} /g _{glicose})	Eficiência (%)
<i>K. marxianus</i> ATCC36907	5,80	0,39 ± 0,02	76,32 ± 0,03
<i>Hanseniaspora</i> sp. GPBio03	7,39	0,41 ± 0,01	80,23 ± 0,02
<i>Saccharomyces</i> sp. 1238	5,59	0,40 ± 0,01	78,28 ± 0,01

¹Produtividade calculada em 3h de fermentação.

Após a análise estatística dos resultados por ANOVA, no programa OriginPro versão 8.0; observa-se que para um nível de significância de 99,5%, os resultados dos rendimentos de etanol (Y_{E/G}) para as leveduras *K. marxianus* ATCC36907 e *Hanseniaspora* sp. GPBio03 não são significativamente diferentes.

De acordo com os resultados obtidos do estudo de diferentes leveduras (Figuras 4.4 a 4.7), e dos parâmetros da fermentação (Tabela 3.2), observa-se que a levedura *K. marxianus* ATCC36907 apresenta potencial de fermentação próximo ao de uma levedura do gênero de *Saccharomyces*. Diante disso, faz-se necessário um estudo da influência da temperatura na produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907, a fim de se avaliar posteriormente o potencial desta em processos SSF (Fermentação e Hidrólise Simultâneas).

4.5 Influência da temperatura na produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 em glicose PA e hidrolisado enzimático de bagaço de caju

A Figura 4.7 apresenta os resultados de concentração de biomassa e glicose obtidas durante a avaliação da temperatura no crescimento de *K. marxianus* ATCC36907 em glicose PA. Observa-se na Figura 4.7A, que houve aumento na concentração de biomassa para 8-9 g.L⁻¹ em relação a biomassa inicial (5 ± 1g.L⁻¹) em todas as temperaturas estudadas com 4 a 5 horas de fermentação. Os perfis semelhantes de biomassa em todas as temperaturas indicam que a faixa estudada (30-50 °C) não influenciou de forma expressiva no crescimento de *K.*

marxianus ATCC36907. Na Figura 4.7B, observa-se que o consumo de glicose foi influenciado pela variação de temperatura. A glicose esgotou em 5 horas de fermentação para as temperaturas de 30 e 35 °C, enquanto que o aumento da temperatura para 40, 45 e 50 °C favoreceu o metabolismo de glicose pela levedura, pois a fonte de carbono esgotou entre 3h e 4h de fermentação. Nesse contexto, vale ressaltar as vantagens da produção de etanol em elevadas temperaturas como a redução nos riscos de contaminação, redução do investimento com sistemas de resfriamento além da recuperação contínua do etanol (LIMTONG *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008).

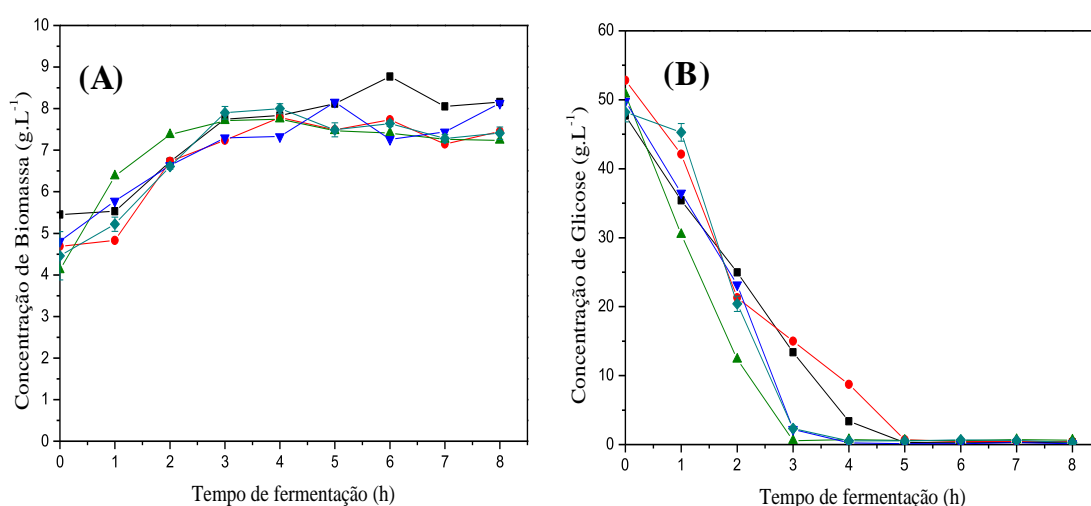


Figura 4.7 - Produção de biomassa (A) e consumo de glicose (B) do estudo da influência da temperatura na produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 a 150 rpm utilizando glicose PA. 30 °C (■), 35 °C (●), 40 °C (◆), 45 °C (▲) e 50 °C (▼).

Através dos resultados de biomassa, calculou-se o valor de $\mu_{\text{máx}}$ para em seguida aplicar a equação de Arrhenius linearizada (DORAN, 1995), e posteriormente estimar os valores da constante de frequência e da energia de ativação. Obtiveram-se os resultados de 40,45 para o fator de frequência e energia de ativação de 14499,62 J/mol. O coeficiente de linearidade obtido foi $R^2 = 0,927$. Em um estudo cinético de *K. marxianus* (REEVES, 2004), o autor avaliou a produção de etanol utilizando como fonte de carbono o resíduo do processamento de tomate. As temperaturas estudadas pelo trabalho foram semelhantes as desse estudo, 40 °C, 45 °C e 50 °C. O valor da energia de ativação obtida foi de 133,05 kJ.mol⁻¹, com coeficiente de linearidade de $R^2 = 0,893$. Esse resultado de energia de ativação superior ao obtido com os dados de *K. marxianus* ATCC36907, pode ser atribuído a

complexidade da matéria-prima utilizada pela literatura que possivelmente influenciou o crescimento da levedura quando comparado ao uso de glicose PA.

Na Figura 4.8 estão presentes os perfis de etanol após estudo da influência da temperatura. Observa-se que os perfis de etanol foram semelhantes, indicando que a levedura termotolerante é capaz de produzir etanol ($23,65 \text{ g.L}^{-1}$) a 50°C em 4h de fermentação. Nas demais temperaturas, a maior concentração de etanol obtida foi semelhante. Embora a variação de temperatura não tenha influenciado na máxima concentração de etanol, observa-se que a produtividade (ver Tabela 4.3) de etanol aumentou com o aumento de temperatura, passando de 4-5h ($30-35^\circ\text{C}$) para 3h de fermentação ($40-50^\circ\text{C}$). Destaca-se que a capacidade de termotolerância de linhagens de *K. marxianus* é atribuído a três fatores: modificação da estrutura dos ácidos graxos presentes na membrana celular, formação das proteínas de choque térmico (HSPs) e acúmulo de trealose nas células que contribuem para a resistência à temperatura em leveduras (BANAT *et al.*, 1998).

TOMÁS-PEJÓ *et al.* (2009) realizaram o estudo de temperatura de *K. marxianus* CECT10875 de $40-44^\circ\text{C}$ em meio sintético com glicose PA suplementado com 5 g.L^{-1} de extrato de levedura e sais. Os autores observaram que dentro da faixa de temperatura estudada, a mesma não influenciou significativamente a produção de etanol, obtendo-se máxima concentração de etanol no intervalo de $21-22 \text{ g.L}^{-1}$ com rendimento de etanol de 86%. Diante disso, observa-se que os resultados obtidos por esse autores corroboram com os obtidos neste estudo para linhagens distintas de *K. marxianus*.

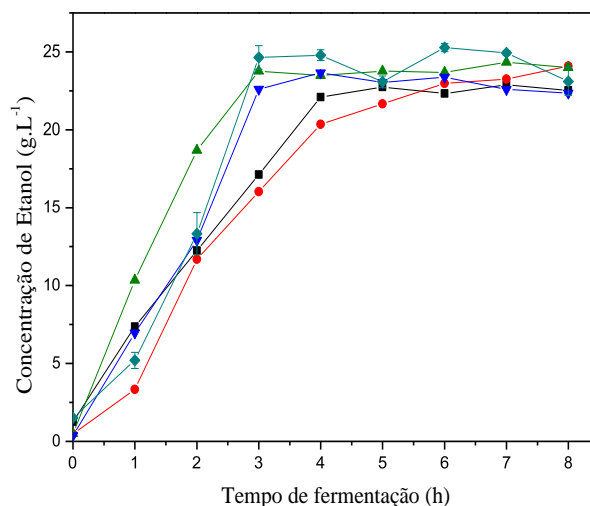


Figura 4.8 - Produção de etanol do estudo da influência da temperatura no crescimento de *K. marxianus* ATCC36907 a 150 rpm em meio com glicose PA. 30 °C (■), 35 °C (●), 40 °C (◆), 45 °C (▲) e 50 °C (▼).

A Tabela 4.4 apresenta os resultados da estimativa dos parâmetros cinéticos da fermentação com a variação da temperatura. Os valores de $Y_{E/G}$ calculados indicam que para a faixa de temperatura estudada (30-50 °C), não houve variação expressiva nos valores de conversão (0,45-0,46), assim como nos valores de eficiência da fermentação (88-90%). Contudo, houve variação na produtividade de etanol, sendo o máximo valor obtido a 40 °C, 8,21 g.L⁻¹.h⁻¹ em 3h de fermentação.

Tabela 4.4 - Produtividade, eficiência e conversão de glicose em etanol do estudo da influência da temperatura na produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 a 150 rpm.

Temperatura	$Y_{E/G}$ (g _{etanol} /g _{glicose})	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ¹	Eficiência (%)
30 °C	0,45	5,29	88%
35 °C	0,45	5,18	88%
40 °C	0,46	7,71	90%
45 °C	0,46	7,75	90%
50 °C	0,45	7,41	88%

¹Produtividade calculada em 3h de fermentação.

Na Figura 4.9 estão os resultados de velocidades específicas de consumo de glicose (μ_S) e produção de biomassa (μ_X) e etanol (μ_P) para as temperaturas de 30 a 50 °C em glicose PA. Em todas as temperaturas estudadas, verifica-se que os perfis das velocidades para biomassa, glicose e etanol apresentam mesma tendência de metabolismo primário, o que é esperado para fermentação alcoólica. Em relação à variação da temperatura, verifica-se para o crescimento celular (μ_X), que as maiores velocidades específicas foram obtidas a 40 °C. Para a velocidade específica de produção de etanol (μ_P), o aumento da temperatura de 30 a 45 °C favorece no aumento do valor da velocidade específica máxima, de 1,12 h⁻¹ a 30 °C para 2,05 h⁻¹ a 45 °C, sendo nesta temperatura o maior valor obtido de $\mu_S = 4,23$ h⁻¹.

