

CARLOS JOULBERT ALVES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO LEVEDURAS TERMOTOLERANTES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

CARLOS JOULBERT ALVES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO
SIMULTÂNEAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO LEVEDURAS TERMOTOLERANTES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2011

Prof. José Humberto de Queiroz

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Wendel Batista da Silveira

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A UFV e a CAPEs pelo apoio financeiro;

Ao Professor Luciano Gomes Fietto que me orientou e acompanhou o meu trabalho, sempre prestativo, me auxiliando nos momentos em que eu o procurava sempre disposto a me ajudar;

Aos membros da banca examinadora: professores José Humberto Queiroz, Valéria Monteze e Wendel Batista da Silveira por terem aceitado participar da banca e pelas valiosas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho;

A Dani Arruda por ter me ajudado e MUITO nesse projeto. Que acompanhou o meu trabalho, sempre prestativa, me auxiliando nos momentos em que eu procurava com críticas e sugestões. Especialmente nas contagens de células e dosagens das amostras no bendito HPLC. Valeu Dani;

Aos meus colegas do LBM: Adiverson, Aline, Ananda, Ancély, Daiane, Dani Arruda, Dani Mendes, Felipe, Fernanda, Glauco, Héliida, Mariana, Marina, Mário, Mary, Patrícia, Priscilla, Raphael, Sâmia, Silvana, Zaira e Zamira pela agradável convivência, além dos auxílios e dicas durante os experimentos;

A professora Flávia Maria Lopes Passos por ter disponibilizado o Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos-DMB/UFV (FIS) com todas as instalações e equipamentos (HPLC) para a realização dos trabalhos. A Valdilene, Lygia, Lívia, Caio e Raphael Hermano, membros do FIS, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, muito obrigado;

A valiosíssima contribuição com críticas, sugestões de todos do Grupo Etanol: Ancély, Aline, Dani Arruda, Glauco, Mariana, Marina e Patrícia. Por sempre estarem dispostos a me ajudar;

Ao secretário da pós-graduação, Eduardo, por sua competência, agilidade, paciência, atendendo a todos os alunos com muito bom humor. Obrigado por toda ajuda no processo de mudança de nível;

A professora Andréa Barros Ribon pela amizade, conselho valiosas sugestões dadas para a realização deste trabalho;

A Marina Q. R. B. R. *et al.*, pela ajuda nas análises estatísticas;

Aos meus pais que acima de tudo acreditaram em mim, depositando toda confiança e esperança para que eu conquistasse mais esta vitória;

A Deus, por acompanhar e iluminar meu caminho, sempre me dando força para seguir em frente;

A todos que de alguma forma contribuíram para meu engrandecimento profissional e pessoal. A todos que eu possa não ter citado, mas que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Carlos Joubert Alves de Souza, filho de José Carlos Souza e Silva e Delcy Alves de Souza Silva, nasceu na cidade de Janaúba, Minas Gerais, em 16 de fevereiro de 1983.

Em dezembro de 2000 completou o ensino médio na Escola Estadual Rômulo Sales de Azevedo.

Em agosto de 2004, ingressou no bacharelado em Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se em julho de 2009. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em agosto de 2009, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 18 de fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ANEXO	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
I - REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3 – Contexto energético.....	3
2 - Biomassa.....	4
3 - Etapas do processo de produção de etanol celulósico.....	6
3.1 - Pré-tratamentos	6
3.1.2 - Pré-tratamento ácido	7
3.1.2 - Pré-tratamento básico	7
3.2 - Sacarificação da celulose	8
3.3 - Sacarificação e fermentação separados.....	9
3.4 - Sacarificação e fermentação simultâneas	9
4 - Leveduras termotolerantes	10
II - OBJETIVO GERAL.....	12
III - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
IV - MATERIAL E MÉTODOS	13
1 - Linhagens e meios de cultura	13
2 - Avaliação do crescimento das leveduras.....	13
2.2 - Avaliação do crescimento em meio sólido	13
2.2 - Avaliação do crescimento em meio líquido.....	14
3 - Pré-tratamentos	14
3.1 - Matéria prima	14
3.2 - Pré-tratamento ácido	14
3.3 - Pré-tratamento ácido/básico	14
3.4 - Comparação entre os pré-tratamentos	15
4 - Padronização das condições de hidrólise.....	15
4.1 - Hidrólise da biomassa.....	15

5 - Sacarificação e fermentação simultâneas	16
5.1 - Microorganismos e condições de crescimento	16
5.2 - Sacarificação e fermentação simultâneas a 37 e 42°C.....	16
5.3 - Sacarificação a 50 °C e fermentação a 37 e 42°C	16
6 - Ciclos de fermentação	16
7 - Parâmetros fermentativos.....	17
8 - Parâmetros de hidrólise	17
9 - Relação entre absorvância a 600 nm e massa celular seca.....	17
10 - Métodos analíticos	18
10.1 - Determinação das concentrações de glicose e etanol.....	18
11 - Análises estatísticas	18
V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
1 - Pré-tratamentos	19
2 - Hidrólise e fermentação	21
2.1 - Pré-hidrólise da celulose.....	21
2.2 - Fermentação.....	26
2.2 - Ciclos de fermentação	36
VI - CONCLUSÕES	39
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
VIII - ANEXO	47

LISTA DE ABREVIATURAS

μ - Micro

BG - β -glicosidases

CBH – Celobio-hidrolase

D.O. - Densidade óptica

EnG – Endoglucanase

ExG - Exoglucanases

GL – Graus de Liberdade

GP - Graus de polimerização

QM – Quadrado Médio

SHF- Sacarificação e fermentação separado

SQ – Soma de Quadrados

SSF – Sacarificação e fermentação simultânea

TCA – Ciclo do ácido cítrico

UFP – Unidade de Papel de Filtro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - História de geração de materiais lignocelulósicos no Brasil	5
Figura 2 - Concentração de glicose após 24 horas de hidrólise a 42°C da biomassa pré-tratada com ácido (celulignina) ou com ácido/base (celulose)..	
.....	20
Figura 3 - Concentração de glicose em função do tempo de hidrólise a 50°C	
.....	22
Figura 4 - Concentração de glicose obtida após 24 horas de hidrólise a 37, 42 e 50°C.....	22
Figura 5 - Crescimento das cepas <i>S. cerevisiae</i> LBM-1 e <i>K. marxianus</i> UFV-3 em meio sólido.....	23
Figura 6 - Crescimento de <i>K. marxianus</i> UFV-3 em meio líquido a 30, 37, 42 e 45°C.....	25
Figura 7 - Crescimento de <i>S. cerevisiae</i> UFV-3 em meio líquido a 30, 37, 42 e 45°C.....	25
Figura 8 - Desenho esquemático do experimento de SSF.....	27
Figura 9 - Consumo de glicose e produção de etanol a 37°C em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 37°C.....	28
Figura 10 - Consumo de glicose e produção de etanol a 42°C em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 42°C.....	28
Figura 11 - Consumo de glicose e produção de etanol a 37°C em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 50°C.....	29
Figura 12 - Consumo de glicose e produção de etanol a 42°C em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 50°C.....	29
Figura 13 - Consumo de glicose e produção de etanol a 37°C em processo SSF após 72 horas de hidrólise a 50°C.....	31
Figura 14 - Consumo de glicose e produção de etanol a 42°C em processo SSF após 72 horas de hidrólise a 50°C.....	31
Figura 15 - Gráfico das médias ajustadas mostrando a influência dos efeitos principais: Tempo de pré-hidrólise, temperatura de fermentação e Levedura no rendimento em etanol do processo SSF.....	32
Figura 16 - Gráfico das médias ajustadas da interação entre os fatores: temperatura de fermentação e leveduras LBM-1 (1) e UFV-3 (2).....	33

Figura 17 - Concentração de etanol durante sete ciclos de fermentação com as leveduras <i>S. cerevisiae</i> LBM-1e <i>K. marxianus</i> UFV-3 a 42°C	37
Figura 18 - Regressão linear das médias dos rendimentos em etanol ($Y_{E/C}$) dos ciclos de fermentação para <i>S.cerevisiae</i> LBM-1	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas neste projeto	13
Tabela 2 - Comparação das médias do rendimento de glicose após 24 horas de pré-hidrólise em diferentes temperaturas.....	23
Tabela 3 - Comparação das médias do rendimento de etanol em diferentes temperaturas de pré-hidrólise e de fermentação para as leveduras LBM-1 e UFV-3.....	26
Tabela 4 - Velocidade específica de crescimento	30
Tabela 5 - Rendimento em etanol das leveduras <i>K. marxianus</i> e <i>S. cerevisiae</i>	35

LISTA DE ANEXO

Anexo 1 - Curva-padrão de glicose usada para a quantificação de glicose por HPLC	47
Anexo 2 - Curva-padrão de etanol usada para a quantificação de glicose por HPLC.....	47
Anexo 3 - Análise de variância das médias do rendimento em glicose da hidrólise para os pré-tratamentos ácido e ácido/básico.....	48
Anexo 4 - Análise de variância das médias do rendimento em glicose da hidrólise em diferentes temperaturas.....	48
Anexo 5 - Teste t para os efeitos dos fatores: tempo de hidrólise, temperatura de fermentação e levedura no rendimento em etanol no processo SSF ($\alpha=0,005$).....	48
Anexo 6 - Análise de variância para a média dos rendimentos	48

RESUMO

SOUZA, Carlos Joulbert Alves de, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Flávia Maria Lopes Passos e Maurílio Alves Moreira.

Este trabalho teve como objetivo principal analisar e comparar a produção de etanol em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana de açúcar pelas cepas *S. cerevisiae* LBM-1 e *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Análises de crescimentos das cepas em diferentes temperaturas mostraram que ambas cresceram nas temperaturas de 30, 37 e 42°C e apenas a cepa *K. marxianus* UFV-3 cresceu na temperatura de 45°C. Avaliou-se também a fermentação do bagaço de cana de açúcar, submetido ao pré-tratamento ácido/básico, em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) a 37 e 42°C, analisando-se ainda diferentes tempos de pré-hidrólise da biomassa 37, 42 e 50°C. Os rendimentos em produção de etanol foram semelhantes tanto a 37 quanto a 42°C para ambas as cepas. Verificou-se que o rendimento em etanol foi maior quando o bagaço foi submetido inicialmente a uma pré-hidrólise a 50°C por 72 horas. Posteriormente foram analisados os rendimentos da fermentação em relação ao número de ciclos fermentativos. O rendimento em etanol para a cepa *K. marxianus* UFV-3 diminuiu no quarto ciclo e se manteve constante até o sétimo ciclo. Enquanto que para *S. cerevisiae* LBM-1 o rendimento aumentou no decorrer dos ciclos. Estes resultados permitem sugerir que as duas cepas podem ser utilizadas na produção de etanol celulósico por SSF porque apresentam rendimentos em etanol estatisticamente iguais. No entanto o número de ciclos de fermentação sem perda de rendimento pela cepa *K. marxianus* UFV-3 foi inferior ao da cepa LBM-1 indicando que esta seja mais adequada ao processo de produção através da batelada alimentada nas indústrias de produção de etanol

ABSTRACT

SOUZA, Carlos Joulbert Alves de, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse using thermotolerant yeasts.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co- Advisers: Flávia Maria Lopes Passos and Maurílio Alves Moreira.

The aim of this work was to compare the ethanol production between LBM-1 and *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. The assay of thermotolerance was performed to characterize the strains as the capacity to grow at different temperatures. It was found that both grew at temperatures of 28, 37 and 42°C. Only *K. marxianus* UFV-3 grew at 45°C. It was, also, evaluated the fermentation of sugar cane bagasse, which was submitted to Acid/Alkali pretreatments, in processes of saccharification and fermentation simultaneous (SSF) at 37 and 42°C, analyzing even different times of pre-hydrolysis of the biomass at 37, 42 and 50°C. The yields of ethanol production were similar at 37 and 42°C for both strains. It was found that the ethanol yield was higher when the bagasse was initially submitted to a hydrolysis at 50°C for 72 hours. Thereafter was analyzed the relation between fermentation and number of cycles and it was determined the maximum number of cycles performed without loss of ethanol yield. The ethanol yield for *K. marxianus* UFV-3 decreases at cycle fourth and then, remained constant. The *S. cerevisiae* LBM-1 income increased during the cycle. These results suggest the use of two strains in the production of cellulosic ethanol by processes of SSF because they have ethanol yields statistically identical. However the number of fermentation cycles without loss of yield by strain *K. marxianus* UFV-3 was lower than that LBM-1, indicating that this is more suited to the production process by industries in the fed batch production of ethanol.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a escassez de combustíveis fósseis e a poluição ambiental proveniente de seu uso têm despertado interesse na busca por fontes renováveis de energia (Zhao *et al.*, 2009). Neste âmbito, o etanol ganha especial atenção, principalmente no que se refere a sua obtenção a partir do bagaço de cana-de-açúcar, resíduo abundante na indústria sucro-alcooleira. Estima-se que a cada ano sejam produzidas de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a cerca de 30% do total da cana moída (Santos *et al.*, 2005). A utilização do bagaço pode gerar um aumento superior a 30% na atual produção de álcool sem necessidade de expansão da área plantada de cana-de-açúcar.

O etanol pode ser produzido a partir de biomassa lignocelulósica por um processo de quatro etapas que inclui: o pré-tratamento, a hidrólise, fermentação e destilação (Mosier *et al.*, 2005). Hidrólise e fermentação podem ser executadas simultaneamente em um processo conhecido como sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). SSF utiliza enzimas, em detrimento de produtos químicos (ácidos ou base), para hidrolizar os carboidratos estruturais celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. SSF reduz custos do processo, no que diz respeito aos equipamentos, por realizar a hidrólise e a fermentação em um único reator e eliminar a necessidade de materiais caros capazes de resistir a ácidos fortes ou outros produtos químicos. Além disso, a SSF aumenta a taxa de hidrólise, por redução do efeito de inibição do produto, pois os açúcares são rapidamente consumidos pela levedura durante o processo. No entanto, um dos principais limitantes no processo SSF é a temperatura. A hidrólise enzimática tem uma temperatura ótima em torno de 50 °C e a maioria dos micro-organismos fermentativos têm uma temperatura ótima de crescimento na faixa de 30 a 37 °C. O processo de SSF em temperaturas dentro da faixa ideal para a atividade das celulasas pode aumentar a taxa de hidrólise e reduzir o tempo de SSF e / ou uso de enzimas. Nesse sentido, espécies termotolerantes do gênero *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, capazes de crescer e fermentar em temperaturas acima de 40°C, têm sido isoladas e caracterizadas visando sua utilização em processos de SSF (Suryawati *et al.*, 2008).

Este trabalho teve por objetivo analisar e comparar o consumo de glicose e produção de etanol por duas espécies de leveduras termotolerantes: *Kluyveromyces marxianus* UFV3, isolada no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismo/DMB/UFV; e *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1 coletada de uma indústria de Cachaça de Minas Gerais e isolada no Laboratório de Biotecnologia Molecular/DBB/UFV. Avaliou-se a influência do tempo de hidrólise, temperatura de fermentação e da cepa de levedura no rendimento em etanol por processos SSF utilizando o bagaço de cana de açúcar como substrato. Posteriormente, foi avaliada a fermentação quanto ao número de ciclos através de cálculos do rendimento em etanol; e determinou-se o número de ciclos executados sem perda de rendimento.

I - REVISÃO DE LITERATURA

1 - Contexto energético

Durante o século XX, o desenvolvimento industrial e social foi essencialmente impulsionado pelo crescimento do setor petroquímico. O constante aumento das taxas de exploração e utilização das reservas de recursos fósseis assegurou por muito tempo a disponibilidade de matéria-prima para a indústria e combustíveis para transporte e geração de energia. A formação de recursos fósseis é um processo cíclico, mas que leva muito tempo para se completar, enquanto que a capacidade de exploração pela humanidade é muito mais rápida. Assim, no início do século XXI, vários fatores contribuíram para a crescente e urgente necessidade da utilização de fontes alternativas renováveis que pudessem atender uma economia global, até então, predominantemente dependente de recursos fósseis, como o petróleo (Van maris *et al.*, 2006).

Ainda hoje o petróleo apresenta-se como principal fonte de energia mantenedora do desenvolvimento industrial. Entretanto, a dependência cada vez maior de energia, a possibilidade do esgotamento das reservas fósseis e a preocupação com a questão ecológica cada vez mais forte, compreendem fatores que instigam a procura e o desenvolvimento de alternativas energéticas. Neste contexto, a produção de biocombustíveis surge como alternativa promissora, já que se baseia na utilização de fontes naturais renováveis (Hahn hagerdal *et al.*, 2006). Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa é renovável e não contribui para o acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera terrestre, uma vez que o CO₂ liberado durante o uso da biomassa é absorvido novamente no processo de fotossíntese para a sua formação (Hall, 1984).

Na década de 1970, o Brasil iniciou um programa para estimular a produção de etanol. Neste programa, a cana de açúcar foi escolhida como matéria-prima e como consequência os estudos foram muito intensos, levando o Brasil a uma posição muito mais favorável em termos de segurança energética (Soccol *et al.*, 2009)

Até 2009 existiam 448 unidades de produção de bioetanol instaladas em todo o país (UDOP, 2009), dos quais 354 unidades estavam localizadas no Sul, Sudeste e Centro Oeste. Na região amazônica, que ocupa cerca de 50% do território brasileiro, existiam apenas cinco unidades. Novas unidades de produção de bioetanol são esperadas para serem instaladas no futuro. No entanto, deve-se notar que hoje apenas um terço da biomassa produzida é utilizado para a produção de etanol e um grande excedente de bagaço é gerado neste processo (Cortez *et al.*, 2008).

2 - Biomassa

A biomassa é definida como toda matéria orgânica (vegetal, terrestre ou aquática) formada pelo processo de fotossíntese. Pode-se dizer que a biomassa é uma forma de armazenamento de uma pequena fração da energia solar que incide na superfície da terra, na forma de ligações moleculares orgânicas (energia química) (Mckendry, 2002).

As biomassas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, sendo compreendidas, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras. Dentre essas, os materiais agroindustriais se destacam pelo caráter de sub-produto, conferido por sua obtenção após o processamento de matérias-primas que apresentam maior valor agregado, e pela vocação natural que o Brasil possui para sua geração. Sendo assim, a Figura 1 apresenta uma história da geração de materiais lignocelulósicos no Brasil, com as massas representadas em peso úmido. O bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa predominante com uma geração em 2007 de 147 milhões de toneladas. Igualmente, é notória a quantidade gerada das demais biomassas lignocelulósicas: juntos, no ano de 2007, os materiais apresentados na Figura 1 somaram uma massa gerada no Brasil de 606 milhões de toneladas, das quais cerca de 105 milhões correspondem à fração celulósica (Castro, 2010).

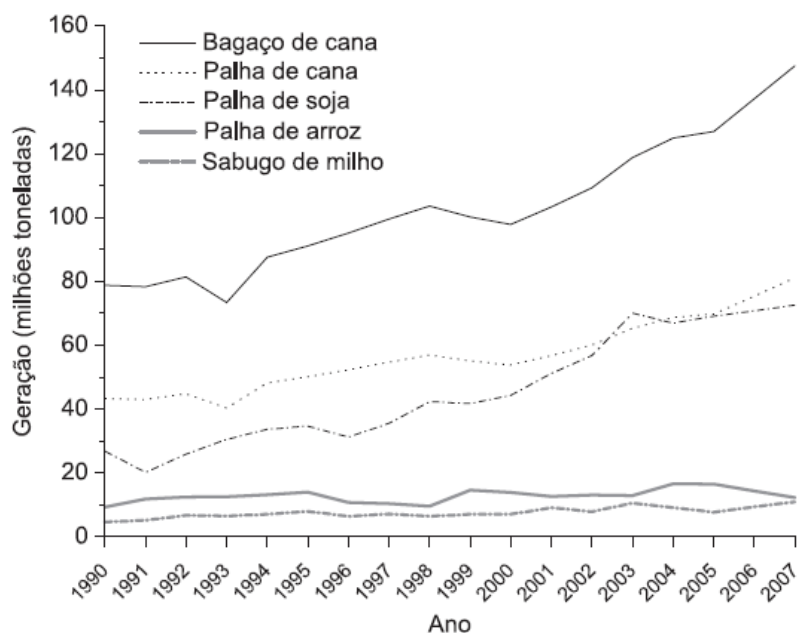


Figura 1 - História da geração de materiais lignocelulósicos no Brasil (Castro, 2010).

O conteúdo de celulose e hemicelulose presentes nessas biomassas podem ser convertidos em monossacarídeos, fermentáveis como hexoses e pentoses. O teor de celulose e hemicelulose nesta biomassa representam uma alternativa sustentável, ou seja, uma fonte de energia renovável e barata para aumentar a produção de etanol com menor contribuição para o efeito estufa comparado com os combustíveis fósseis. Grandes quantidades de celulose também estão disponíveis como resíduos urbanos e industriais o que contribuem para os atuais problemas de poluição (Demain, 2009).

O maior constituinte da biomassa lignocelulósica é a celulose, um polímero linear composto de subunidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. Polímeros lineares de celulose ocorrem como cadeias paralelas unidas por ligações de hidrogênio. Essa estrutura conformacional, bem como a associação estreita com lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais a torna altamente resistente à hidrólise. Hemicelulose, o segundo componente principal da lignocelulose é um heteropolímero complexo altamente ramificado e que contém hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e Ácido D-galacturônico). Contudo, em contraste com a celulose, a hemicelulose é facilmente hidrolisada em seus

monossacarídeos constituintes. A lignina, que constitui 10-20% em peso da biomassa seca, é um polímero aromático contendo resíduos fenólicos, tais como álcool trans-*p*-coumaril, álcool trans-*p*-coniferil e álcool trans- sinápico. A fração lignina, que não contribui como fonte de carbono fermentável, é uma fonte potencial de inibidores da fermentação microbiana (Van Maris *et al.*, 2006).

3 - Etapas do processo de produção de etanol celulósico

Os processos para obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos consistem basicamente em quatro etapas que serão descritas mais detalhadamente a seguir, mas de maneira resumida estas etapas envolvem: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação (Tomás-Pejó, 2008). Estas etapas são necessárias para a designificação da biomassa, liberando a celulose e hemicelulose a partir de seu complexo com a lignina; despolimerização da celulose para produzir açúcares livres e fermentação da misturas de açúcares para produzir etanol.

3.1 - Pré-tratamentos

A biomassa não tratada é extremamente recalcitrante para hidrólise enzimática, assim, uma variedade de tratamentos tem sido desenvolvidos para melhorar a sua digestibilidade. Vários estudos têm mostrado uma direta correlação entre remoção de lignina e hemicelulose e a digestibilidade da celulose (Kim, *et al.*, 2006 e Gray *et al.*, 2006). Assim, o pré-tratamento é requerido para modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica para tornar a celulose mais acessível às enzimas que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis. Um pré-tratamento eficiente pode reduzir substancialmente a quantidade de enzimas no processo de sacarificação de celulose e, conseqüentemente, os custos de produção (Mosier *et al.*, 2005).

Postula-se que os pré-tratamentos ideais têm que alcançar os seguintes objetivos: (1) aumentar a digestibilidade da biomassa; (2) evitar a degradação ou perda de carboidratos; (3) evitar a formação de inibidores

para os processos subseqüentes de hidrólise e fermentação; e (4) ser viável economicamente (Sun & Chung, 2002).

3.1.1 - Pré-tratamento ácido

O principal objetivo do pré-tratamento ácido é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e assim tornar a celulose mais acessível às enzimas. Este tipo de pré-tratamento pode ser realizado com ácido concentrado ou diluído, mas a utilização de ácidos concentrados são menos atraentes para a produção de etanol, devido à formação de compostos inibidores da fermentação, principalmente furfurais (Alvira *et al.*, 2010). Dependendo da temperatura do processo, ocorre degradação de açúcares formando furfural e hidroximetilfurfural e compostos aromáticos resultantes da degradação da lignina os quais afetam o metabolismo dos micro-organismos no processo fermentativo (Saha *et al.*, 2005).

O pré-tratamento utilizando ácido diluído pode ser realizado em altas temperaturas (por exemplo, 180°C) durante um curto período de tempo, ou em temperaturas mais baixas (por exemplo, 120° C) em um intervalo de 30 a 90 minutos. Este tipo de pré-tratamento apresenta a vantagem de converter a hemicelulose em açúcares fermentáveis (Saha *et al.*, 2005).

3.1.2 - Pré-tratamento básico

Os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para solubilizar a lignina, sem a solubilização da celulose e hemicelulose (Carvalho *et al.*, 2008). O Pré-tratamento alcalino pode ser realizado à temperatura ambiente e em tempos variados que podem ser dias dependendo da concentração da base. Ele é descrito por causar menor degradação de açúcares que o pré-tratamento ácido e mostrou-se mais eficaz para resíduos agrícolas do que materiais de madeira (Kumar *et al.*, 2009). As bases mais utilizadas neste tipo de pré-tratamento são os hidróxidos entre eles o de sódio, potássio, cálcio e amônio. O hidróxido de sódio é a base mais utilizada e análises de microscopia demonstraram que ela provoca inchaço, aumenta a superfície interna da

celulose e diminui a cristalinidade, o que provoca a desestruturação da lignina (Taherzadeh e Karimi, 2008).

3.2 - Sacarificação da celulose

Durante a etapa de sacarificação, a celulose é hidrolisada por tratamento enzimático, liberando as unidades de glicose a serem assimiladas pela levedura na etapa de fermentação.

A bioconversão da celulose em monômeros de glicose necessita da ação de celulases, que são um complexo enzimático capaz de hidrolisar celulose até moléculas de glicose. A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (Lynd *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 1997 e Castro, 2010).

Endoglucanase (EC 3.2.1.4) cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase é a enzima do complexo celulolítico responsável por iniciar a hidrólise. Tal enzima hidrolisa randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. A EnG é a enzima celulolítica responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico pela redução do GP, (Lynd *et al.*, 2002 e Castro, 2010).

O grupo das exoglucanases (ExG) é constituído por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH) (Castro, 2010).

A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase, é pouco descrita, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (Lynd *et al.*, 2002).

A CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase. Embora a IUBMB defina a CBH como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos com GP>3 em celobiose, há relatos do ataque de terminais

redutores por essa enzima. A CBH participa da hidrólise primária da fibra e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas do polímero, deixando-o mais exposto às celulasas (Zhang et al. 2004; Lynd *et al.*, 2002; Castro, 2010). A CBH ainda pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores (NR). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (Awafo, 1997).

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba as β -glicosidases, ou β -glicosídeo gluco-hidrolase (EC 3.2.1.21), que é seu nome sistemático. A BG tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (GP<7) em glicose. Assim como a CBH, também sofre inibição por seu produto de hidrólise (Castro, 2010).

Atualmente, os custos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da celulose ainda são os principais obstáculos econômicos para a comercialização da tecnologia de bioconversão da biomassa em etanol (Lynd *et al.*, 2002 e Bhat *et al.*, 1997).

3.3 - Sacarificação e fermentação separadas

Depois do pré-tratamento, a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas individualmente ou em simultâneo (Alfani *et al.*, 2000). Sacarificação e fermentação em separado é a concepção tradicional, na qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da matéria-prima, é anterior ao da fermentação. Nesse processo conhecido por SHF pode ocorrer à inibição parcial das celulasas pelo acúmulo de celobiose e glicose (Bon *et al.*, 2008).

3.4 - Sacarificação e fermentação simultâneas

Foi demonstrado que maiores rendimentos em etanol poderiam ser obtidos por sacarificação e fermentação (SSF) simultânea, em comparação

com processos de hidrólise e fermentação separadas (SHF) (Alfani *et al.*, 2000, Stenberg *et al.*, 2000 e Tomás-Pejó *et al.*, 2008). Quando a celulose foi utilizada como matéria-prima, as celulasas responsáveis pela hidrólise enzimática da biomassa foram fortemente inibidas pelos produtos da hidrólise: glicose, celobiose e dextrinas de cadeias curtas. Uma maneira de superar a inibição das celulasas é fermentar a glicose em etanol, assim que ela aparece em solução. A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) combinam hidrólise enzimática e fermentação para manter uma concentração de glicose baixa no meio, sendo assim a SSF é uma boa estratégia para aumentar a taxa global de conversão de celulose em etanol (Hari *et al.*, 2001; Bollók *et al.*, 2000; Stenberg *et al.*, 2000).

Comparado com o processo em dois estágios, com hidrólise e fermentação separada, o SSF tem diversas vantagens: (1) melhoram a taxa de hidrólise pela conversão simultânea dos açúcares que inibem a atividade das celulasas; (2) diminuem o requerimento de enzimas; (3) aumentam o rendimento; (4) diminuem o requerimento de condições estéreis, já que a glicose é removida imediatamente do meio; (5) diminuem tempo total do processo (Sun & Chieng, 2002). A principal desvantagem que precisa ser considerada no processo SSF é a incompatibilidade de temperatura de hidrólise e fermentação necessitando de cepas de micro-organismos fermentadores e termotolerantes.

4 - Leveduras termotolerantes

Micro-organismos termotolerantes, principalmente pertencentes às espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* capazes de crescer e fermentar em temperaturas acima de 40°C, têm sido isoladas e caracterizadas visando sua utilização em processos de SSF (Suryawati *et al.*, 2008; Singh, *et al.*, 2000; Banat *et al.*, 1998; Abdel-Fattah, *et al.*, 2000; Sree, *et al.*, 2000; Hari, *et al.*, 2001; Basso, *et al.*, 2008; Fonseca, *et al.*, 2008). O uso de temperaturas abaixo da atividade ótima da enzima aumenta o tempo de SSF e / ou a quantidade de enzimas utilizadas (Suryawati *et al.*, 2008). Entretanto, acima de 40°C a taxa de crescimento e produção de etanol pelas leveduras diminui consideravelmente (Sree, *et al.*, 2000).

Recentemente uma espécie de *Kluyveromyces marxianus* foi isolada do ambiente de laticínios na região da zona da mata mineira e foi nomeada *Kluyveromyces marxianus* UFV3. Trabalhos realizados por Raphael Hermano Santos Diniz no Laboratório de Fisiologia de Microorganismos/UFV mostraram que esta espécie apresentou rendimentos de etanol próximos aos valores teóricos, em condição de alta concentração de lactose e baixo nível de oxigênio indicando um potencial fermentativo superior em relação a *K. lactis* (dados não publicados). Uma espécie de *S. cerevisiae* foi coletada de uma indústria de Cachaça de Minas Gerais e isolada no Laboratório de Biotecnologia Molecular/DBB/UFV.

K. marxianus, diferente de *S. cerevisiae*, é uma levedura com metabolismo respiro-fermentativo. Sabe-se que *S. cerevisiae*, quando a concentração de açúcar é elevada, dirige preferencialmente o piruvato para a produção de etanol, embora o rendimento energético seja inferior ao que poderia ser alcançado a partir do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa. Este fenômeno é chamado de efeito Crabtree e é postulado que ele oferece uma vantagem em nichos ecológicos devido a inibição de outros micro-organismos pelo etanol (Lane, *et al.*, 2010; Piskur *et al.*, 2006). *Kluyveromyces marxianus* é classificada como Crabtree negativa, porém, possui genes necessários para a produção de etanol por fermentação e sob determinadas condições como, por exemplo, em aerobiose ou em altas concentrações de glicose adotará uma conduta fermentativa. Cepas de *K. marxianus* realizam simultaneamente a fermentação e respiração e o equilíbrio preciso entre essas vias é cepa específica. Para aplicações onde a biomassa é importante, essa diferença entre espécies de leveduras é certamente relevante. Assim, existe um espectro extremo entre leveduras Crabtree positivo e negativo, e a intensidade do efeito pode ser influenciado por fatores extrínsecos. A variação do mesmo efeito ocorre dentro de uma mesma espécie, o que explica algumas cepas de *K. marxianus* serem muito eficazes produtoras de etanol (Hong *et al.*, 2007; Nonklang *et al.*, 2008; Lane, *et al.*, 2010).

II – OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* UFV3 e *Saccharomyces cerevisiae* LBM1 em processos de sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar.

III – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar dois tipos de pré-tratamento para o bagaço de cana-de-açúcar, quanto à acessibilidade da enzima ao substrato;
- Avaliar a etapa de hidrólise, quanto ao rendimento, em relação ao tempo;
- Verificar a influência da cepa de levedura, temperatura de fermentação e do tempo e temperatura de pré-hidrólise no rendimento em etanol;
- Analisar os rendimentos do processo SSF quanto ao número de ciclos de fermentação e determinar se as leveduras permanecem ativas após sucessivos ciclos fermentativos.

IV – MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Molecular/DBB da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

1 - Linhagens e meios de cultura

As fontes e características genóticas das linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho estão apresentadas na Tabela 1. As mesmas foram mantidas em meio completo YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) com glicerol 40% (v/v) a -80°C ou quando utilizadas com frequência, em placas de YPD sólido (2 % Agar) a 4°C.

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas neste projeto.

Linhagem	Genótipo	Fonte
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV3	Selvagem	Laboratório de Fisiologia de micro- organismos/UFV
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> LBM1	Selvagem	Laboratório de Biotecnologia Molecular/UFV

2 – Avaliação do crescimento das leveduras

2.1 – Avaliação do crescimento em meio sólido

Para o ensaio de crescimento em diferentes temperaturas as cepas de *S. cerevisiae* LBM-1 e *K. marxianus* UFV-3 foram previamente crescidas em meio YPD (2% glicose), sob agitação de 180 rpm a 28°C. Diluições seriadas (1:1, 1:10 e 1:100) foram preparadas, em solução salina NaCl 0,85% (p/v), a partir de culturas com D.O_(600nm) 0,5. Um volume de 5µl da cultura de cada diluição (1:1, 1:10 e 1:100) foi aplicado em placas YPD sólido (2% Agar e 4% glicose). As placas foram incubadas nas seguintes temperaturas: 30, 37, 42 e 45°C por 72 horas.

2.2 – Avaliação do crescimento em meio líquido

Ensaio de crescimento foram realizados em microplacas de 96 poços contendo meio YPD (4% glicose). As cepas de *S. cerevisiae* LBM-1 e *K. marxianus* UFV-3 foram previamente crescidas em meio YPD (2% glicose), sob agitação de 180 rpm a 28°C. A partir do pré-inóculo foram feitas diluições em solução salina para que a D.O_(600nm) inicial de todas as cepas fosse 0,1. Cada cepa foi inoculada em meio YPD líquido (4% glicose), sendo que o volume final foi 200µl e cada ensaio foi feito em triplicata. As placas foram vedadas usando plástico (*Platamax- axysel sealing film, Axygen*) e incubadas na leitora Versamax (*microplate reader, Molecular Devices*) nas temperaturas de 30, 37, 42 e 45, por 16 horas. As Densidades ópticas foram medidas em intervalos de 15 minutos.

3 - Pré-tratamentos

3.1 - Matéria prima

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi cedido pelo professor Márcio Henrique Pereira Barbosa do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

3.2 - Pré-tratamento ácido

O bagaço de cana triturado, na concentração 10% (p/v) foi submetido a um pré-tratamento em 100mL de solução de ácido sulfúrico 0,5% a 121°C por 30 minutos em autoclave. Posteriormente o líquido foi coletado por filtração a vácuo e o resíduo sólido foi lavado com 500mL de água deionizada quente seguido de secagem a 50°C por 24 horas. O sólido obtido foi denominado de celulignina.

3.3 - Pré-tratamento ácido/básico

O bagaço de cana de açúcar triturado, na concentração 10% (p/v) foi submetido a um pré-tratamento em solução de ácido sulfúrico nas mesmas condições descritas no item anterior. Em seguida, o líquido foi coletado por filtração a vácuo e o resíduo sólido foi submetido ao pré-tratamento em

100mL de solução de hidróxido de sódio 4% (p/v) a 121°C por 30 minutos em autoclave. Posteriormente o bagaço foi lavado com 500mL de água deionizada quente seguido de secagem a 50°C por 24 horas. O sólido obtido foi denominado celulose.

3.4 - Comparação entre os pré-tratamentos

Para selecionar o pré-tratamento mais eficiente, ácido ou ácido/básico, foi realizada uma hidrólise enzimática para analisar o rendimento, em relação ao tempo de incubação. As frações sólidas obtidas dos pré-tratamentos foram utilizadas na concentração 8% (p/v). A hidrólise foi realizada a 42°C em tampão citrato 50mM pH 4,8 por 24 horas sob agitação a 180 rpm utilizando enzima comercial (Celluclast 1.5 L, Novozyme) na concentração 15FPU por grama de substrato. Alíquotas foram coletadas após 24 horas de hidrólise para análise da concentração de glicose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4 - Padronização das condições de hidrólise

4.1 - Hidrólise da biomassa

Antes do processo de SSF foi feito um teste para avaliar a etapa de hidrólise, quanto ao seu rendimento em relação ao tempo. A fração sólida obtida do pré-tratamento ácido/básico foi utilizada na concentração 8% (p/v). A hidrólise foi realizada a 50°C em tampão citrato 50mM pH 4,8 por 72 horas sob agitação a 180 rpm. Utilizou-se enzima comercial (Celluclast 1.5 L, Novozyme) na concentração 15FPU por grama de substrato. Alíquotas foram retiradas a cada 12 horas para análise da concentração de glicose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A hidrólise também foi realizada a 37 e 42°C nas mesmas condições descritas acima. Após 24 horas alíquotas foram coletadas para análise da concentração de glicose por HPLC.

5 - Sacarificação e fermentação simultâneas

5.1 - Microorganismos e condições de crescimento

As células de *K. marxianus* UFV3 e *S. cerevisiae* LBM1 foram pré-ativadas pelo crescimento em frascos erlenmeyers de 50mL contendo tampão citrato 5 mM pH 4,8 acrescido de extrato levedura (2,5 g/L); peptona (2,5 g/L); NH₄Cl (2g/L); KH₂PO₄ (1 g/L); MgSO₄7H₂O (0,3 g/L) e de glicose (30 g/L) sob agitação a 180 rpm por 16h a 28 ° C.

5.2 - Sacarificação e fermentação simultâneas a 37 e 42°C

Experimentos de SSF foram realizados em frascos erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 30 mL do meio de fermentação (sem glicose), como descrito anteriormente sob agitação a 180 rpm. A fração sólida obtida do pré-tratamento foi utilizada como substrato na concentração 8% (p/v). Inicialmente foi feito uma pré-hidrólise por 24 e 72 horas a 37 e 42°C utilizando enzima comercial (Celluclast 1.5 L) na concentração 15FPU por grama de substrato. Ensaio SSF foram realizados sob condições estéreis e a fermentação foi realizada a 37 e 42°C utilizando as leveduras em uma DO_(600nm) inicial igual a 2. Alíquotas foram coletadas para análise de consumo de glicose e produção de etanol por cromatografia líquida de alta eficiência.

5.3 - Sacarificação a 50°C e fermentação a 37 e 42°C

Experimentos de SSF foram realizados como descritos anteriormente. Exceto que inicialmente foi feito uma pré-hidrólise da biomassa pré-tratada 50°C por 24 e 72 horas utilizando enzimas nas mesmas concentrações anteriores. Os ensaios SSF foram realizados a 37 e 42°C com a mesma quantidade de leveduras.