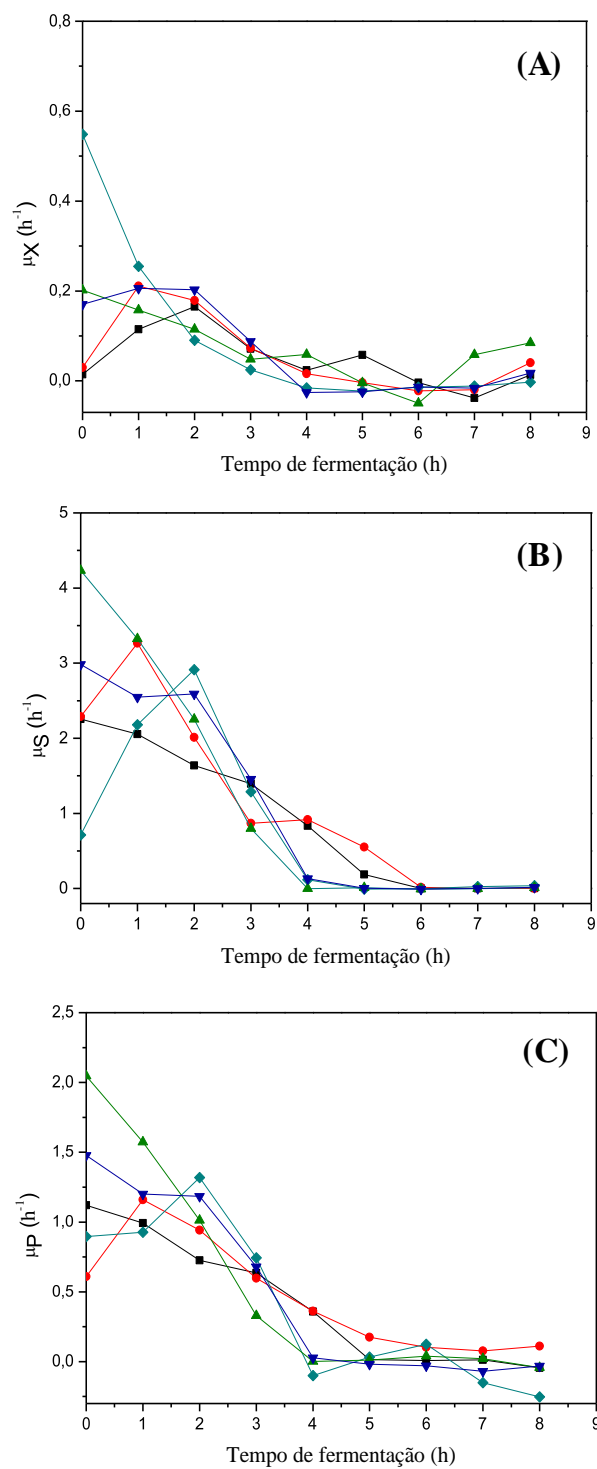


Figura 4.9 - Velocidades específicas para a produção de biomassa (A), consumo de glicose (B) e formação de etanol (C) no estudo da influência da temperatura na produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 em glicose PA. 30 °C (■), 35 °C (●), 40 °C (◆), 45 °C (▲) e 50 °C (▼).

Com base nos resultados do estudo da temperatura, avaliou-se o crescimento e produção de etanol utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC36907 em hidrolisado enzimático de CAB-OH nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C. A Figura 4.10A mostra os resultados de crescimento e consumo de glicose. Observa-se que houve maior produção de biomassa na temperatura de 30 °C, em relação às temperaturas de 40 e 50 °C.

Os perfis de consumo de glicose mostram que assim como para a glicose PA, no hidrolisado enzimático a glicose esgotou em 5 horas de fermentação a 30 °C, enquanto que nas temperaturas de 40 e 50 °C, em 4 e 3h não havia mais glicose no meio fermentativo, respectivamente.

A Figura 4.10B apresenta os resultados para concentração de etanol e produtividade obtidos do processo fermentativo a 30, 40 e 50 °C em hidrolisado enzimático. A máxima concentração de etanol obtida foi de 24,14 g.L⁻¹ para a temperatura de 30 °C em 5h de fermentação, o que corresponde a uma produtividade de 4,45 g.L⁻¹.h⁻¹. A 40 °C, a concentração de etanol e produtividade obtidos foram de 24,76 g.L⁻¹ e 7,83 g.L⁻¹.h⁻¹ em 3h, respectivamente. Na temperatura de 50 °C, também em 3h de fermentação, a concentração de etanol foi de 23,22 g.L⁻¹ e produtividade de 7,23 g.L⁻¹.h⁻¹. O aumento da temperatura resultou no aumento da produtividade de etanol, sendo a máxima obtida em 1h de processo a 40 °C (10,77 g.L⁻¹.h⁻¹), enquanto que a 30 °C, a máxima produtividade obtida foi de 5,98 g.L⁻¹.h⁻¹. O aumento da temperatura proporcionou um acréscimo no valor da conversão de glicose em etanol, que aumentou de 0,39 a 30 °C para 0,43 na temperatura de 40 °C.

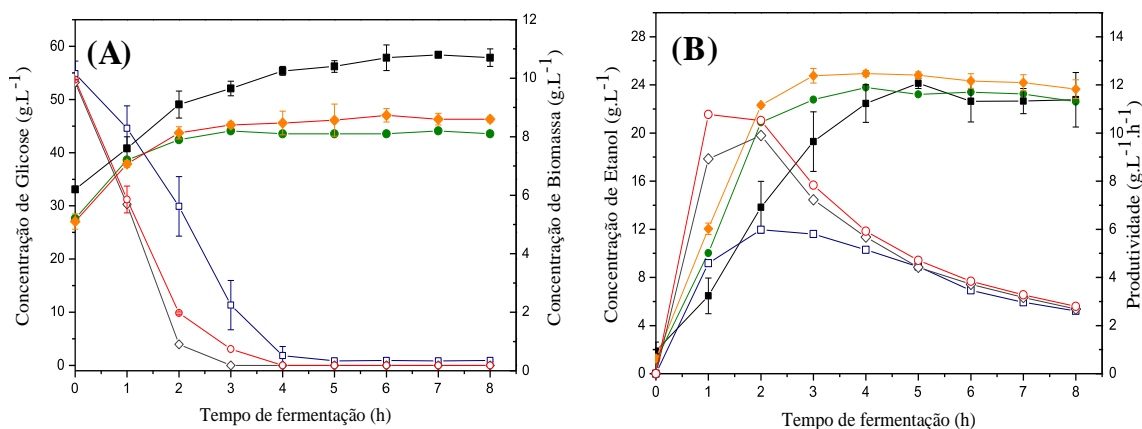


Figura 4.10 - Perfis de biomassa e glicose (A), concentração e produtividade de etanol (B) de *K. marxianus* ATCC36907 em hidrolisado enzimático de CAB-OH a 150 rpm. Em (A), biomassa a 30 °C (■) 40 °C (◆) e 50 °C (●) e glicose a 30 °C (□), 40 °C (○) e 50 °C (◇). Em (B), concentração de etanol a 30 °C (■), 40 °C (◆) e 50 °C (●) e produtividade a 30 °C (□), 40 °C (○) e 50 °C (◇).

Na compreensão do processo de tolerância de *K. marxianus* a etanol, os fosfolipídios presente na membrana plasmática podem desempenhar uma função importante no mecanismo de tolerância, pois o etanol é capaz de alterar a polaridade da membrana comprometendo o crescimento celular, inibir a atividade de algumas ATPases e/ou atuar na inibição do sistema de transporte da fonte de carbono pela membrana (BANAT, 1998).

ROCHA *et al.* (2011), avaliaram a influência da temperatura (30 a 40 °C) na produção de etanol de *K. marxianus* CE025 em hidrolisado ácido de bagaço de caju com concentração inicial de açúcares (glicose + xilose) de 53 g.L⁻¹. De acordo com os autores, os melhores resultados para etanol foram obtidos a 30 °C, com maior concentração de etanol de 12,36 g.L⁻¹, produtividade e conversão de 0,257 e 0,417, respectivamente. Quando comparados com os resultados obtidos neste trabalho, observa-se maior potencial termotolerante de *K. marxianus* ATCC36907 para posteriores estudos de SSF.

GARCÍA-APARICIO *et al.* (2011) estudaram a produção de etanol de *K. marxianus* CECT10875 em processos de SHF e SSF utilizando *barley straw* como substrato. No processo SHF, a 42 °C, os autores obtiveram maior concentração de etanol de 23 g.L⁻¹ após 72h para uma concentração de glicose inicial de 56,4 g.L⁻¹. Nesse caso, a concentração de etanol obtida pelos autores foi muito similar ao obtida neste trabalho para mesma concentração de glicose inicial. Ao avaliarem o processo SSF, a concentração de etanol aumentou para 29 g.L⁻¹.

Nos estudos de LIMTONG *et al.* (2007), os autores avaliaram a produção de etanol de varias linhagens de *K. marxianus* em meio de caldo de cana-de-açúcar nas temperaturas de 30-45 °C. Os autores destacaram que a espécie *K. marxianus* DMKU3-1042 obteve rendimento de etanol de 77,5% a 37 °C, respectivamente. Os valores de rendimento de etanol do referido estudo são similares aos obtidos neste trabalho, 76,3% (30 °C) e 82,4% (50 °C).

A Figura 4.11 apresenta os resultados de velocidades específicas de consumo de glicose (μ_s) e produção de biomassa (μ_x) e etanol (μ_p) para as temperaturas de 30, 40 e 50 °C em hidrolisado enzimático de bagaço de caju. Para as temperaturas estudadas, observa-se que as velocidades apresentam o mesmo perfil indicando que o etanol obtido por fermentação é metabólito primário. Observa-se na Figura 4.11 que a temperatura contribuiu para o aumento das velocidades com o tempo, ou seja, a produção de etanol foi favorecida pelo aumento da temperatura de 30 para 50 °C.

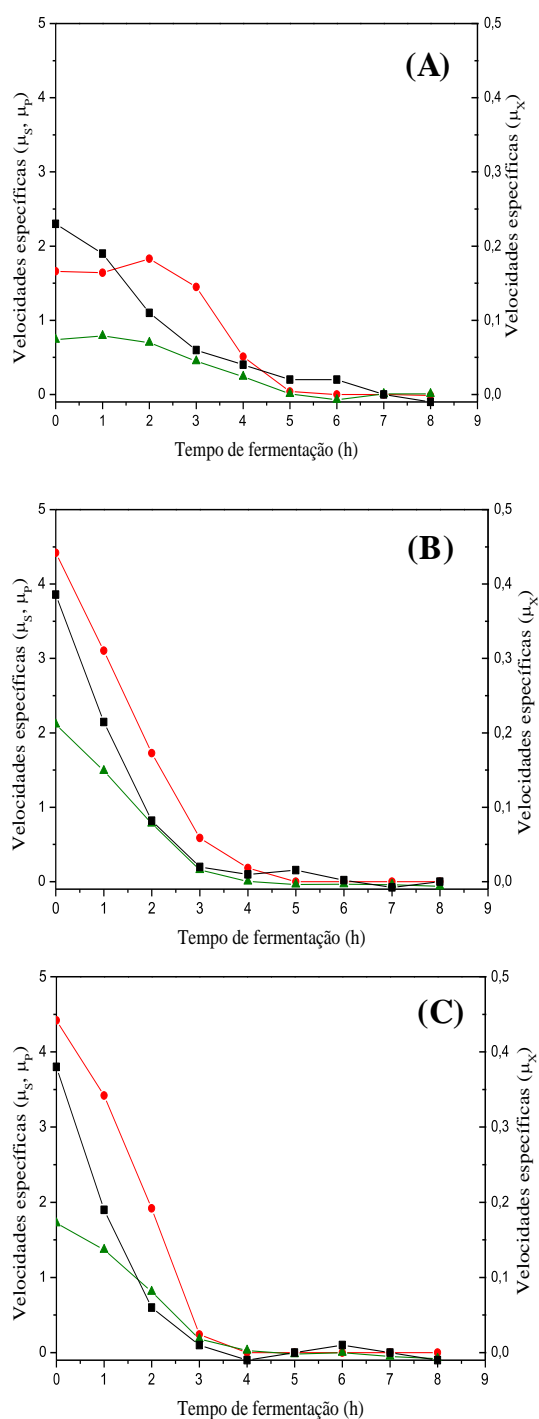


Figura 4.11 - Velocidades específicas para a produção de biomassa, etanol e consumo de glicose de *K. marxianus* ATCC36907 em hidrolisado enzimático de bagaço de caju a 150 rpm e 30 °C (A), 40 °C (B) e 50 °C (C). μ_X (■) μ_S (●) e μ_P (▲) em h^{-1} .