6 - Ciclos de fermentação

As cepas de leveduras *K. marxianus* UFV-3 e *S. cerevisiae* LBM-1 foram avaliadas no processo SSF quanto ao número de ciclos de fermentação. A fermentação foi realizada como descrito anteriormente.

Inicialmente foi feito uma pré-hidrólise por 24 horas e após 8 horas de fermentação o meio foi centrifugado por 5 minutos a 3000g sobrenadante foi descartado e as leveduras foram utilizadas em um novo ciclo de fermentação. Alíquotas foram coletadas no início e no final de cada ciclo de fermentação para análise de consumo de glicose e produção de etanol por (HPLC).

7 - Parâmetros fermentativos

O rendimento em gramas de etanol por gramas de biomassa pré-tratada utilizada ($Y_{E/C}$) foi calculado ao final de 8 horas de fermentação dividindo-se a diferença da massa final e inicial de etanol (g) pela massa inicial de biomassa pré-tratada (g). ($Y_{E/C}$ = massa final – massa inicial de etanol/ massa inicial de biomassa pré-tratada).

8 - Parâmetros de hidrólise

O rendimento em gramas de glicose por gramas de biomassa pré-tratada utilizada ($Y_{G/C}$) foi calculado ao final da pré-hidrólise dividindo-se a diferença da massa final e inicial de glicose (g) pela massa inicial de celulose (g). ($Y_{G/C}$ = (massa final – massa inicial de glicose/ massa inicial de biomassa pré-tratada).

9 - Relação entre absorvância a 600 nm (A600) e massa celular seca (g/L)

As cepas de *S. cerevisiae* LBM-1 e *K. marxianus* UFV-3 foram previamente crescidas em 25mL de meio YPD (2% glicose), sob agitação de 180 rpm a 28°C por 16 horas. As culturas foram centrifugadas a 5.000 g por 5 minutos e lavadas com 30mL de solução salina NaCl 0,85% (p/v). O passo anterior foi repetido por mais uma vez. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em 5mL de solução salina e procedeu-se à diluição seriada em duplicata, sendo que para cada diluição foi medida a respectiva $D.O._{(600nm)}$. Um volume de 2mL de cada diluição foi adicionado ao cadinho, e foi dado prosseguimento à secagem em estufa a 100°C. Os cadinhos foram pesados em balança analítica até atingirem peso constante. Este

experimento foi realizado em duplicata biológica e os dados obtidos foram a média entre as duplicatas. O resultado da análise foi expresso em massa celular seca (g/L). A regressão linear entre massa celular seca (g/L) e $D.O._{(600nm)}$ permitiu a determinação da massa celular seca.

10 - Métodos analíticos

10.1 - Determinação das concentrações de glicose e etanol

A quantificação de glicose e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (Bio-Rad), mantido a 60°C. O eluente para a separação foi solução de ácido sulfúrico 5mM, aplicado a uma taxa de eluição 0.7mLmin⁻¹. A coluna foi acoplada ao detector de índice de refração HP 1047 A.

Na montagem dos métodos foram preparados padrões de 5, 6,25, 10, 12,5 e 20mM para glicose e 10, 12,5 20 e 40mM para etanol. As amostras, quando necessário, foram diluídas. As concentrações determinadas permitiram calcular o consumo de glicose e produção de etanol ao longo do tempo de fermentação.

11 - Análises estatísticas

Todos os experimentos apresentados foram realizados pelo menos três vezes e a utilizados para o cálculo das médias e dos desvios. A influência dos fatores tempo de pré-hidrólise, temperatura de fermentação e cepa de leveduras sobre o rendimento em etanol foi avaliada utilizando-se ANOVA ($\alpha=0,05$) seguida de teste t ($\alpha=0,05$) para efeitos principais e de interações de cada fator. As análises e construção de gráficos para médias de efeitos foram realizadas no programa MINITAB15 versão demonstração (Minitab, 2007)

Os dados relativos à comparação dos pré-tratamentos, pré-hidrólise e fermentação foram analisados utilizando-se ANOVA ($\alpha=0,05$) seguida de teste Duncan para médias ($\alpha=0,05$) no software SAEG versão demonstração (SAEG 9.1, 2007).

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Pré-tratamentos

O bagaço de cana foi pesado antes e depois de cada pré-tratamento. Ao final do pré-tratamento ácido obteve-se um rendimento de 55% em relação à massa da biomassa inicial, enquanto que com o pré-tratamento ácido/básico obteve-se um rendimento de 30%. O bagaço de cana de açúcar contém cerca de 19-24% de lignina, 27-32% de hemiceluloses, 32-44% de celulose e 4,5-9,0% de cinzas (Soccol *et al.*, 2009). Portanto, o rendimento do pré-tratamento em relação à composição do bagaço está de acordo com os dados da literatura, onde o tratamento ácido retirou cerca de 45% da massa inicial que equivalem a fração hemicelulose. O tratamento ácido/básico retirou além da fração hemicelulose a fração lignina que representa aproximadamente 30% da biomassa. Portanto o rendimento final de 30% está compatível com a perda de 70% da massa e equivale a fração celulose do bagaço.

A fim de verificar quais dos pré-tratamentos foram mais efetivos, em termos de acessibilidade da enzima ao substrato, foi feita a hidrólise da celulignina e da celulose. Após 24 horas de hidrólise a 42°C utilizando 8% (p/v) de bagaço pré-tratado 15 FPU de celulases por grama de substrato houve liberação de 8,9 g/L de glicose (tratamento ácido) e 18,36 g/L (tratamento ácido/básico) (Figura 2). A comparação das médias dos rendimentos de glicose para os dois tratamentos são significativamente diferentes segundo ANOVA (p-Valor=0,005) (Anexo 2).

A quantidade de glicose liberada quando se utilizou o bagaço deslignificado, foi cerca de duas vezes maior que a quantidade de glicose formada com o bagaço não deslignificado. Com a remoção da lignina e da hemicelulose a celulose ficou mais acessível às enzimas na etapa da hidrólise, sendo que a presença da lignina limita o processo de difusão da enzima no substrato e, conseqüentemente, a liberação de glicose (Santos *et al.*, 2008).

Vásquez e colaboradores (2007) observaram o mesmo efeito ao comparar o pré-tratamento ácido (ácido sulfúrico) e o pré-tratamento ácido/básico (ácido sulfúrico e hidróxido de sódio). Neste trabalho após 24 horas de hidrólise a 50°C utilizando 7% (p/v) de bagaço e 20 FPU de celulasas por grama de substrato observou-se aproximadamente 10 g/L e 20g/L de glicose com o pré-tratamento ácido e ácido/básico respectivamente. Santos e colaboradores (2010) comparando dois tipos de pré-tratamento para o bagaço de cana de açúcar obteve após 24 horas de hidrólise, aproximadamente 20 g/L de glicose (pré-tratamento explosão a vapor) e 40 g/L de glicose (pré-tratamento explosão a vapor/ pré-tratamento com NaOH). Entretanto, neste ensaio foram utilizados 30 FPU de celulasas e 20 CBU de β -glicosidase por grama de substrato. Realizando a hidrólise nas mesmas condições que Santos e colaboradores (2010), obtivemos aproximadamente os mesmos 20 g/L de glicose.

Dessa forma o pré-tratamento ácido/básico foi selecionado para ser utilizado nos experimentos posteriores, uma vez que apresentou melhores resultados na hidrólise.

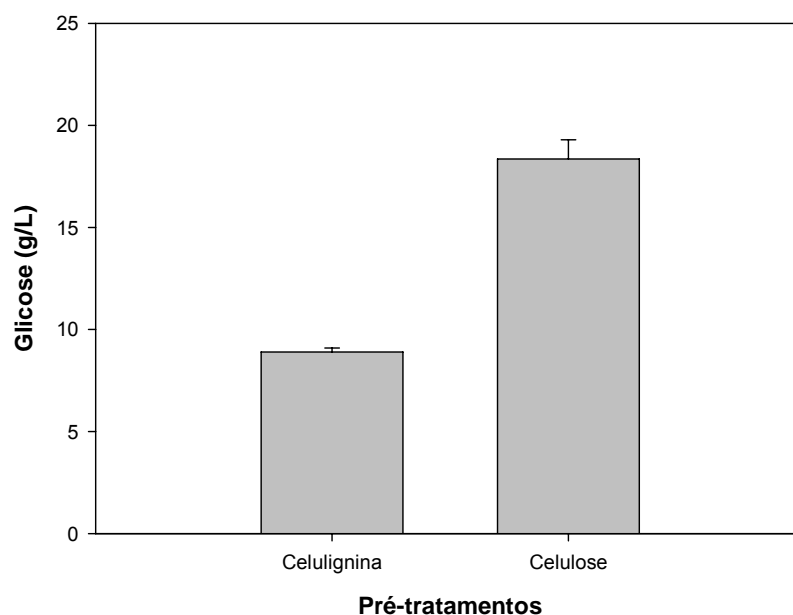


Figura 2 – Concentração de glicose em g/L após 24 horas de hidrólise a 42°C da biomassa pré-tratada com ácido (celulignina) ou com ácido/base (celulose).

2 - Sacarificação e fermentação

2.1 - Pré-hidrólise da celulose

No processo de sacarificação e fermentação simultâneas, diferentemente do processo em separado, a hidrólise e a fermentação ocorrem simultaneamente. Entretanto, antes de se inocular as leveduras e iniciar a fermentação a biomassa deve ser submetida a uma pré-hidrólise. A função da pré-hidrólise é fornecer uma fonte de carbono inicial para a levedura, uma vez que a biomassa está na forma de polímero que não é uma fonte de carbono diretamente fermentável.

Diante disso, foi feito um teste para se avaliar a etapa de hidrólise, quanto ao rendimento em relação ao tempo e com isso determinar o melhor tempo para se inocular a levedura e iniciar a fermentação. A hidrólise foi realizada a 50°C durante 72 horas. Pela análise da figura 3, percebe-se, que após 48 horas de hidrólise a taxa de liberação de glicose diminui. É razoável admitir que neste tempo as celulases começam a ser inibidas pelos produtos de hidrólise, glicose e celobiose. Entretanto, com 24 horas de hidrólise a 50°C, tem-se aproximadamente 2% de glicose, as celulases não foram inibidas pelos produtos de hidrólise e a quantidade de glicose liberada é suficiente para início da fermentação (Figuras 3). O mesmo teste de hidrólise foi feito para as temperaturas de 37 e 42°C. Após 24 horas de hidrólise obteve-se 12,72 g/L de glicose a 37°C e 16,19 g/L a 42°C (Figura 4). A comparação das médias dos rendimentos de glicose para os três tratamentos são significativamente diferentes de acordo com ANOVA (p-Valor=0,05) seguida do teste de média de DUNCAN (alfa=0,05) (Tabela 2) (Anexo 4). Os resultados deixam claro, como era esperado, que o aumento da temperatura leva a um aumento na conversão enzimática da celulose.

Assim, 24 horas de pré hidrólise nas temperaturas de 37, 42 e 50°C foram os parâmetros escolhidos para esta etapa do processo.

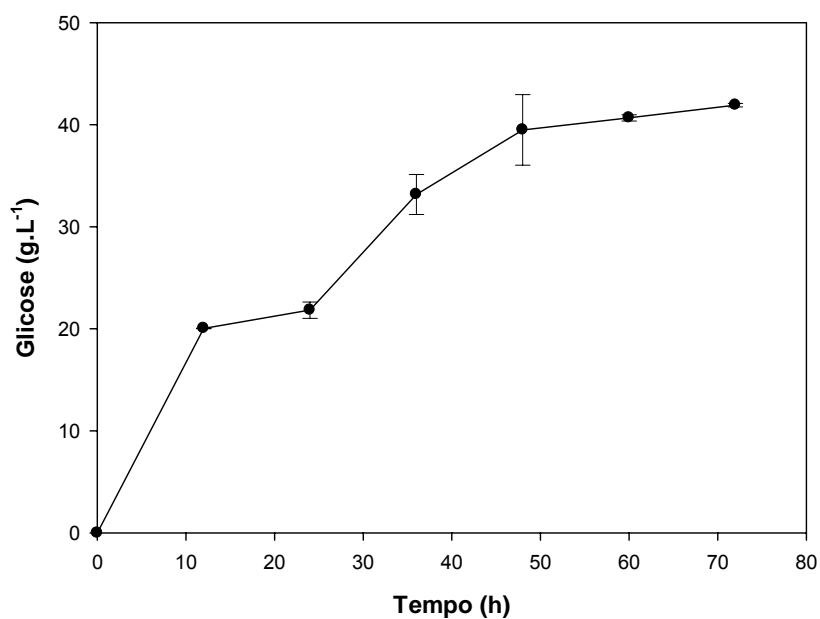


Figura 3 – Concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise a 50°C da biomassa pré-tratada.

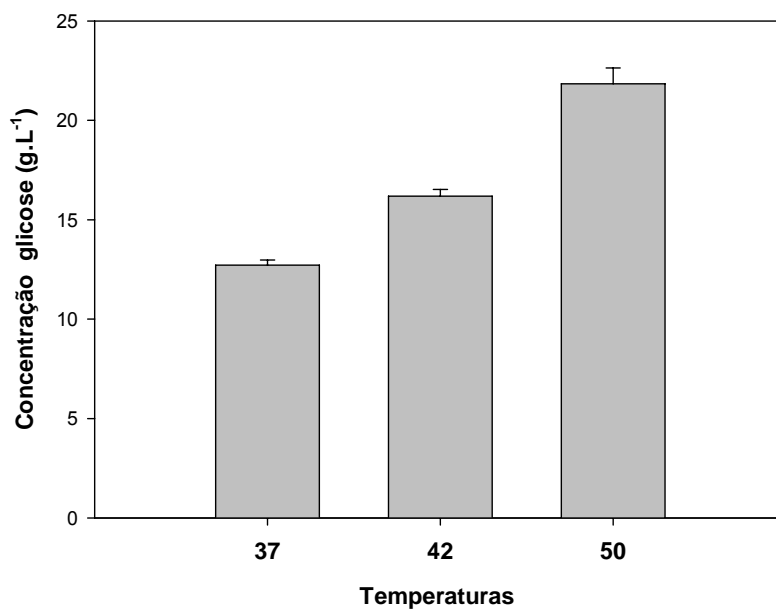


Figura 4 - Concentração de glicose em g/L após 24 horas de hidrólise a 37, 42 e 50°C da biomassa pré-tratada.

Tabela 2 - Comparação das dos rendimentos de glicose ($Y_{E/B}$) após 24 horas de pré-hidrólise em diferentes temperaturas.

Temperaturas (°C)	$Y_{E/B}$
50	0,5030 A
42	0,1943 B
37	0,1526 C

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($\alpha=0,05$) pelo teste de DUNCAN.

2.2 - Fermentação

Após verificar a temperatura e o tempo que seriam utilizados na pré-hidrólise, foi realizado um ensaio de crescimento para verificar a capacidade das leveduras *K. marxianus* UFV-3 e *S. cerevisiae* LBM-1 crescerem em temperaturas acima de 37°C, e assim determinar quais as temperaturas que seriam utilizadas na etapa da fermentação do processo SSF. Após 72 horas de crescimento em meio YP sólido (4% glicose) verificou-se que as duas cepas foram capazes de crescer nas temperaturas de 30, 37 e 42°C em todas as diluições e apenas a UFV-3 foi capaz de crescer 45°C (Figura 5).

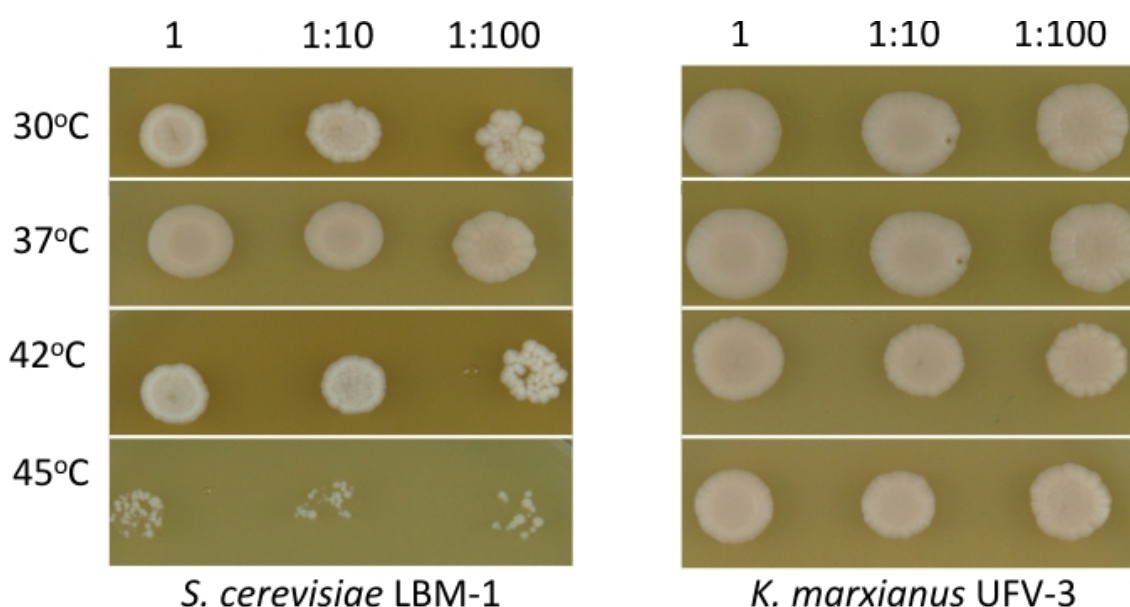


Figura 5 – Crescimento das cepas *S. cerevisiae* LBM-1 e *K. marxianus* UFV-3 em meio sólido YPD (4% glicose) por 72 horas a 30, 37, 42 e 45°C. os números acima da figura representam as diluições de uma cultura com D.O 600 nm igual a 0,5. para detalhes ver o item 2.1 de Material e métodos.

Como a fermentação ocorre em meio líquido, analisamos o comportamento das cepas em meio líquido nas mesmas temperaturas. Como pode ser observado nas figuras 6 e 7, as duas cepas foram capazes de crescer nas temperaturas de 30 e 37°C. Nota-se que elas apresentam uma fase lag (fase de adaptação) com um curto período de duas horas atingindo D.O. _(600nm) máxima acima de 1. Analisando a tabela 3 percebe-se que a 42°C a velocidade de crescimento de *K. marxianus* UFV-3 é maior que *S. cerevisiae* LBM-1. Assim como no experimento em meio sólido, a 45°C somente *K. marxianus* UFV-3 foi capaz de crescer. Entretanto, quando se compara a velocidade de crescimento desta cepa em diferentes temperaturas percebe-se que o crescimento é menor a 45°C (Tabela 3).

Espécies termotolerantes do gênero *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, capazes de crescer e fermentar em temperaturas acima de 40°C, têm sido isoladas e caracterizadas visando sua utilização em processos de SSF. Existem vantagens que podem ser exploradas com uso de temperaturas mais altas no processo, como economia de energia através de uma redução no custo de resfriamento e rendimentos mais elevados na sacarificação. Entretanto, acima de 40°C, a viabilidade das culturas de leveduras diminui consideravelmente, o que afeta a produção de etanol (Suryawati *et al.*, 2008).

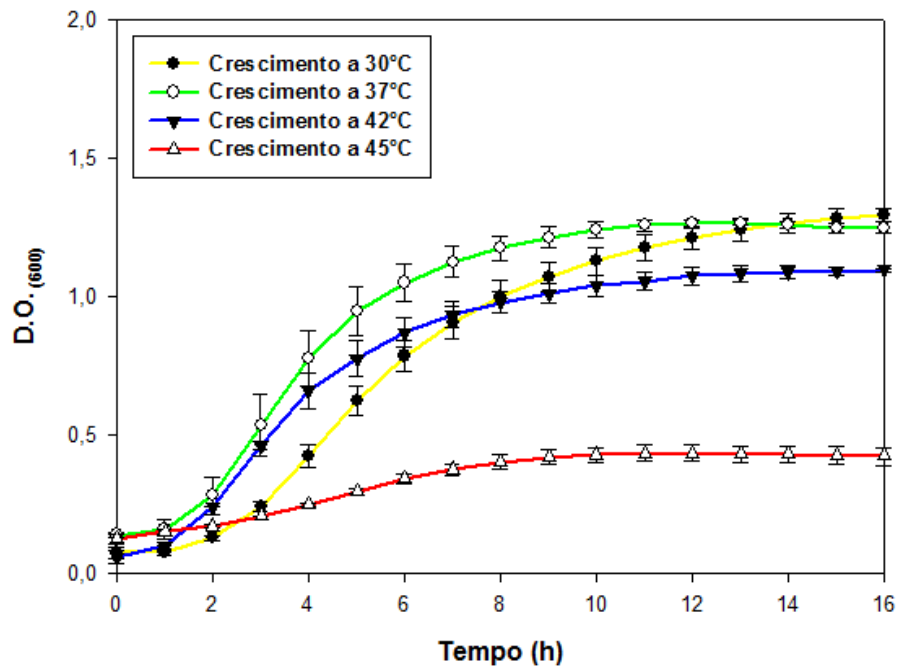


Figura 6 – Crescimento de *K. marxianus* UFV-3 em meio líquido YPD (4% glicose) por 16 horas a 30, 37, 42 e 45°C.

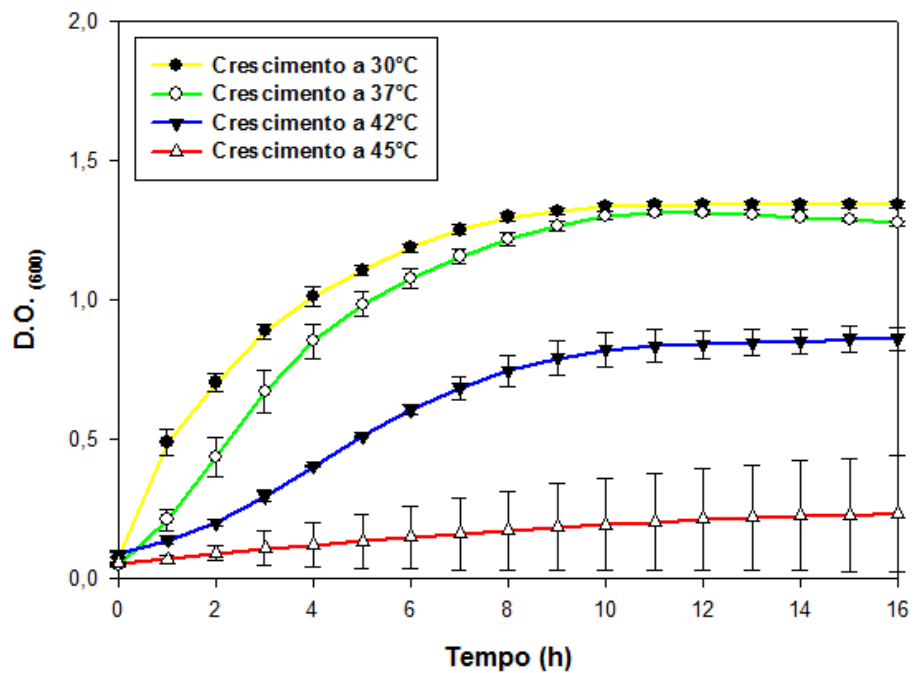


Figura 7 – Crescimento de *S. cerevisiae* LBM-1 em meio líquido YPD (4% glicose) por 16 horas a 30, 37, 42 e 45°C.

Tabela 3 - Velocidade específica de crescimento (μ) e D.O.₍₆₀₀₎ máxima em microplacas contendo meio YPD 4% em diferentes temperaturas.

Cepas	$\mu \text{ h}^{-1}$				D.O. ₍₆₀₀₎			
	Temperaturas				Temperaturas			
	30°C	37°C	42°C	45°C	30°C	37°C	42°C	45°C
LBM-1	0,126	0,218	0,274	0,114	1,18	1,08	0,61	0,15
UFV-3	0,456	0,401	0,384	0,174	0,79	1,05	0,87	0,34

Diante dos resultados obtidos, optou-se por utilizar as temperaturas de 37 e 42°C na etapa de fermentação, devido ao bom crescimento das cepas nessas temperaturas. A avaliação dos rendimentos do processo utilizando temperaturas de 37 e 42°C também para a etapa de pré-hidrólise foram calculados visando a possibilidade do não resfriamento do meio para a fermentação o que seria de grande interesse para o processo.

3 - Sacarificação e fermentação simultâneas

Com a padronização dos experimentos para o processo SSF selecionou-se:

- O pré-tratamento ácido/básico;
- As temperaturas de 37, 42 e 50°C e um tempo de 24 horas para pré-hidrólise;
- As temperaturas de 37 e 42°C para a fermentação.

De posse destes dados analisamos a influência da temperatura de pré-hidrólise e fermentação no rendimento de etanol em processo SSF do bagaço de cana de açúcar utilizando as cepas *K. marxianus* UFV-3 e *S. cerevisiae* LBM-1 como organismos fermentadores. A figura 8 representa o desenho esquemático do planejamento experimental para o processo SSF.

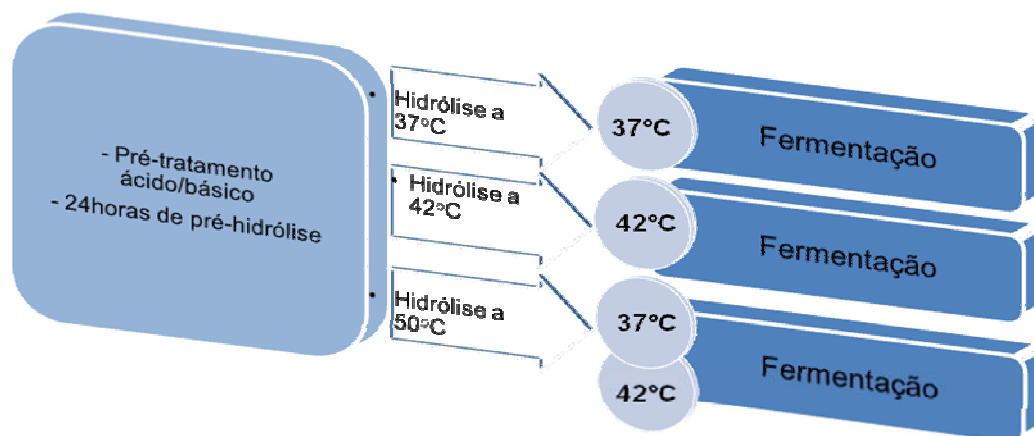


Figura 8 - Desenho esquemático representando os parâmetros selecionados para a realização dos experimentos de SSF.