4.6 Produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 por Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) a 40 °C utilizando Celluclast 1.5L e CAB-OH como substrato

Com base nos resultados do estudo da temperatura para SHF, selecionou-se a temperatura de 40 °C para estudos de SSF de *K. marxianus* ATCC36907 nas seguintes condições: 15 FPU/g_{celulose} de CAB-OH, celulose a 7,5% (m/v), 5 g.L⁻¹ de células a 40 °C e 150 rpm. A Figura 4.12 apresenta os resultados da concentração de etanol e açúcares (glicose, celobiose e xilose).

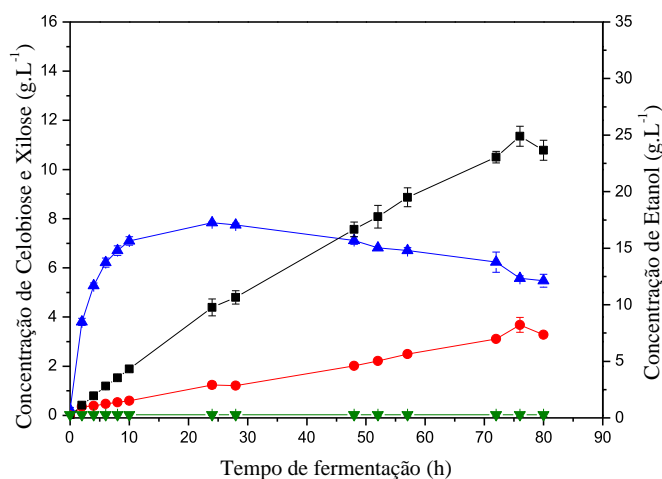


Figura 4.12 - Produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 por SSF de CAB-OH com Celluclast 1.5L a 15 FPU/g_{celulose}; 7,5% (m/v) de celulose (10% m/v de CAB-OH), a 40 °C e 150 rpm. Etanol (■), glicose (▼), celobiose (▲) e xilose (●).

Observa-se na Figura 4.12, que a maior concentração de etanol ($24,90 \pm 0,89$ g.L⁻¹) foi obtida após 76h de fermentação, com produtividade correspondente de $0,33$ g.L⁻¹.h⁻¹. Não houve acúmulo de glicose durante o processo, por outro lado, observa-se que a concentração de celobiose ($7,83 \pm 0,03$ g.L⁻¹) é máxima em 24h de fermentação, e em 80h, a concentração decresce para $5,48 \pm 0,27$ g.L⁻¹. O acúmulo de celobiose pode ser atribuído à ausência de suplementação de celobiase, uma vez que essa enzima é deficiente no complexo comercial Celluclast 1.5L (5,63 UCB/mL). O excesso de celobiose no hidrolisado enzimático pode ter afetado a conversão de celulose em glicose e por consequência, influenciou

negativamente os resultados de conversão de glicose em etanol ($Y'_{E/G} = 0,34$) e rendimento de etanol ($\eta' = 66,30\%$). A concentração de xilose aumentou durante o processo, obtendo-se $3,28 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ após 80h de SSF. Em relação à inibição da celulase por celobiose, a literatura (GRUNO *et al.*, 2004) descreve que essa inibição é de natureza competitiva, ou seja, glicose e celobiose competem pelo mesmo sítio ativo da celulase. Sendo os complexos de celulases formados por celobio-hidrolases, endoglucanases e β -glicosidases, os autores verificaram que maior é o efeito de inibição por celobiose observado nas celobio-hidrolases do que nas endoglucanases, obtendo-se valores de constante de inibição de 1,6 mM e 11 mM, respectivamente. Nesse caso, foi observado perda de 50% da atividade relativa de cada enzima nas concentrações de celobiose de 2,5 mM e 20 mM, respectivamente (GRUNO *et al.*, 2004).

Na produção de etanol de segunda geração, o processo SSF é geralmente preferido, pois requer menos investimento. Outra razão significativa para a utilização desse processo é a redução da inibição de celulase por glicose, o que favorece a hidrólise enzimática e produção de etanol (HAQUE *et al.* 2013).

LINDE *et al.* (2008) estudaram a SSF de palha de trigo pré-tratada com ácido sulfúrico com percentual de sólidos de 5% (m/m) e *S. cerevisiae* a 35 °C. Os autores variaram a atividade enzimática de Celluclast 1.5L (3, 6, 12 e 14 FPU/g_{sólidos}) e Novozymes 188 (3, 7, 15 e 17 UI/g_{sólidos}). Após 72h de fermentação, a maior concentração de etanol obtida foi de $11,7 \text{ g.L}^{-1}$ a 14 FPU/g_{sólidos}. Nesse caso, a produtividade foi de $0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Embora os autores tenham suplementado o processo com celobiasas, a concentração de etanol e produtividade obtidos foram inferiores ao deste estudo, talvez pela baixa concentração de celulose inicial utilizada pelos autores.

GARCÍA-APARICIO *et al.* (2011) estudaram o potencial de palha de cevada para produção de etanol por SSF de *Kluyveromyces marxianus* CECT10875 a 42 °C utilizando Celluclast 1.5L (7 FPU/g_{sólidos}) e Novozymes 188 (8,4 UI/g_{sólidos}) além da suplementação com xilanase (72 UI/g_{sólidos}) e concentração inicial do lignocelulósico de 15% (m/v). A maior concentração de etanol ($29,4 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida após 72h de processo, resultado um pouco maior do que o obtido com CAB-OH. De acordo com o percentual de glucanas no lignocelulósico (37,1%), a atividade de celulase utilizada corresponde a aproximadamente 18 FPU/g_{celulose}, atividade similar à utilizada neste estudo.

SURYAWATI *et al.* (2009) avaliaram a produção de etanol por SSF de uma gramínea (*Panicum virgatum* var. Kanlow) perene de estação quente presente em Oklahoma (E.U.A) após pré-tratamento por hidrotermólise. As condições de SSF incluíram a utilização de *Kluyveromyces marxianus* IMB4, atividade enzimática de 15 FPU/g_{celulose} de celulases de Fibrilase (Ottawa, Canadá) a 45 °C. Os autores obtiveram maior concentração de etanol de 16,8 g.L⁻¹ após 72h de processo, e produtividade de 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹.

4.7 Estudo da hidrólise enzimática de CAB-OH com diferentes complexos enzimáticos com vistas ao aumento da produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907

Segundo os dados de concentração de celobiose na Figura 4.13, o acúmulo de celobiose (5,48 – 7,83 g.L⁻¹) no processo SSF de *K. marxianus* ATCC36907 é resultado da deficiência da enzima celobiase no complexo enzimático Celluclast 1.5L. Diante disso, para melhorar a hidrólise de CAB-OH e os rendimentos de etanol, faz-se necessário o estudo de outros complexos enzimáticos ou a combinação deles que minimizem o acúmulo de celobiose favorecendo a formação de glicose. A Tabela 4.5 apresenta a caracterização dos complexos enzimáticos da Novozymes em termos de concentração de proteínas e atividade enzimática.

Tabela 4.5 – Caracterização dos complexos enzimáticos utilizados nesse trabalho para a hidrólise enzimática de CAB-OH.

Enzima	Proteínas (mg/mL)	Atividade de celulase (FPU/mL)	Atividade de CMCase (U _{CMC} /mL)	Atividade de celobiase (UCB/mL)
Celluclast 1.5L	21,93	128,94	21,54	5,63
Celulase NS 22074	28,47	108,12	19,53	243,68
Celobiase NS 50010	28,29	-	-	384,28

Observa-se na Tabela 4.5 que embora os complexos de celulases apresentem atividade de celulases similares, o complexo NS 22074 possui atividade de celobiase 43 vezes superior em relação ao complexo Celluclast 1.5L.

Na Figura 4.13, estão presentes os resultados de digestibilidade de celulose e hemicelulose após hidrólise enzimática de CAB-OH com Celluclast 1.5L e celulase NS 22074, ambos complexos de celulases da Novozymes nas mesmas condições de hidrólise (60 FPU/g_{celulose} a 45 °C e 150 rpm).

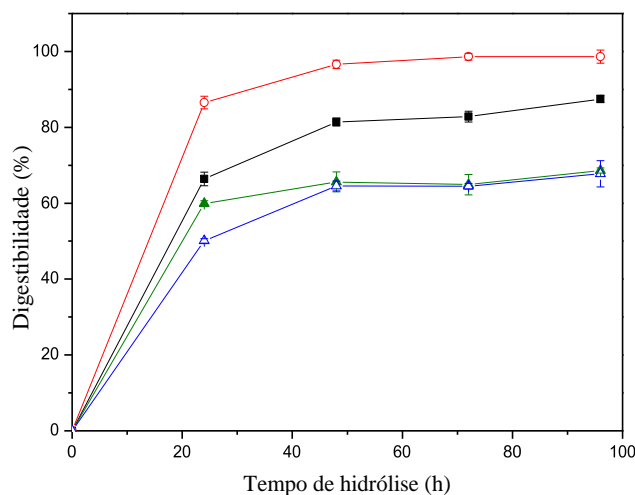


Figura 4.13– Digestibilidade de celulose e hemicelulose após a hidrólise enzimática de CAB-OH (1% m/v de celulose) com celulases de Celluclast 1.5L e NS 22074 a 60FPU/g_{celulose} a 45 °C e 150 rpm. Digestibilidade de celulose (●) e hemicelulose (▲) após hidrólise com o complexo Celluclast 1.5L. Digestibilidade de celulose (○) e hemicelulose (△) após o uso do complexo de celulases NS 22074.

De acordo com os resultados na Figura 4.13, o complexo NS 22074 apresentou maiores rendimentos de glicose, ou seja, maior foi a digestibilidade de celulose durante todo o processo de hidrólise em relação ao complexo de celulases Celluclast 1.5L. Ao final das 96h de hidrólise, a digestibilidade de celulose foi de $98,62 \pm 1,73\%$ utilizando o complexo NS 22074 e $87,48 \pm 0,96\%$ para Celluclast 1.5L. Não foi observada presença de celobiose para a hidrólise com NS 22074, enquanto que $3,87 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$ de celobiose foram quantificados após 96h de hidrólise utilizando Celluclast 1.5L (Figura 4.2). Esse resultado pode ser atribuído a grande diferença em relação à atividade de celobiase nos complexos de celulases. Ao final da hidrólise para NS 22074, a concentração de glicose obtida foi de $12,37 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$. Os perfis de rendimento de xilose para ambas as enzimas foram semelhantes, sendo os complexos de celulases NS 22074 e Celluclast 1.5L desenvolvidos pela Novozymes, ambos devem possuir atividades de xilanases semelhantes.