Após as 24 horas de pré-hidrólise iniciou-se a fermentação com D.O. (600nm) inicial igual a 2. Aliquotas foram retiradas a cada duas horas para análise de consumo de glicose e produção de etanol durante o período de 10 horas.

Quando a pré-hidrólise e a fermentação foram realizadas a 37 °C obteve-se 6,12 g/L de etanol para *S. cerevisiae* LBM-1 e 6,14 g/L para *K. marxianus* UFV-3 (Figura 9). No ensaio realizado a 42°C as duas cepas apresentaram o mesmo perfil fermentativo e concentrações semelhantes de etanol foram obtidas no final do processo (Figura 10). Entretanto, com a pré-hidrólise a 50°C seguida de fermentações a 37 e 42°C obteve-se concentrações maiores de etanol (Figura 11 e 12).

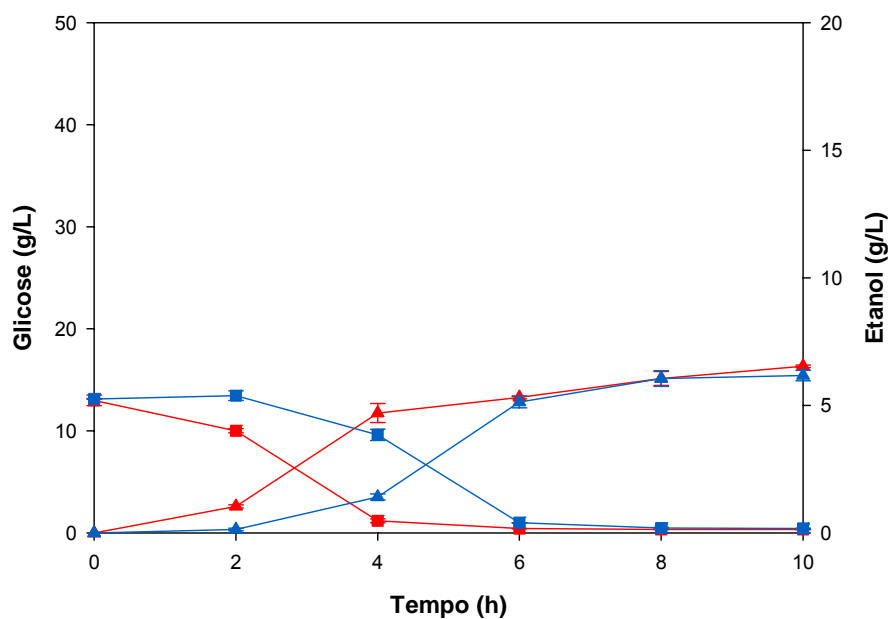


Figura 9 - Consumo de glicose e produção de etanol a 37°C durante 10 horas em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 37°C. (■) UFV-3 /glicose, (▲) UFV-3 /etanol, (■) LBM-1 /glicose, (▲) LBM-1 /etanol.

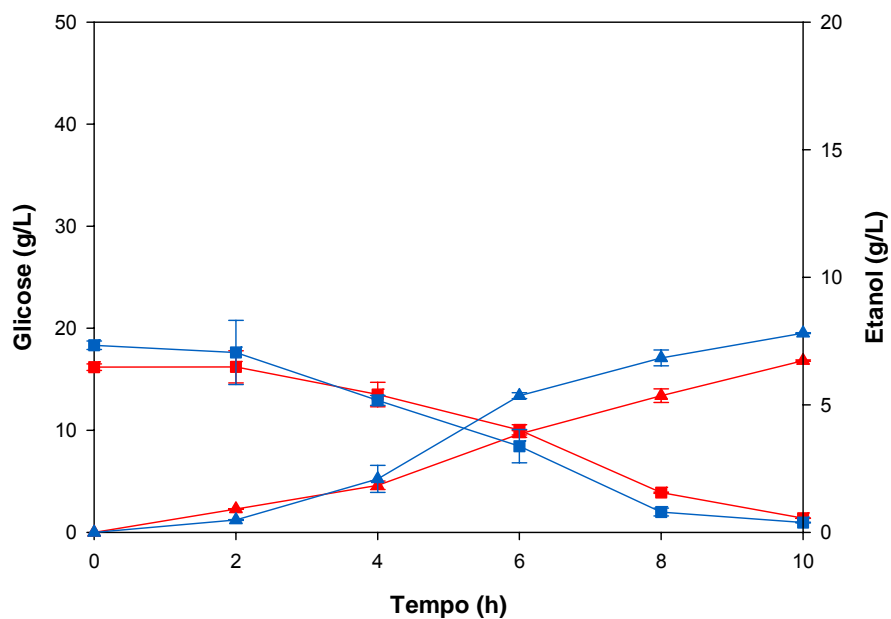


Figura 10 - Consumo de glicose e produção de etanol a 42°C durante 10 horas em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 42°C. (■) UFV-3 /glicose, (▲) UFV-3 /etanol, (■) LBM-1 /glicose, (▲) LBM-1 /etanol.

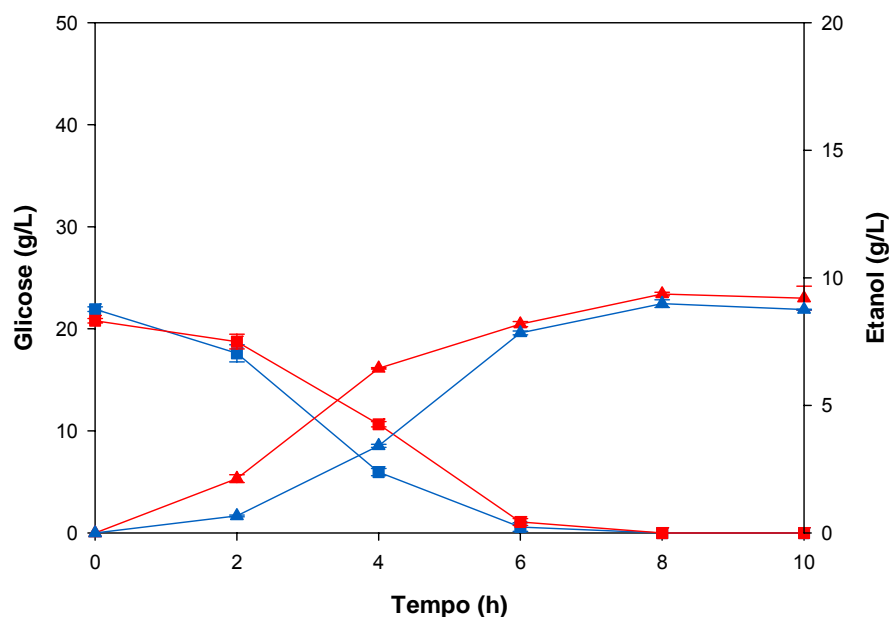


Figura 11 - Consumo de glicose e produção de etanol a 37°C durante 10 horas em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 50°C. (■) UFV-3 /glicose, (▲) UFV-3 /etanol, (■) LBM-1 /glicose, (▲) LBM-1 /etanol.

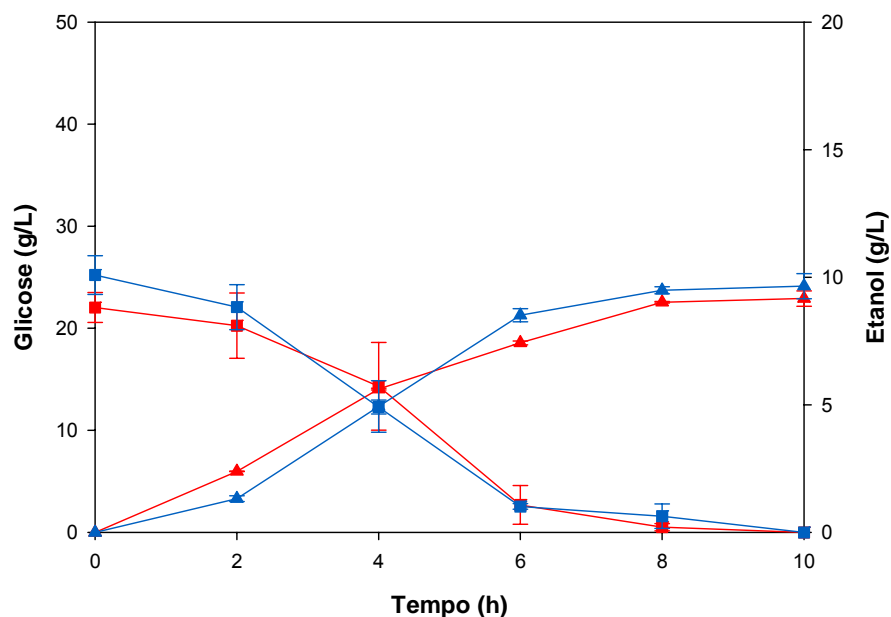


Figura 12 - Consumo de glicose e produção de etanol a 42°C durante 10 horas em processo SSF após 24 horas de hidrólise a 50°C. (■) UFV-3 /glicose, (▲) UFV-3 /etanol, (■) LBM-1 /glicose, (▲) LBM-1 /etanol.

Analisando a Tabela 4, percebe-se que o rendimento foi maior quando a fermentação foi iniciada após uma pré-hidrólise a 50°C, e o fator que está influenciando o rendimento de etanol pelas duas cepas não é a temperatura

de fermentação e sim a temperatura de pré-hidrólise. Neste caso, as médias dos rendimentos em etanol não são significativamente diferentes de acordo com o teste de média de DUNCAN ($\alpha=0,05$).

Tabela 4 - Comparação dos rendimentos de etanol em relação a biomassa pré-tratada (YE/B) em diferentes temperaturas de pré-hidrólise e fermentação para LBM-1 e UFV-3.

Temperatura de pré-hidrólise	Temperatura de fermentação	YE/B (LBM-1)	YE/B (UFV-3)
37	37	0,0734 A	0,0737 A
42	42	0,0643 B	0,0821 A
50	37	0,1124 C	0,1079 C
50	42	0,1082 C	0,1139 C

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($\alpha=0,05$) pelo teste de DUNCAN.

Embora na temperatura de 42°C ocorra uma maior liberação de glicose, a 37°C as cepas fermentam melhor. Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Biotecnologia Molecular por Daniela Arruda Costa, comparando a capacidade de fermentar glicose de *K. marxianus* UFV-3 e *S. cerevisiae* LBM-1 mostraram que o rendimento em etanol é maior a 37°C (dados não publicados).

Pela análise dos dados obtidos dos ensaios anteriores, supõe-se que o rendimento em etanol seja dependente da concentração inicial de glicose. Para testar essa hipótese, foi feito outro experimento de SSF no qual a fermentação foi iniciada após 72 horas de pré-hidrólise a 50°C. Analisando a figura 3 nota-se que com 72 horas de hidrólise a concentração de glicose é 40 g/L e possivelmente as celulases já estão sendo inibidas pelos produtos de hidrólise em especial glicose e celobiose. Após as 72 horas de pré-hidrólise iniciou-se a fermentação com D.O. ($_{600nm}$) inicial igual a 2. Com 8 horas de fermentação a concentração de glicose foi próxima de zero e não foram observados incrementos adicionais na produção de etanol. A concentração final de etanol foi aproximadamente 15 g/L (Figura 13 e 14). O rendimento em etanol foi maior quando a fermentação foi conduzida após 72 horas de pré-hidrólise quando comparado a 24 horas (Tabelas 4 e 5).

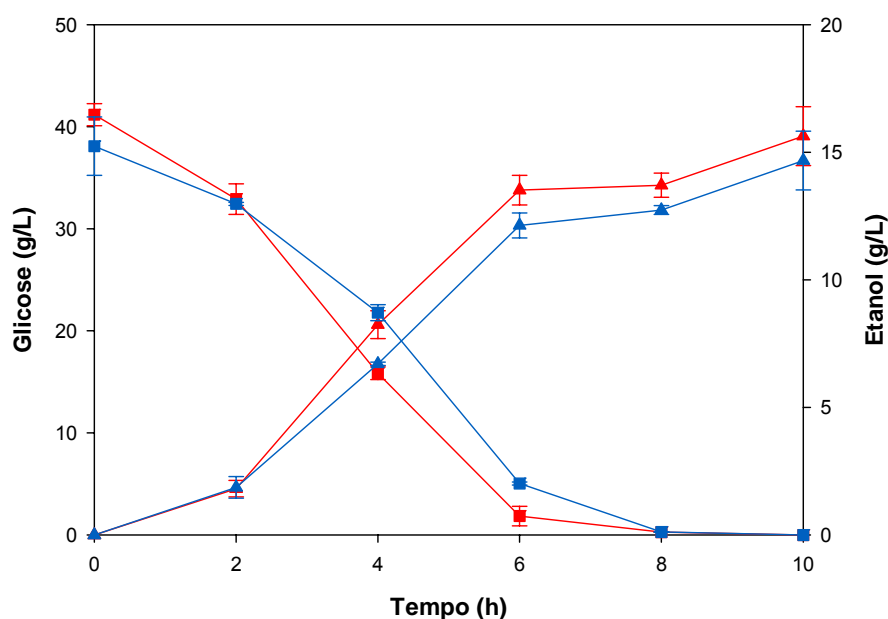


Figura 13 - Consumo de glicose e produção de etanol a 37°C durante 10 horas em processo SSF após 72 horas de hidrólise a 50°C. (■) UFV-3 /glicose, (▲) UFV-3 /etanol, (■) LBM-1 /glicose, (▲) LBM-1 /etanol.