Contudo, visando aumentar a produção de etanol em estudos posteriores de SSF, realizou-se a avaliação da variação da atividade de celulase da enzima NS 22074 com e sem suplementação de celobiose NS 50010 na hidrólise enzimática de CAB-OH.

Na Figura 4.14 estão os resultados de digestibilidade de CAB-OH após variação da atividade de celulase NS 22074 (0-100 FPU/g_{celulose}) com suplementação de celobiase NS 50010 (60 UCB/g de celulose) na hidrólise enzimática de CAB-OH. A suplementação de celobiase foi necessária para evitar o acúmulo de celobiose e a eliminação dos seus possíveis efeitos de inibição especialmente em baixos valores de atividade de celulase. Observa-se que o aumento da atividade favorece a hidrólise de CAB-OH pelo aumento da digestibilidade do material. A variação do tempo de hidrólise não influenciou nos rendimentos de glicose após 48h, pois os perfis de hidrólise em 48 e 72h estão quase sobrepostos. Após 72h de hidrólise; $93,77 \pm 2,72\%$ de glicose foram obtidos a 30 FPU/g_{celulose}, $98,00 \pm 1,44\%$ a 50 FPU/g_{celulose}, resultado próximo ao obtido a 100 FPU/g_{celulose} ($98,00 \pm 2,99\%$). Embora se tenha obtido resultado pouco inferior ao utilizar a atividade de 30 FPU/g_{celulose}, nessa condição menos volume de enzima foi utilizado em relação às atividades de 50 e 100 FPU/g_{celulose}, resultado promissor do ponto de vista da economia do investimento desse suprimento. Celobiose não foi identificada durante o processo de hidrólise de CAB-OH.

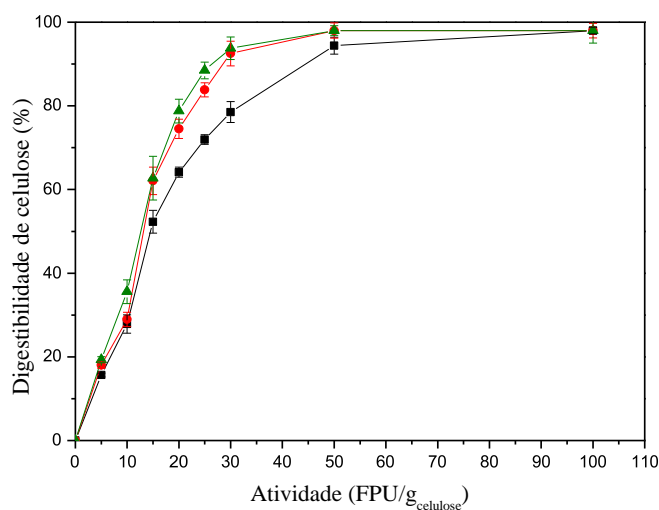


Figura 4.14 – Digestibilidade de celulose de CAB-OH após a variação da atividade de celulase NS 22074 com suplementação de 60 UCB/g de celobiase NS 50010. Digestibilidade em 24h (■), 48h (●) e 72h (▲). Hidrólise enzimática realizada a 45 °C e 150rpm.

ZHANG *et al.* (2010) realizaram a otimização da hidrólise enzimática de sabugo de milho utilizando complexos de celulase, celobiase, xilanase e pectinase. A variação da celulase (Spezyme CP) foi conduzida na faixa de concentração de proteínas de 1,5 – 30 mg/g_{celulose}, equivalente a 5 – 100 FPU/g_{celulose}, com adição de celobiase (Novozyme 188) na concentração de 2,9 mg/g_{celulose} (60 UCB/g_{celulose}) para a eliminação de inibição da celulase. Segundo os autores, a digestibilidade da celulose está diretamente ligada a atividade de celulase. Os autores obtiveram maiores rendimentos de glicose e xilose de 93,3% e 82,1%, respectivamente a 15 mg/g_{celulose} (50 FPU/g_{celulose}). Resultados similares de rendimentos de glicose foram obtidos neste trabalho com menor atividade enzimática inicial de 30 FPU/g_{celulose}.

HAQUE *et al.* (2013) obtiveram rendimento de açúcares redutores de 73 e 87% após 72h de hidrólise enzimática de *Miscanthus sinensis* pré-tratado com NaOH de 2,0 e 2,5% (m/v), respectivamente. A concentração de sólidos utilizada foi de 1% (m/v). Os autores utilizaram os mesmos complexos enzimáticos de celulasas (NS 22074) e celobiasas (NS 50010), os referidos resultados de rendimento foram obtidos a 15 FPU/g_{sólidos}, com suplementação de celobiasas (30 UI/g_{sólidos}). No caso deste estudo, para a hidrólise de CAB-OH, a 15 FPU/g_{celulose}, a digestibilidade de celulose e hemicelulose obtidas após 72h foram 62,73 e 44,95%, respectivamente.

A Figura 4.15 apresenta os resultados de digestibilidade de hemicelulose após variação da atividade de celulasas de NS 22074. O aumento na atividade de celulase contribuiu para o aumento no rendimento de xilose, o que é observado por outros autores na literatura (ZHANG *et al.* 2010; WANG *et al.* 2010; WANG *et al.* 2012. Melhores resultados foram obtidos após 72h de hidrólise a 50 FPU/g_{celulose} ($72,91 \pm 1,10\%$) e 100 FPU/g_{celulose} ($76,32 \pm 1,20\%$). A 30 FPU/g_{celulose}, a digestibilidade foi de $65,73 \pm 1,78\%$.

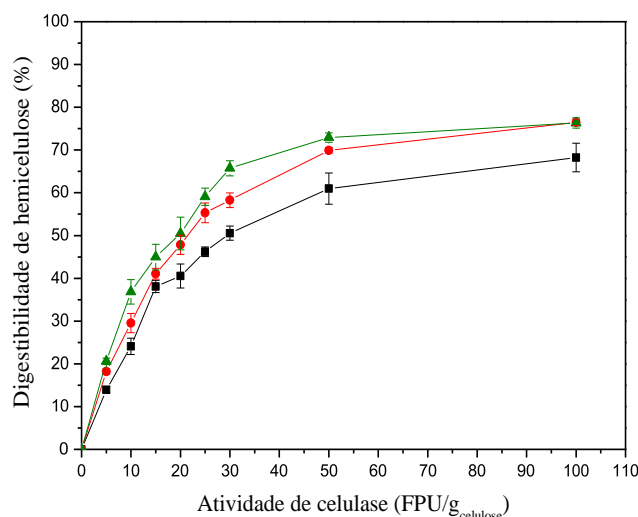


Figura 4.15 – Digestibilidade de hemicelulose de CAB-OH da variação da atividade de celulase NS 22074 com suplementação de 60 UCB/g de celobiase NS 50010. Digestibilidade após 24h (■), 48h (●) e 72h (▲). Hidrólise enzimática realizada a 45 °C e 150rpm.

Para a avaliação da influência da celobiase na hidrólise de CAB-OH, variou-se a atividade desta enzima mantendo a atividade de celulase NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose}, pois a referida atividade proporcionou bons resultados de hidrólise com menor quantidade de enzima quando comparados aos resultados obtidos em 50 e 100 FPU/g_{celulose} e os resultados encontram-se na Figura 4.16.

Dentro da faixa estudada (0 - 100 UCB/g_{celulose}), a suplementação da enzima não apresentou influência na digestibilidade, e celobiose não foi identificada durante o processo de hidrólise, especialmente no controle (sem adição de celobiase). Vale destacar que o volume de enzima para a atividade de celulase de 30 FPU/g_{celulose} do complexo NS 22074, corresponde a atividade de celobiase em torno de 60 UCB/g_{celulose}, condição recomendada pela literatura (SELIG *et al.*, 2008) para evitar a inibição de celulase por celobiasas. Em relação aos estudos de ZHANG *et al.* (2010), os autores variaram a concentração de proteínas da celobiase (0 – 4,8 mg/g_{celulose}), equivalente a 5 – 100 UCB/g_{celulose} e observaram que sem a suplementação de celobiase a concentração de celobiose no hidrolisado era de 0,6 mg.mL⁻¹, com a queda no rendimento de glicose (digestibilidade) de 80,2% (60 UCB/g_{celulose}) para 57,1%, indicando acúmulo e possivelmente inibição pela presença de celobiose, fato que não foi observado nesse estudo.

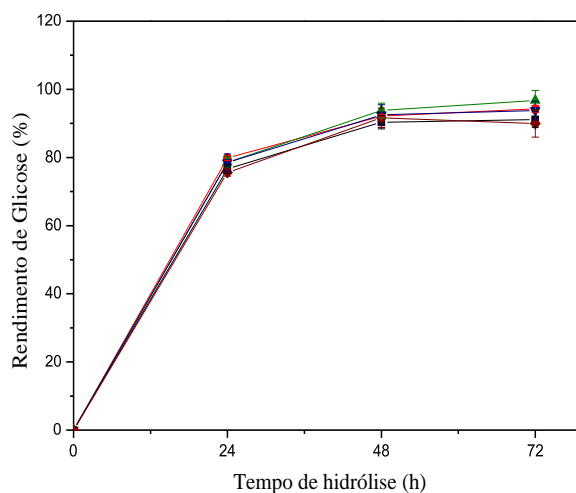


Figura 4.16 – Digestibilidade de celulose de CAB-OH da variação da atividade de celobiose NS 50010 e celulase NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose}. Digestibilidade sem adição de celobiose (controle) (■), 10 UCB/g (●), 30 UCB/g (▲), 60 UCB/g (▼), 100 UCB/g (◆). Hidrólise realizada a 45 °C e 150rpm.

Os resultados de hidrólise enzimática mostraram que a atividade de celulase NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose} sem suplementação de celobiose é uma condição promissora para estudos de SSF. Entretanto, a temperatura em processo SSF é parâmetro crucial para o crescimento microbiano e conversão da glicose em etanol. Como esse processo requer mais tempo para a conversão de glicose em etanol, o comportamento do crescimento celular e produção de etanol podem ser influenciados pelo tempo em que as células estão expostas a uma determinada temperatura e concentração de etanol. Segundo a literatura, linhagens de *K. marxianus* são capazes de produzir etanol em temperaturas acima de 40 °C, podendo apresentar crescimento celular máximo a 47 °C, 49 °C ou até mesmo a 52 °C (FONSECA *et al.*, 2008) dependendo da linhagem. Outro aspecto a ser mencionado, é a tolerância a etanol de algumas linhagens de *K. marxianus* que pode ser inferior a espécie *S. cerevisiae*, sendo esse fato atribuído a atividade da enzima ATPase presente na membrana plasmática das células microbianas (ROSA e SA-CORREIA 1992).

Assim, a avaliação da influência da temperatura em SSF torna-se necessário para o conhecimento da condição que melhor favorece a hidrólise enzimática e a conversão da glicose em etanol.

4.8 Influência da temperatura na produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 por Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) utilizando celulase Novozymes NS 22074 e celulose microcristalina comercial

Os resultados da produção de etanol em hidrolisado enzimático de CAB-OH (SHF) mostraram que a levedura *K. marxianus* ATCC36907 apresentou perfis de fermentação similares as cepas de *Saccharomyces* comerciais, e desempenho satisfatório em temperaturas acima de 30 °C (Figuras 4.3 a 4.10). Diante dos resultados de SSF de CAB-OH a 40 °C (Figura 4.12), a espécie de *K. marxianus* ATCC36907 apresenta aplicação em potencial para produção de etanol por esse processo. Para avaliar o desempenho da levedura em processos SSF, acompanharam-se os perfis de produção de etanol e acúmulo de glicose em diferentes temperaturas (40-50 °C) utilizando celulose microcristalina. De acordo com os resultados da hidrólise enzimática (Figuras 4.14 a 4.16), que mostraram que o complexo de celulasas NS 22074 se sobressaiu na hidrólise enzimática de CAB-OH em comparação com a Celluclast 1.5L, os estudos da influência da temperatura em SSF foram conduzidos com o complexo de celulasas NS 22074. A atividade enzimática foi fixada em 15 FPU/g_{celulose}, pois o objetivo desse tópico fora somente a avaliação da influência da temperatura na produção de etanol por SSF de *K. marxianus* ATCC36907.

A Figura 4.17 apresenta os perfis de glicose e etanol após a variação da temperatura no processo SSF de *K. marxianus* ATCC36907 utilizando celulose microcristalina. Na Figura 3.16A, a presença de glicose foi identificada na temperatura de 40 °C após 72h ($0,52 \pm 0,06$ g.L⁻¹) e 42 °C após 48h ($2,85 \pm 0,86$ g.L⁻¹). Nessas temperaturas, a baixa concentração de glicose observada pode ser atribuída à conversão deste açúcar em etanol pela levedura que é visualizado na Figura 4.17B, condição que favoreceu o metabolismo da mesma. Nas demais temperaturas estudadas, já se observavam acúmulo de glicose no meio fermentativo após 24h, a 45 °C ($4,96$ g.L⁻¹) e a 50 °C ($15,00$ g.L⁻¹).

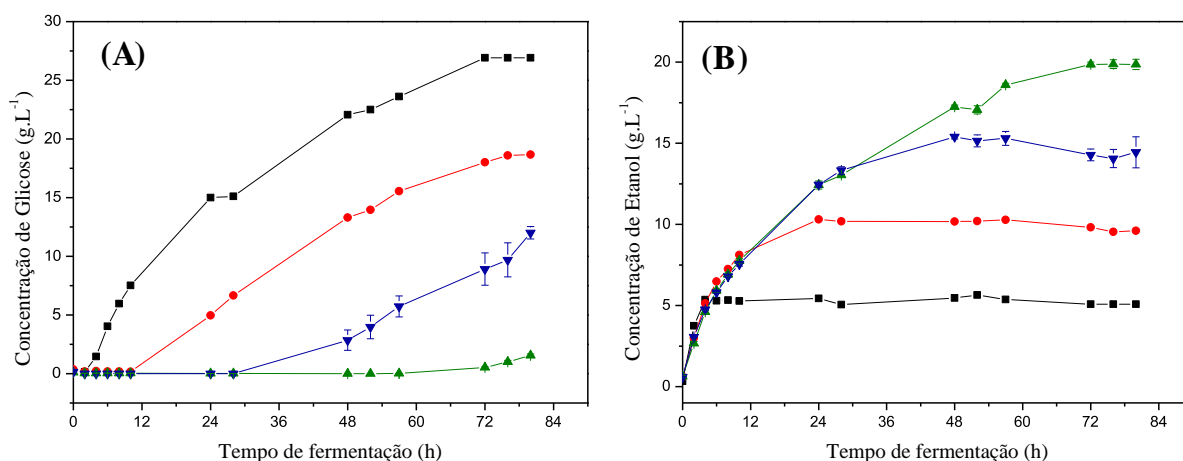


Figura 4.17 - Concentrações de glicose (A) e etanol (B) da variação da temperatura de fermentação de *K. marxianus* ATCC36907 em processo SSF utilizando celulose microcristalina como substrato. Fermentação conduzida a 10% (m/v) de celulose microcristalina, celulasas de NS22074 a 15 FPU/g_{celulose} e 150 rpm. 50 °C (■), 45 °C (●), 42 °C (▼) e 40 °C (▲).

De acordo com os resultados na Figura 4.17B, a levedura *K. marxianus* ATCC36907, embora tenha apresentado bom desempenho no processo SHF em temperaturas acima de 40 °C; no processo SSF a levedura apresentou concentração máxima de etanol de $19,86 \pm 0,32$ g.L⁻¹ a 40 °C, após 72h de fermentação. A 42 °C, a concentração de etanol foi de $14,45 \pm 0,96$ g.L⁻¹ após 80h de fermentação, enquanto que a 50 °C, a concentração de etanol obtida foi de 5,08 g.L⁻¹ ao final do processo. Diante disso, observa-se que os resultados da variação da temperatura no processo SHF (Figura 4.10) em comparação com processo SSF são bem diferentes. Para tanto, destaca-se que no processo SSF a levedura encontra-se no início do processo em condições de restrição de nutrientes, pois a produção de glicose está condicionada a realização da hidrólise enzimática. Enquanto que no processo SHF, o tempo de fermentação foi de 8h, o processo SSF durou cerca de 80h, possivelmente o crescimento da levedura e produção de etanol foram influenciados pelo tempo em que as células estavam expostas a condições críticas de temperatura e limitação de nutrientes.

TOMÁS-PEJÓ *et al.* (2009) estudaram a produção de etanol de *K. marxianus* CECT10875 por processo SSF utilizando celulose microcristalina (Sigmacell 50) a 42 °C. A atividade enzimática de Celluclast 1.5L foi fixada em 15 FPU/g_{celulose}. Assim como nesse trabalho, os autores suplementaram o meio de cultivo com extrato de levedura (5 g.L⁻¹). Quando os autores utilizaram 10% (m/v) de celulose, após 72h, a concentração de etanol

obtida foi de 32 g.L⁻¹ aproximadamente. Embora as condições de SSF utilizadas pelos autores tenham sido semelhantes as condições deste trabalho, o resultado da literatura foi 1,7 vezes superior.

PESSANI *et al.* (2011) estudaram três temperaturas (37, 41 e 45 °C) na produção de etanol por SSF de *K. marxianus* IMB3 utilizando o complexo enzimático Accellerase 1500 na concentração de 0,7 mL/g de celulose de uma gramínea (*P. virgatum*) proveniente do centro de pesquisa de ciências dos solos e vegetais da Universidade do Estado de Oklahoma (EUA). A concentração do lignocelulósico foi fixada em 8% (m/v). Os autores relataram que nas temperaturas de 37 e 41 °C foram observadas quantidades desprezíveis de glicose no período de 24 – 168 h. Por outro lado; 1,4 g.L⁻¹ de glicose foi quantificada a 45 °C após 168 h de SSF. Quando comparado com os resultados deste trabalho, somente a 40 °C, o perfil de glicose foi similar ao obtido pela literatura, obtendo-se cerca de 1,5 g.L⁻¹ de glicose no final do processo SSF (80h). Em relação a produção de etanol, nas temperaturas de 37 e 41 °C, aproximadamente 20 g.L⁻¹ de etanol foram quantificados após 72h de SSF, resultado similar ao obtido neste estudo ($19,86 \pm 0,32$ g.L⁻¹) a 40 °C. A 45 °C, os autores reportam que a concentração de etanol obtida foi de 23 g.L⁻¹ após 72h de fermentação.

4.9 Produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 por Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF) a 40 °C utilizando celulasas de Novozymes NS22074 e celulose de CAB-OH

A Figura 4.18 apresenta os resultados da concentração de etanol e açúcares (glicose, celobiose e xilose) durante o processo SSF de CAB-OH utilizando células de *K. marxianus* a 40 °C e celulase do complexo NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose}. Observa-se na Figura 4.18, que a maior concentração de etanol ($37,35 \pm 0,64$ g.L⁻¹) foi obtida em 80h de fermentação, com produtividade correspondente de 0,46 g.L⁻¹.h⁻¹. Identificou-se a presença de glicose somente após 72h de fermentação ($1,17 \pm 0,09$ g.L⁻¹), enquanto que a presença de celobiose foi observada após 48h de fermentação com concentração inferior a 1,00 g.L⁻¹, ambas mantendo-se constante até o final do processo. A concentração de xilose aumentou durante o processo, obtendo-se $2,90 \pm 0,09$ g.L⁻¹ após 80h.

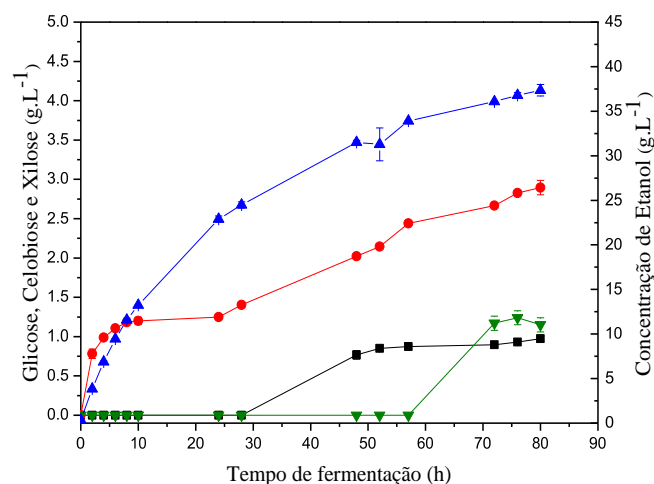


Figura 4.18 - Produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907 por SSF de CAB-OH com celulase NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose}; 7,5% (m/v) de celulose de CAB-OH, a 40 °C e 150 rpm. Glicose (▼), celobiose (■), xilose (●) e etanol (▲).

Dentre os estudos com o complexo enzimático NS 22074, destacam-se a produção de etanol de *Pichia guilliermondii* em hidrolisado enzimático de sabugo de milho (FAN *et al.*, 2013). A hidrólise enzimática foi conduzida a 18% de sólidos e 15 FPU/g de substrato. Os autores obtiveram 74,9 g.L⁻¹ de glicose e após fermentação em bateladas consecutivas obtiveram maior concentração de etanol e eficiência de 37,7 g.L⁻¹ e 92,2%, respectivamente após o quarto ciclo de fermentação da levedura.

Diante desses resultados, percebe-se que a produção de etanol foi favorecida pela utilização de celulasas de NS 22074 e pelo aumento da carga enzimática de 15 para 30 FPU/g_{celulose} em relação à SSF utilizando Celluclast 1.5L (Figura 4.12). Houve aumento expressivo na conversão de glicose da celulose de CAB-OH em etanol de 0,34 (SSF com Celluclast 1.5L) para 0,49 (SSF com NS 22074); e no rendimento de etanol de 66,30 para 95,59%.