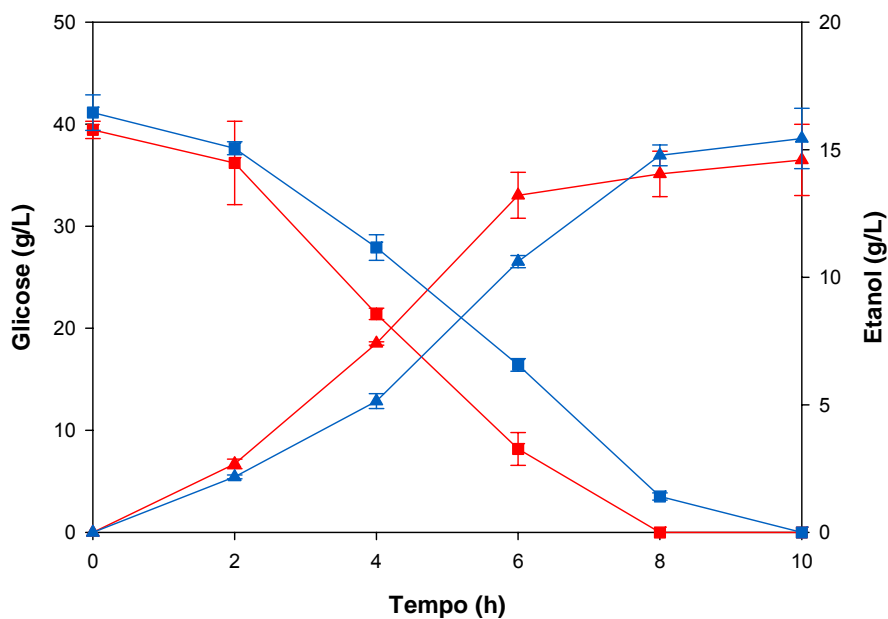


Figura 14 - Consumo de glicose e produção de etanol a 42°C durante 10 horas em processo SSF após 72 horas de hidrólise a 50°C. (■) UFV-3 /glicose, (▲) UFV-3 /etanol, (■) LBM-1 /glicose, (▲) LBM-1 /etanol.

De posse dos resultados de SSF em diferentes tempos de pré-hidrólise para as duas cepas, avaliaram-se a influência dos fatores quantitativos tempo de pré-hidrólise e temperatura de fermentação e do fator

qualitativo cepas de leveduras sobre o rendimento em etanol. Para tanto, utilizou-se análise de variância (ANOVA) seguida de teste t para os efeitos, ambas com um nível de significância $\alpha=0,05$ (Anexo 5 e 6), permitindo a avaliação dos efeitos isolados de cada fator (efeitos principais) e das interações entre eles. Segundo esta análise, os fatores tempo de hidrólise e temperatura de fermentação tiveram influência significativa sobre o rendimento (figura 15), observando-se ainda a existência de interação complexa entre a temperatura de fermentação e a cepa de levedura (figura 16).

Analisando a Figura 15 percebe-se que o tempo de hidrólise exerceu forte influência sobre o rendimento em etanol no processo SSF. Este resultado indica que o abaixamento da temperatura antes das enzimas serem inibidas pelos seus substratos diminui muito o rendimento do processo.

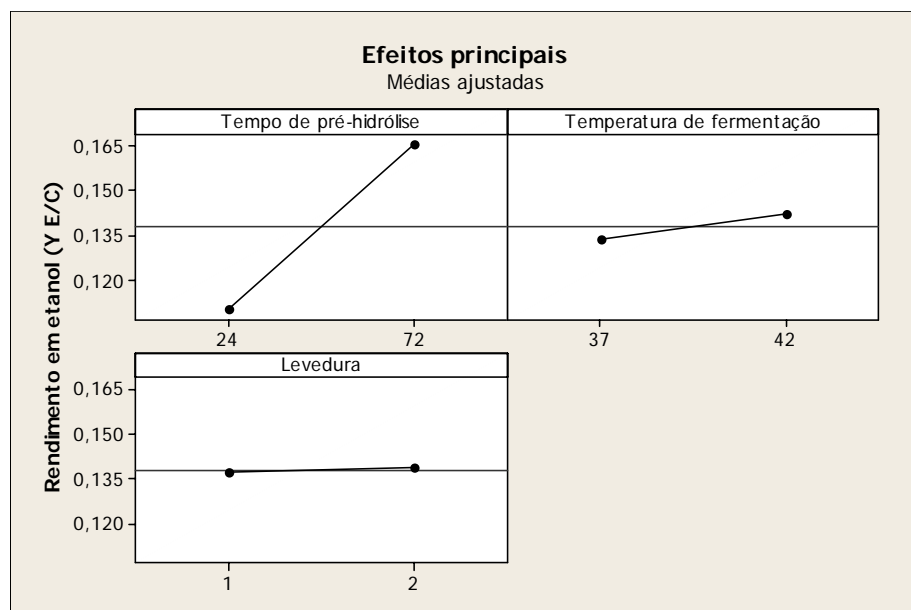


Figura 15 – Gráfico das médias ajustadas mostrando a influência dos efeitos principais: tempo de pré-hidrólise, temperatura de fermentação e levedura LBM-1 (1) e UFV-3 (2) no rendimento em etanol do processo SSF.

A Figura 16 mostra a interação para os fatores temperatura de fermentação e cepas de leveduras, a interseção das retas evidencia a interação complexa entre estes fatores. Desta forma, a melhor temperatura de fermentação para a levedura *S. cerevisiae* foi 37°C, ao passo que para *K. marxianus* foi 42 °C. Além disso, pode-se verificar que o maior rendimento

em etanol foi obtido por *K. marxianus* a 42°C. Os valores representados na figura 15 são relativos às médias dos valores de rendimento em etanol das pré-hidrólises com 24 e 72 horas para as duas cepas. Portanto, quando se calcula o rendimento em etanol das duas cepas com 72 horas de hidrólise esse valor é maior (Tabela 5).

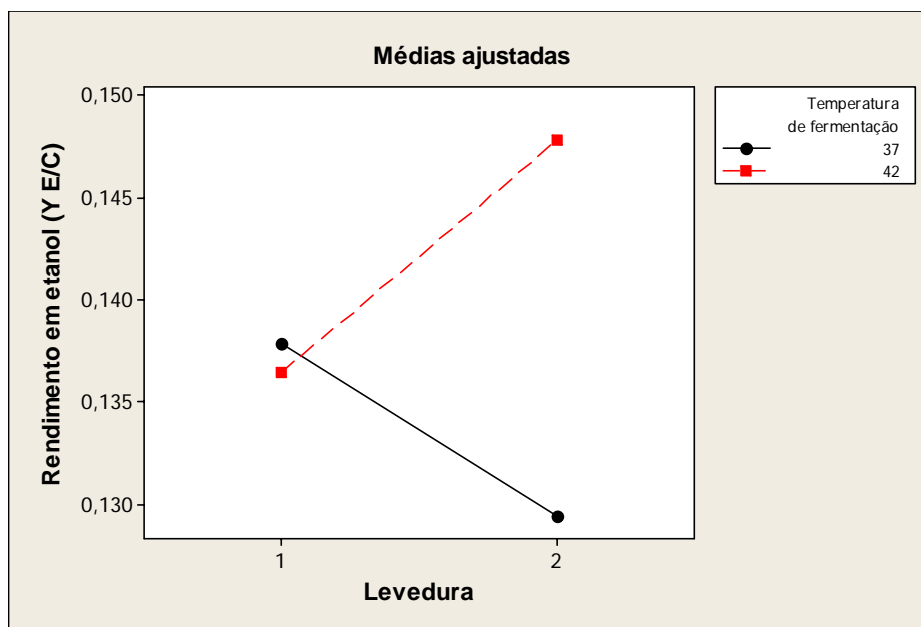


Figura 16 – Gráfico das médias ajustadas da interação entre os fatores: temperatura de fermentação e leveduras LBM-1 (1) e UFV-3 (2).

Na tabela 5 estão representados valores de rendimento em etanol obtidos por processos SSF utilizando cepas de leveduras termotolerantes das espécies *S. cerevisiae* e *K. marxianus*. Analisando os valores de rendimento em etanol obtidos neste experimento para LBM-1 e UFV-3 (Tabela 5), nota-se que foram próximos aos isolados de *S. cerevisiae* e *K. marxianus* já descritos na literatura. Analisando a tabela 5 verificam-se rendimentos maiores para algumas cepas quando comparado a LBM-1 e UFV-3. Entretanto, tais rendimentos foram obtidos com o uso de uma maior carga enzimática na hidrólise, principalmente de β -glicosidase, visando diminuir a inibição das celulasas pelo acúmulo de celobiose.

Vale ressaltar, que os cálculos dos rendimentos em etanol de grande parte trabalhos descritos na literatura são com base na quantidade de glicose inicial. Entretanto, essa forma de calcular o rendimento faz com que seu valor seja acima do valor teórico 0,51, uma vez que a hidrólise ocorre

simultânea a fermentação. Assim, optamos pelo cálculo do rendimento com base na quantidade inicial de biomassa pré-tratada. Baseado na quantidade de etanol final e biomassa inicial apresentados nos artigos calculamos os rendimentos em etanol baseado na biomassa inicial (Tabela 5).

Grande parte dos experimentos de SSF descritos na literatura, a fermentação é iniciada sem uma etapa anterior de pré-hidrólise. Neste caso, as enzimas são adicionadas juntamente com a levedura no início da fermentação. Isso impacta significativamente o processo pela utilização de uma maior quantidade de enzima e também no aumento do tempo de fermentação. Como pode ser observado na tabela 5 para alguns processos chega a 108 horas.

Resultados promissores são observados quando se compara o rendimento em etanol das cepas UFV-3 e LBM-1 com o obtido por Santos e colaboradores 2010. Neste caso utilizou-se uma cepa de *S. cerevisiae* que fermenta a 32°C, o que não é interessante para o processo SSF. Isso é refletido no menor rendimento de etanol comparado com as cepas UFV-3 e LBM-1.

Tabela 5 – Rendimento em etanol para leveduras termotolerantes das espécies *K. marxianus* e *S. cerevisiae*

Biomassa	Cepa de levedura	Temperatura (°C)	Carga enzimática	Concentração de etanol (g L ⁻¹)	Y _{E/B}	Tempo de fermentação (horas)	Fonte
80 g L ⁻¹ Bagaço de cana	<i>S. cerevisiae</i>	32	30 FPU/g celulases 20 CBU/g β-glicosidase	12	0,15	72	Santos <i>et al.</i> , 2010
75 g L ⁻¹ <i>Panicum virgatum</i>	<i>K. marxianus</i> IMB3	45	15 FPU/g celulases	19,43	0,26	168	Faga <i>et al.</i> , 2010
72,44 g L ⁻¹ <i>Panicum virgatum</i>	<i>K. marxianus</i> IMB4	37	15 FPU/g celulases	12,3	0,17	72	Suryawati <i>et al.</i> , 2008
72,44 g L ⁻¹ <i>Panicum virgatum</i>	<i>S. cerevisiae</i> D ₅ A	37	15 FPU/g celulases	14	0,19	72	Suryawati <i>et al.</i> , 2008
72,44 g L ⁻¹ <i>Panicum virgatum</i>	<i>K. marxianus</i> IMB4	41	15 FPU/g celulases	14,8	0,2	72	Suryawati <i>et al.</i> , 2008
50 g L ⁻¹ Bagaço de cana	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	37	12 FPU celulases 12 IU β-glicosidase	18,2	0,36	90	Rudolf <i>et al.</i> , 2007
75 g L ⁻¹ Bagaço de cana	<i>S. cerevisiae</i> TMB3400	37	12 FPU celulases 12 IU β-glicosidase	26	0,35	90	Rudolf <i>et al.</i> , 2007
75 g L ⁻¹ Celulose cristalina	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42	15 FPU/g celulases	26,1	0,35	72	Tomás-Pejó <i>et al.</i> , 2008
100 g L ⁻¹ Bagaço de cana	<i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y-132	40	40 FPU/g celulases	25	0,25	72	Hari <i>et al.</i> , 2001
80 g L ⁻¹ Bagaço de cana	<i>S. cerevisiae</i> LBM-1	37	15 FPU/g de celulases	13,78	0,15	80	Este trabalho
80 g L ⁻¹ Bagaço de cana	<i>K. marxianus</i> UFV-3	42	15 FPU/g de celulases	15,98	0,18	80	Este trabalho

4 - Ciclos de Fermentação

No processo de sacarificação e fermentação simultâneas as leveduras ficam em contato com a biomassa durante a fermentação e nem toda a biomassa é hidrolisada durante o processo. Isto dificulta a recuperação das células ao final da fermentação. Seria, portanto, de grande interesse para a indústria que a recuperação das células pudesse ser aplicada no processo SSF. Com a recuperação, reduz-se o tempo de fermentação uma vez que se coloca o substrato em contato com uma elevada concentração de células, o que permite que se entre rapidamente na fase fermentativa, eliminando aquela fase inicial do processo que é caracterizada por intensa multiplicação celular. Além disso, é de grande importância que essas leveduras permaneçam viáveis ao longo dos ciclos de fermentação, uma vez que multiplicar células leva tempo e é caro. Diante disso, decidimos avaliar se a recuperação do inóculo poderia ser aplicada no processo SSF e se as leveduras permanecem viáveis ao longo dos ciclos.