A Figura 4.19 apresenta o fluxograma no qual consta o balanço de massa dos resultados de produção de etanol de bagaço de caju *in natura* dos processos SHF e SSF de *K. marxianus* ATCC36907. Na utilização de Celluclast 1.5L, verifica-se que a massa de etanol obtida do processo SSF (2,23 g) foi pouco superior ao do processo SHF (2,15 g), sendo que a SHF requereu duas etapas para a obtenção do biocombustível.

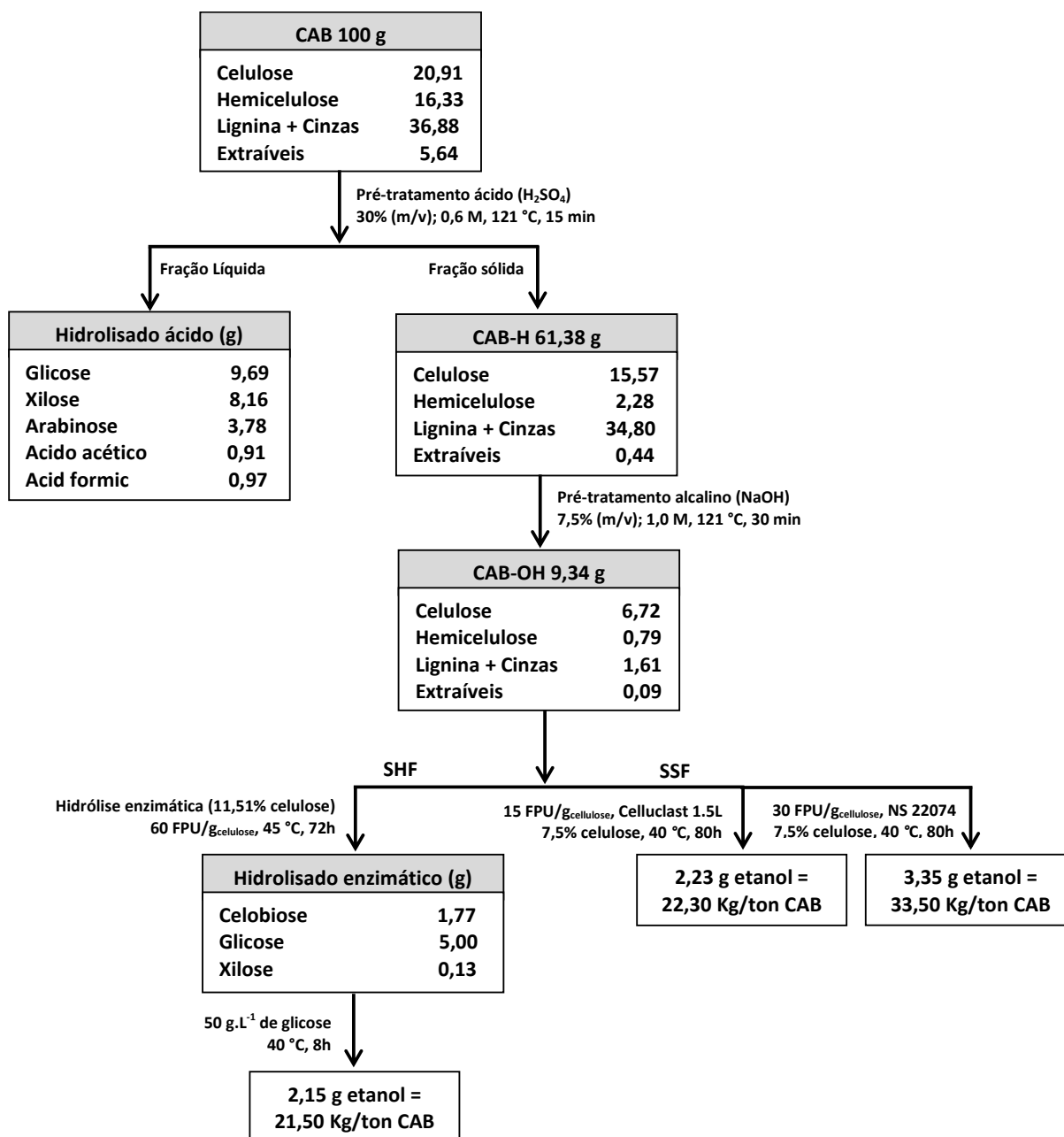


Figura 4.19 – Balanço de massa da produção de etanol de segunda geração de bagaço de caju por processos SHF e SSF utilizando células *K. marxianus* ATCC36907.

Ao analisar a produção de etanol do processo SSF com dois complexos enzimáticos diferentes, a massa de etanol aumentou 2,23 g para 3,35 g; um ganho percentual de 50% pela variação do complexo enzimático e aumento na atividade inicial de celulasas NS 22074. Contudo, vale ressaltar que os processos SHF requerem maiores cargas de celulose inicial para a redução dos efeitos de inibição dos produtos de sua hidrólise (glicose e celobiose), o que não é observado nos processo SSF, uma vez que a glicose proveniente da hidrólise é simultaneamente convertida em etanol. Portanto esses resultados favorecem a utilização do processo SSF para produção de etanol de segunda geração de bagaço de caju.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o hidrolisado enzimático de CAB-OH é uma fonte alternativa de glicose para o crescimento e produção de etanol de diferentes linhagens de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Hanseniaspora* sp. GPBio03. Dentre as leveduras estudadas, *K. marxianus* ATCC36907 apresentou resultados promissores em hidrolisado enzimático para estudos de sua capacidade termotolerante em SHF e SSF.

De acordo com os resultados de SHF de *K. marxianus* ATCC36907 em hidrolisado enzimático de CAB-OH, sugere-se a utilização da temperatura de 40° C, pois nessa condição obteve-se maior valor de $Y_{E/G}$, 0,43 g_{etanol}/g_{glicose}. Por outro lado, no processo SSF, o uso de Celluclast 1.5L indicou a necessidade de suplementação com celobiasas ou avaliação de outros complexos enzimáticos que reduzissem o acúmulo de celobiose observado. Nesse sentido, sugere-se o uso de celulasas NS 22074, pois a utilização deste complexo não requer a suplementação com celobiasas.

No estudo da influência temperatura de SSF de *K. marxianus* ATCC36907 utilizando celulose microcristalina, recomenda-se a utilização de 40 °C, visto que nessa temperatura maior concentração de etanol foi obtida com menor acúmulo de glicose devido à hidrólise.

Analisando o balanço de massa a produção de etanol de *K. marxianus* ATCC36907, é mais promissor a utilização do processo SSF em relação ao processo SHF, seja utilizando o complexo Celluclast 1.5L ou NS 22074. Entretanto, quando comparado os resultados de SSF com os diferentes complexos de celulasas, convém melhor a utilização do complexo NS 22074, para a redução da presença de celobiose e aumento da taxa de hidrólise, pois com esse complexo foi obtida maior razão etanol por ton de bagaço; 3,35 Kg etanol/ton CAB *in natura*.

Contudo, outros aspectos/variáveis substanciais devem ser avaliados, destacando-se a otimização do pré-tratamento alcalino para aumentar a recuperação de celulose do bagaço, bem como, estudar o comportamento do processo SSF em fermentadores de bancada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. A. P., Extrato de bagaço de caju rico em pigmento. n. PI 0103885-0, 19 de junho de 2001.
- AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2013. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/etanol3_000g7gq2cz702wx5ok0wtedt3xdrmfk.pdf. Acessado em setembro, 2013.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO M.J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- ALZATE, C. A. C.; TORO, O. J. S., Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass, *Energy*, v. 31, p. 2447-2459, 2006.
- ANDERSON, P. J.; MCNEIL, K.; WATSON, K., High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills, *Applied Environmental Microbiology*, v. 51, p. 1314-1320, 1986.
- ASSUNÇÃO, R. A.; MERCADANTE, A. Z., Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.), v. 16, p. 647–657, 2003.
- ASK, M.; OLOFSSON, K.; FELICE, T. D.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; LIDÉN, G.; OLSSON, L., Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF, *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1452-1459, 2012.
- ATALA, D. I. P.; COSTA, A. C.; MACIEL, R., Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91, n. 3, p. 353-365, 2001.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M., Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K., International testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 257-270, 1992.
- BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R., The use of a thermotolerant fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production, *Acta Biotechnology*, v. 16, p. 215-223, 1996.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A. P., Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 809-821, 1998.

BARBOSA, M. M., Obtenção de carotenóides e flavonóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2010.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 7, p. 248–254, 1976.

BRASILAGRO, 2013a. Disponível em: <http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/11/51825>. Acessado em setembro, 2013.

BRASILAGRO, 2013b. Disponível em: <http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/11/53129>. Acessado em setembro, 2013.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E., Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production, *Bioresource Technology*, v. 10, n. 13, p. 4862–4874, 2010.

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

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M., Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments, *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, p. 849–864, 2008.

CASPETA, L.; CARO-BERMÚDEZ, M. A.; PONCE-NOYOLA, T.; MARTINEZ, A., Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol, *Applied Energy*, v. 113, p. 277–286, 2014.

CASTANHEIRA, D. D., Estudos sobre a produção de etanol em células de *Saccharomyces cerevisiae* com maior atividade da enzima H^+ -ATPase de membrana citoplasmática, Minas Gerais, Brasil: Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

CHAMPAGNE, P.; LI, C., Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars, *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5700–5706, 2009.

CHEN, F.; DIXON, R. A., Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production, *Nature Biotechnology*, v. 25, p. 759–761, 2007.

CORREIA, J. A. C.; MARQUES JR., J. E.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P., Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters, *Bioresource Technology*, v. 139, p. 249–256, 2013.

DORAN, P. M., *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press, ISBN: 978-0-12-220856-0, 1ª edição, 1995.

ESCARNOT, E.; AGUEDO, M.; PAQUOT, M., Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull, *Journal of Cereal Science*, v. 55, p. 243-253, 2012.

EPE – Empresa de Pesquisa Energética. Ministério de Minas e Energia, Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis, ano base 2012, 2013. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – boletins periódicos/Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2012.pdf>. Acessado em setembro, 2013.

FAN, C.; QI, K.; XIA, X. X.; ZHONG, J. J., Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast, *Bioresource Technology*, v. 136, p. 309–315, 2013.

FERREIRA, A. C. H.; NEIVA, J. N. M.; RODRÍGUEZ, N. M.; LOBO, R. N. B.; VASCONCELOS, V. R., Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria do suco de caju, *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33 (6), p. 1380-1385, 2004.

FLEET, G. H., Yeast interactions and wine flavor, *International Journal of Food Microbiology*, v. 86, p. 11-22, 2003.

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 79, p. 339–354, 2008.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M., Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal Food Engineering*, v. 74, p. 78-88, 2006.

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

GHOSE, T. K., Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC), *Pure Applied Chemistry*, v. 59, p.257-268, 1987.

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

GOMEZ L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J., Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the wall. *New Phytol*, v. 178, p. 473-485, 2008.

GOSSELINK, R. J. A.; DE JONG, E.; GURAN, B. e ABÄCHERLI, A. Co-ordination network for lignin—standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). *Industrial Crops and Products*, v. 20, p. 121-129, 2004.

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

GRUNO, M.; VALJAMAE, P.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G., Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase by the cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate, *Biotechnology Bioengineering*, v. 86(5), p. 503–511, 2003.

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

HAQUE, M. A.; BARMAN, D. N.; KANG, T. H.; KIM, M. K.; KIM, J.; KIM, H.; YUN, H. D., Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time, *Biosystems Engineering*, v. 114 (3), p. 294-305, 2013.

HASHIZUME, T.; AQUARONE, E., *Biotecnologia Industrial*, v. 4, p. 43, 1ª reimpressão, 2005.

HASUNUMA T.; KONDO A., Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains, *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1287–1294, 2012.

HEREDIA-OLEA, E. H.; CARRILLO, E. P.; SALDÍVAR, S. O. S., Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology, *Bioresource Technology*, v. 119, p. 216–223, 2012.

HUGHES, D. B.; TUDROSAEN, N. J.; MOYE, C. J., The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnology Letter*, v. 6, p. 1-6, 1984.

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

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R., Microbial pectinolytic enzymes: a review, *Process Biochemical*, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JOLLY, N.; AUGUSTYN, O.; PRETORIUS, I., The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v. 27, p. 15-39, 2006.

KIM, I.; LEE, B.; PARK, J. Y.; CHOI, S. A.; HANA, J. I., Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw, *Carbohydrate Polymers*, v. 99, p. 563– 567, 2014.

- KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J.P.M., Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*, v. 46, p. 126–131, 2009.
- KRISTIANI, A.; ABIMANYU, H.; SETIAWAN, A. H.; AULIA, S. F., Effect of pretreatment process by using diluted acid to characteristic of oil palm's frond, *International Conference on Sustainable Energy Engineering and Application (ICSEEA)*, 2012.
- KRISTENSEN JB, F. C.; JORGENSEN, H., Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose, *Biotechnology Biofuels*, p. 2-11, 2009.
- KUMAR, R.; WYMAN, C. E., Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies, *Biotechnology Progressive*, v. 25, p. 302–314, 2009.
- LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P., *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow, *Fungal Biology Reviews*, v. 24, p. 17–26, 2010.
- LEITÃO, R. C.; CLAUDINO, R. L.; BRITO, C. R. F.; ALEXANDRE, L. C.; CASSALES, A. R.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T., Produção de Biogás a partir do Bagaço do caju, *Embrapa Agroindústria Tropical*, ISSN 1679-6543, 2011.
- LI, Q.; GAO, Y.; WANG, H.; LI, B.; LIU, C.; YU, G.; MU, X., Comparison of different alkali-based pretreatments of corn stover for improving enzymatic saccharification, *Bioresource Technology*, v. 125, p. 193–199, 2012.
- LIMA, J. R., Hambúrguer de Caju: Elaboração e Características, Comunicado técnico 131 – Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6535, 2007.
- LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3367–3374, 2007.
- LIN, Y. S.; LEE, W. C.; DUAN, K. J.; LIN, Y. H., Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*, *Applied Energy*, v. 105, p. 389–394, 2013.
- LINDE, M.; JAKOBSSON, E. L.; GALBE, M.; ZACCHI, G., Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production, *Biomass and Bioenergy*, v. 32, p. 326–332, 2008.
- MAEDA, R. N.; SERPA V. I.; ROCHA V. A. L.; MESQUITA R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E., JR., N. P.; POLIKARPOV, I., Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases, *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1196–1201, 2011.
- MARTINS, L. F.; KOLLING D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P., Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their

activity against various cellulosic substrates, *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1417–1424, 2008.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E.; MAGALHÃES, M. M. A., Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale*, L.) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products, *Brazilian Archives of Biology Technology*, v. 48, p. 143-150, 2005.

MEYER, A. S.; ROSGAARD, L.; SORENSEN, H. R.; The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal Cereal Science*, v. 50, p. 337-344, 2009.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T., Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6718–6727, 2010.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E., Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings, *Biomass and Bioenergy*, v. 56, p. 526-544, 2013.

MONTENEGRO, A. A. T.; CARBEJAL, A. R.; MESQUITA, A. L. M. M.; AQUINO, A. R. L.; FREIRE F. C. O.; OLIVEIRA, F. N. S.; FILHO G. C. A.; PARENTE J. I. G.; CAVALCANI, J. J. V.; MOSCA J. L.; PAIVA J. R.; CAJAZEIRA, J. P.; BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, L. A.; OLIVEIRA V. H., Sistemas de produção para manejo do cajueiro comum e recuperação de pomares improdutivos, Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1678-8699, 2007.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I., Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must, *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, p. 231-238, 2008.

MOREIRA, N.; PINA, C.; MENDES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I., Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications, *Food Control*, v. 22, p. 662-667, 2011.

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

NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B. M. A.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S., High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042, *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, p. 7514-7521, 2008.

OJEDA, K.; SÁNCHEZ, E.; EL-HALWAGI, M.; V. KAFAROV. Exergy analysis and process integration of bioethanol production from acid pre-treated biomass: Comparison of SHF, SSF and SSCF pathways, *Chemical Engineering Journal*, v. 176–177, p. 195-201, 2011.

- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S., Hidrólise enzimática de biomassa, *Química Nova*, v. 33 (7), p. 1549-1558, 2010.
- OLSON, D. G.; MCBRIDE, J. E.; SHAW, J.; LYND L. R., Recent progress in consolidated bioprocessing, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23 (2), p.396-405, 2012.
- PESSANI, N. K.; ATIYEH, H. K.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; BANAT, I. M., Simultaneous saccharification and fermentation of *Kanlow switchgrass* by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings, *Bioresource Technology*, v. 102, p. 10618-10624, 2011.
- PIERRE, G.; MAACHE-REZZOUG, Z.; SANNIER, F.; REZZOUG, S. A.; MAUGARD, T., High-performance hydrolysis of wheat straw using cellulase and thermomechanical pretreatment, *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2194–2200, 2011a.
- PIERRE, G.; SANNIER, F.; GOUDE, R.; NOUVIAIRE, A.; MAACHE-REZZOUG, Z.; REZZOUG, S. A.; MAUGARD, T., Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain, *Journal of Cereal Science*, v. 54, p. 305-310, 2011b.
- PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J. A.; HOGG, T., Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions, *Food Microbiology*, v. 21, p. 439–447, 2004.
- PINHEIRO, A. D. T.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B., Evaluation of cashew apple juice for the production of fuel ethanol, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 148, p. 227-234, 2008.
- PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C.; How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?, *Trends Genet*, v. 22, p. 183-186, 2006.
- RANA, V.; ECKARD, A. D.; TELLER, P.; AHRING, B. K., On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine, *Bioresource Technology*, v. 154, p. 282–289, 2014.
- REEVES, E.G.M., Kinetic analysis of *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. Louisiana, United States of America: Tese de Doutorado, Department of Biological and Agricultural Engineering, Louisiana State University, 2004.
- ROCHA, M.V.P., Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. Rio Grande do Norte, Brasil: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.
- ROCHA, M.V.P.; RODRIGUES, T.H.S.; MACEDO, G.R.; GONÇALVES, L.R.B., Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 155, p. 407–417, 2009.

- ROCHA M. V. P.; RODRIGUES T. H. S.; MELO V. M. M.; GONÇALVES L. R. B.; MACEDO G. R., Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 1099-1107, 2011.
- RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S.; GONCALVES, L. R. B., Tannase Production by Solid State Fermentation of Cashew Apple Bagasse, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 675 – 688, 2007.
- RODRIGUES, T. H. S.; PINTO, G. A. S.; GONÇALVES, L. R. B., Effects of inoculum concentration, temperature and carbon sources on tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 13 (5), p. 571-576, 2008.
- RODRIGUES T.H.S.; ROCHA M.V.P.; MACEDO G.R.; GONÇALVES, L.R.B., Ethanol production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, p. 929–943, 2011.
- ROSA, F. M.; SA-CORREIA, I., Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 23–27, 1992.
- 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 Biochemical Biotechnol*, v. 143, p. 27-40, 2007.
- RUZENE, D. S.; SILVA, D. P.; VICENTE, A. A.; GONÇALVES, A. R.; TEIXEIRA, J. A., An alternative application to the Portuguese agro-industrial residue: wheat straw, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 147, p. 85-96, 2008.
- SAMANIUK, J. R.; SCOTT, C. T.; ROOT, T. W.; KLINGENBERG D. J., The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions, *Bioresour Technol*, v. 102, p. 4489-4494, 2011.
- SANTOS, S. F. M., Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato, Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 2007.
- SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER, J. N., Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8945-8951, 2011.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER D., Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Laboratory Analytical (LAP) - Technical Report, NREL/TP-510-42618, 2008a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D., Determination of Extractives in Biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP) - Technical Report, NREL/TP-510-42619, 2008b.

SOCOL A, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; LEITÃO, V. F.; GOTTSCHALK, L. M. F. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G., Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil, *Bioresource Technology*, v.101, p. 4820-4825, 2010.

SOUZA, C. J. A.; COSTA, D. A.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; ABRANTES, A. B. P.; COSTA, P. S.; SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L.; FIETTO, L. G., The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*, v. 109, p. 63-69, 2012.

SPATARI, S.; BAGLEY, D.; MACLEAN, H., Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies, *Bioresource Technol*, v. 101, p. 654-667, 2010.

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

SURYAWATI, L.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L.; MANESS, N. O.; BANAT, I. M., Effect of hydrothermolysis process conditions on pretreated switchgrass composition and ethanol yield by SSF with *Kluyveromyces marxianus* IMB4, *Process Biochemistry*, v. 44, p. 540-545, 2009.

SELIG, M.; WEISS, N.; JI Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP) - Technical Report, NREL/TP-510-42629, 2008.

SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER, J. N., Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on SHF and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates, *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8945-8951, 2011.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K., Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review, *International Journal of Molecular Sciences*, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J. M.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS I., BALLESTEROS M., Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process, *Fuel*, v. 88, p. 2142-2147, 2009.

UM, B. H.; KARIM, M. N.; HENK L. L., Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 115-125, 2003.

- VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I., A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy, *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1458-1480, 2012.
- VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B. e PEREIRA JR., N., Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 141-154, 2007.
- VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. A. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M., Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery, *Bioresource Technology*, v. 135, p. 46-52, 2013.
- WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, C.; ROCHA G. J. M.; GOUVEIA, E. R., Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis, *Bioresource Technology*, v. 128, p. 448–453, 2013.
- WANG, Z.; KESHWANI, D. R.; REDDING, A. P.; CHENG, J. J., Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3583–3585, 2010.
- WANG, W.; KANG, L.; WIE, H.; ARORA, R.; LEE, Y. Y., Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading, *Applied Biochemical Biotechnology*, v. 164 (7), p. 1139-1149, 2011.
- WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J., High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production, *Applied Energy*, v. 99, p. 23–31, 2012.
- WATANABE, T.; SRICHUWONG, S.; ARAKANE, M.; TAMIYA, S.; YOSHINAGA, M.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, M.; ANDO, A.; TOKUYASU, K.; NAKAMURA, T., Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol, *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9710–9714, 2010.
- WEN, F.; NAIR, N. U.; ZHAO, H., Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 412–419, 2009.
- WIRAWAN, F.; CHENG, C. L.; KAO, W. C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S.; Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*, *Applied Energy*, v. 100, p. 19-26, 2012.
- WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M. R. L.; LEE, Y. Y., Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1959–1966, 2005.
- XIAO, W.; YIN, W.; XIA, S.; MA, P., The study of factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment, *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 2019-2023, 2012.

XU, Q.; SINGH, A.; HIMMEL M. E., Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 364-371, 2009.

YANASE, S.; HASUNUMA, T.; YAMADA, R.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA H., Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 88, p. 381-388, 2010.

ZHANG, M.; SU, R.; QI, W.; HE, Z., Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Optimizing Enzyme Complexes, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, p. 1407–1414, 2010.

ZHENG, Y.; ZHANG, S.; MIAO, S.; SU, Z.; WANG, P., Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Journal of Biotechnology*, v. 166, p. 135-143, 2013.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z. N.; ZHANG, X.; WANG, C. W.; YU, F. Q., JIN, S. W. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw, *Process Biochemistry*, v. 41, p. 869-873, 2006.

7. ANEXOS

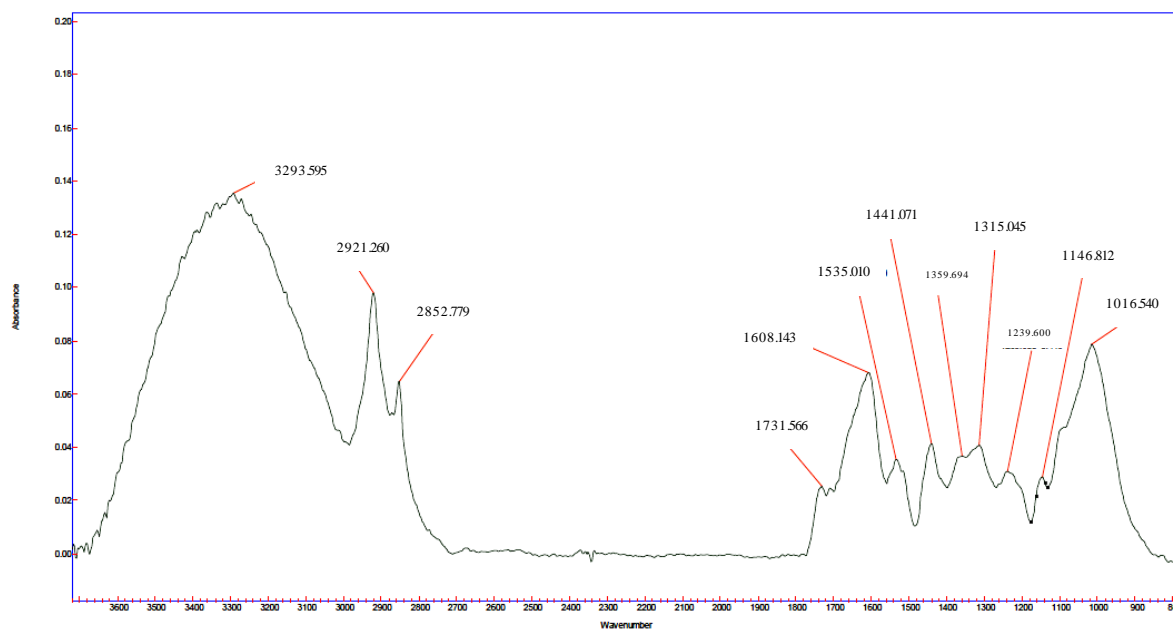


Figura A.1 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju *in natura* (CAB) (3700-800 cm^{-1}).

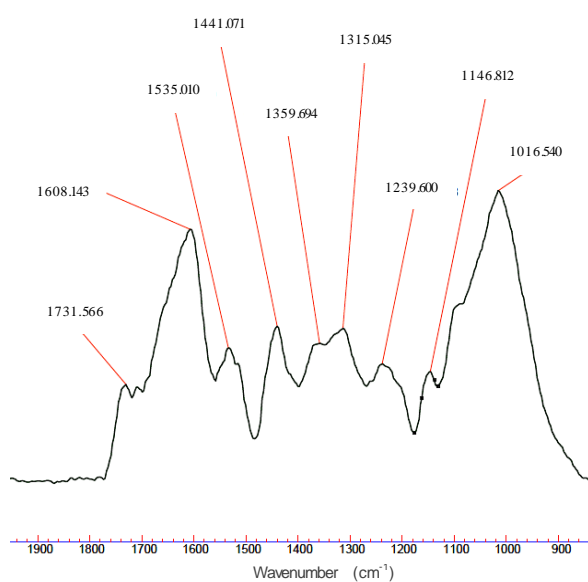


Figura A.2 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju *in natura* (CAB) (1900-900 cm^{-1}).

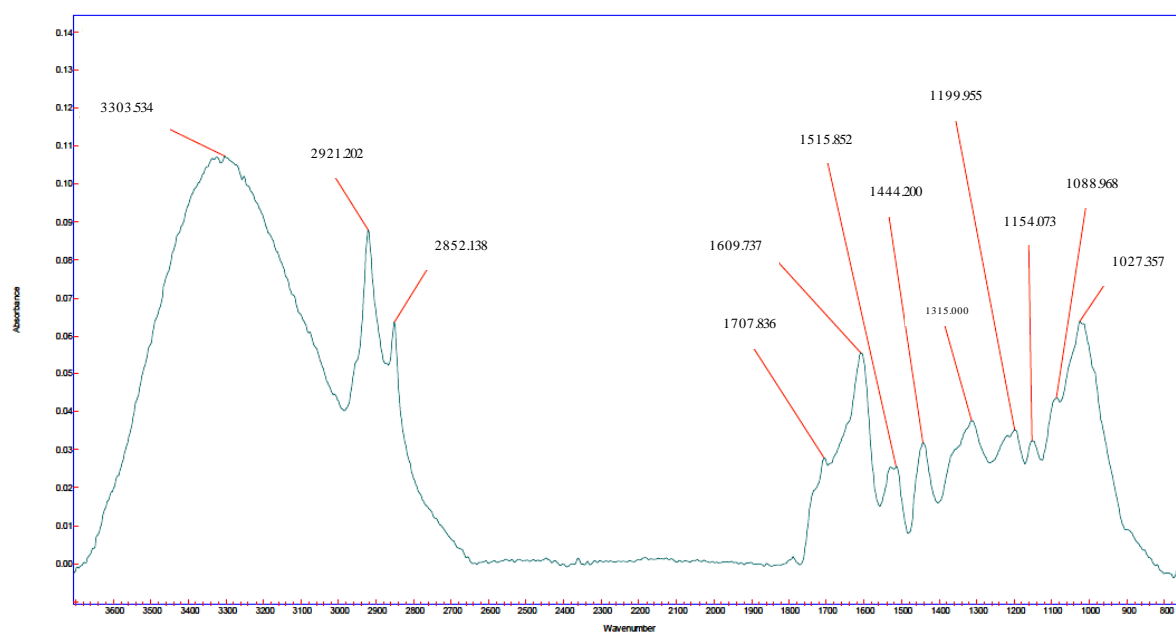


Figura A.3 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju após pré-tratamento ácido (CAB-H) ($3700\text{-}800\text{ cm}^{-1}$).

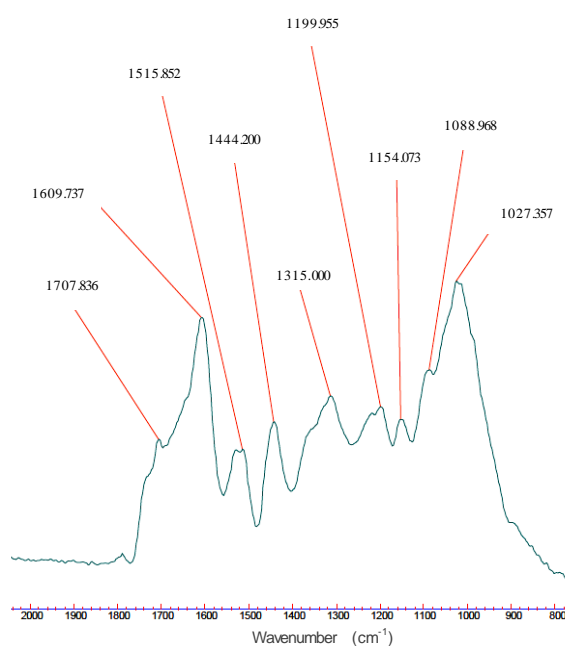


Figura A.4 – Espectro de FT-IR de bagaço de caju após pré-tratamento ácido (CAB-H) ($2000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$).

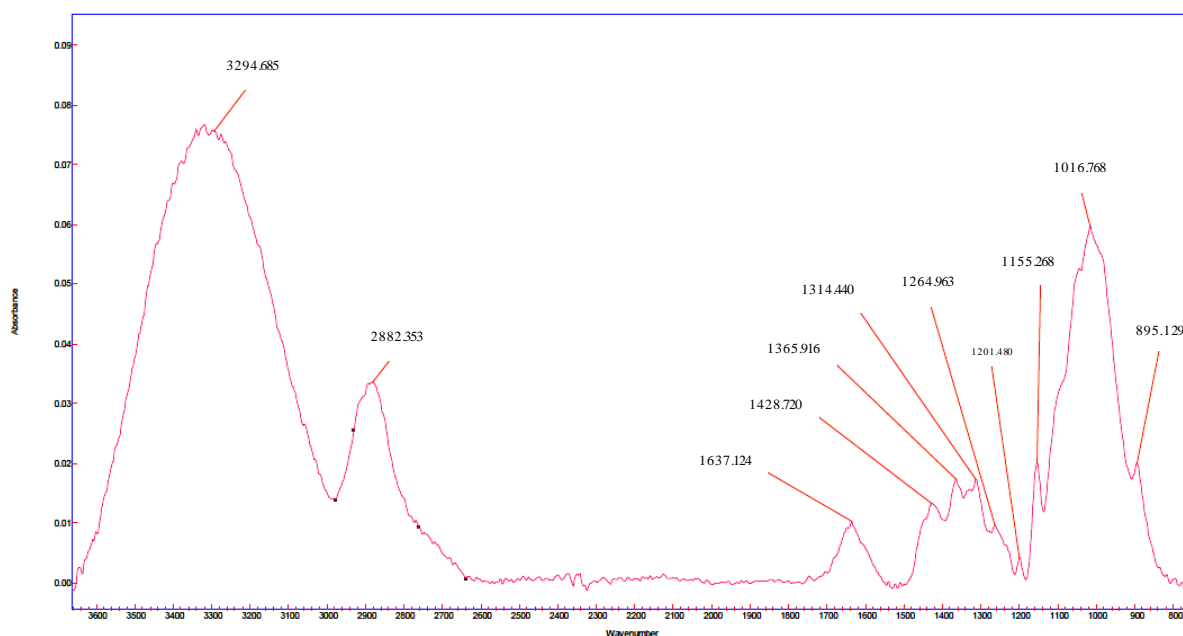


Figura A.5 – Espectro de FT-IR de bagação de caju após pré-tratamento ácido seguido de alcalino (CAB-OH) (3700-800 cm^{-1}).



Figura A.6 – Espectro de FT-IR de bagação de caju após pré-tratamento ácido seguido de alcalino (CAB-OH) (2000-800 cm^{-1}).