A fermentação foi conduzida a 42°C após 24 horas de hidrólise a 50°C. Ao final de 8 horas de fermentação centrifugou-se o meio. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, rico em leveduras e em bagaço de cana não hidrolisado, foi utilizado em um novo ciclo de fermentação. Pela análise do consumo de glicose e produção de etanol no final de cada ciclo, pôde-se analisar o número máximo de ciclos fermentativos que as leveduras poderiam ser utilizadas sem causar quedas no rendimento do processo.

Percebe-se pela análise do gráfico (Figura 17), que ocorre um aumento da concentração de etanol para *S. cerevisiae* LBM-1 no decorrer dos ciclos analisados, enquanto que, para a cepa *K. marxianus* UFV-3 ocorre uma queda na concentração de etanol a partir do terceiro ciclo.

O aumento do rendimento no início do processo pode ser explicado principalmente pelo aumento da quantidade de células a cada ciclo.

Para *S. cerevisiae* LBM-1 foi possível estimar uma regressão com coeficientes linear e quadrático ($R^2=92,3\%$) que explicasse a influência dos ciclos de fermentação sobre o rendimento em etanol (Figura 18). Observa-se aumento do rendimento até o sétimo ciclo de fermentação. Dessa forma, não foi possível determinar o número máximo de ciclos em que a cepa pode ser

utilizada sem perdas de rendimento no processo, para tanto, sugere-se que futuramente um maior número de ciclos seja estudado para *S. cerevisiae* LBM-1.

Para *K. marxianus* UFV-3 não foi possível ajustar uma equação linear que relacione rendimento em etanol e ciclos de fermentação, dada a conformação de platô. Essa perda de rendimento em etanol para a levedura *K. marxianus* UFV-3 pode estar associada à baixa tolerância ao etanol quando comparado a cepa *S. cerevisiae* LBM-1. Trabalhos realizados por Daniela Arruda Costa, mostraram que a levedura *S. cerevisiae* LBM-1 tolera até 4% de etanol a 42°C, enquanto que a levedura *K. marxianus* UFV-3 apresentou um fraco crescimento nessas mesmas condições (dados não publicados). O estresse causado pela exposição prolongada ao etanol ao longo dos ciclos pode ter causado quedas no rendimento em etanol para a levedura *K. marxianus*.

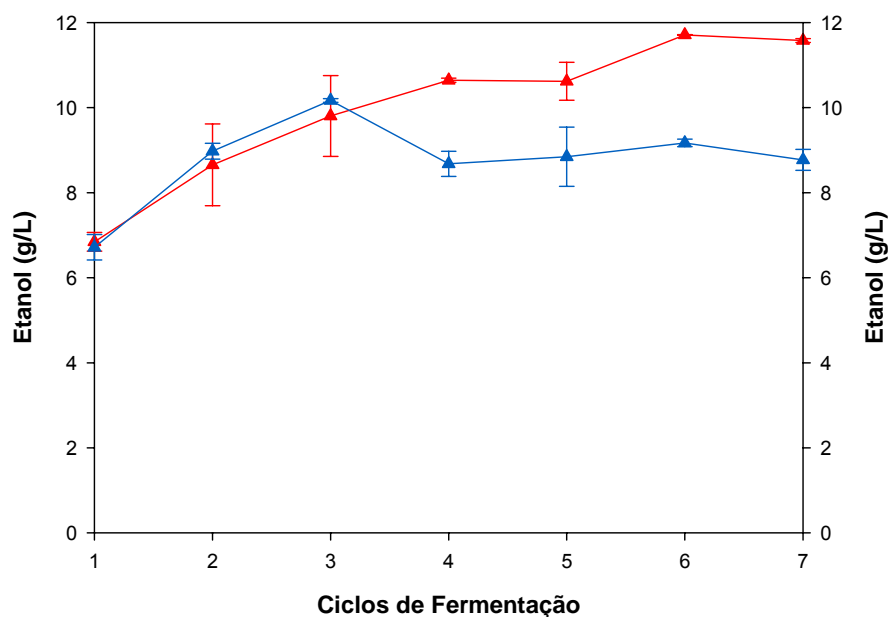


Figura 17 - Concentração de etanol *S. cerevisiae* LBM-1 (▲) e *K. marxianus* UFV-3 (▲) durante sete ciclos de fermentação a 42°C.

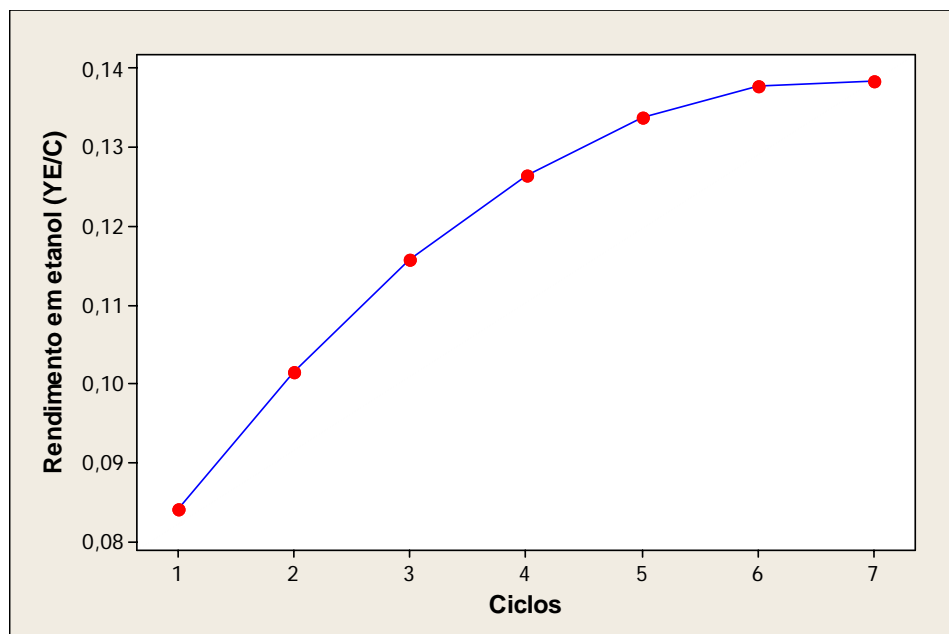


Figura 18 - Regressão linear ajustada para rendimento em etanol $Y_{E/C}$ em função dos ciclos de fermentação para *S.cerevisiae* LBM-1.

O desenvolvimento tecnológico pode certamente ajudar na redução, tanto dos impactos ambientais quanto dos preços do etanol combustível. Intensas pesquisas têm sido realizadas para a obtenção de organismos com alta eficiência fermentativa, a fermentação de substratos de baixo custo e otimização das condições ambientais para a ocorrência da fermentação (Siqueira *et al.*, 2008).

Neste contexto este trabalho mostrou que os dois isolados de leveduras termotolerantes com potencial para utilização em processos SSF. Além disto, estes resultados mostram que uma pré-hidrólise na temperatura ótima da enzima e durante o tempo máximo de ação são os fatores que mais afetam os rendimentos do processo quando se utilizam leveduras termotolerantes. A queda do rendimento ao longo de 7 ciclos que ocorreu para *K. marxianus* UFV-3 sugere que o aumento da tolerância ao etanol seria um alvo importante para o melhoramento desta levedura.

VI - CONCLUSÕES

- Para o bagaço de cana de açúcar a remoção da lignina e hemicelulose tornam o substrato muito mais acessível às enzimas na etapa da hidrólise;
- A concentração inicial de glicose é o principal fator que afeta o rendimento em etanol no processo SSF, daí a importância da eficiência das etapas de pré-tratamento e pré-hidrólise;
- O rendimento em etanol é influenciado por uma interação complexa entre os fatores cepas de leveduras e temperatura de fermentação;
- O processo de recuperação do inóculo após a fermentação pode ser aplicado no processo SSF;
- A melhor temperatura de fermentação para a levedura *S. cerevisiae* LBM-1 foi 37°C, ao passo que para *K. marxianus* UFV-3 foi 42 °C;
- O maior rendimento em etanol foi alcançado por *K. marxianus* UFV-3 a 42°C;
- As duas cepas testadas podem ser utilizadas para a produção de etanol por processos SSF porque apresentam rendimentos em etanol estatisticamente iguais. No entanto o número de ciclos de fermentação sem perda de rendimento pela cepa *K. marxianus* UFV-3 foi inferior ao da cepa LBM-1 indicando que esta seja mais adequada ao processo de produção através da batelada alimentada nas indústrias de produção de etanol.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, W. R.; FADIL, M.; NIGAM, P.; BANA, I. M. 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery. *Biotechnology and Bioenergy*; 68: 531-5
- ALFANI, A.; GALLIFUOCO, F.; SAPOROSI, A.; SPERA, A.; CANTARELLA, M. 2000. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiology Biotechnol*; 25:184–192.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, E. M.; NEGRO M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*; 101:4851-4861.
- AWAFO, V. A.; Tese de Doutorado, McGill University, Canadá, 1997.
- BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A. P. 1998. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeast in general. *World J. Microbiology Biotechnol*; 14: 809–821.
- BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*; 8: 1155-63.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. 1997, *Biotechnol. Adv.* 15:583–620
- BOLLÓK, M.; RÉCZEY, K.; ZACCHI, G. 2000. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Applied Microbiology Biotechnology*; 84–86:69–80

- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. 2008. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT (Portugal).
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F.M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. J. Sci. Ind. Res; 67: 849–864.
- CASTRO, A. M. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. Quimica Nova; 33: 181-188.
- CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. 2008. Biomassa para Bioenergia. UNICAMP, Campinas.
- DEMAIN, A. L. 2009. Biosolutions to the energy problem. J Ind Microbiol Biotechnol; 36:319–332
- FAGA, B. A.; WILKINS, M. R.; BANAT, I. M. 2010. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. Bioresource Technology; 101:2273–2279.
- FONSECA, G. C.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied Microbiology Biotechnology; 79: 339-354.
- FONSECA, G. G.; GOMBERT, A. K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. 2007. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. FEMS Yeast Res; 7: 422–435.

- GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*; 10:141-146.
- HALL, C. W. 1984. Energy sources and conversions relating foods. In: *Food and energy resources*, Edited by PIMENTEL, D. E HALL, C. W, Academy press, INC. 25-42.
- HAN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, G.; LIDÉN, ZACCHI, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in biotechnology*; 24: 549-556.
- HARI, S. K.; JANARDHAN, R. T.; CHOWDARY, G. V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*; 77: 193–196.
- HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H. 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulose genes. *J. Biotechnol*; 130:114–123.
- JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Biorefin*; 1:119–134.
- KIM, S.; HOLTZAPPLE, M.; T. 2006. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresource Technology*; 97:583-591.
- HARI, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *BioresourceTechnology*; 77:193-196.
- KUMAR, R.; WYMAN, C.E. 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol. Prog*; 25: 302–314.

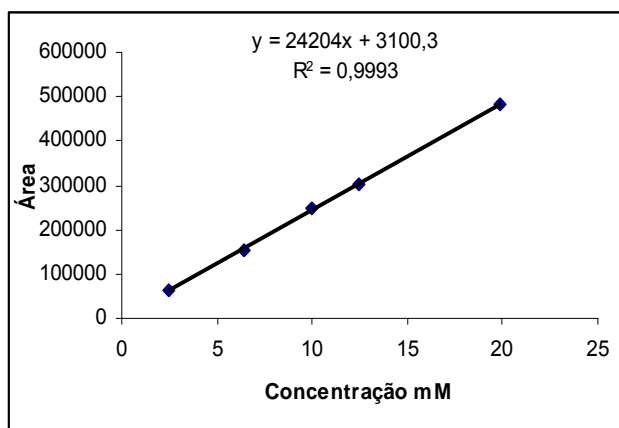
- LANE, M. M.; MORRISSEY, J.P. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Review*; 24: 17-26
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Molecular Biology Rev*; 66: 506-577.
- McKENDRY, P. 2002. Energy production from biomass (part 1): Overview of biomass. *Bioresource Technology*; 83: 37-46.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*; 96 673-686.
- NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B.M.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M.; AKADA, R. 2008. High temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl. Environ. Microbiol*; 74: 7514–7521.
- PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186.
- RUDOLF, R.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAHN-HA"GERDAL,; LIDEN, B. G. 2010. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Bagasse Using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnology and Bioengineering*; 89:783-790.
- SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*; 40: 3693–3700.

- SANTOS, J. C.; PINTO, I.R.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I.M.; FELIPE, M.G.; SILVA, S. S. 2005. Sugarcane bagasse as raw material and immobilization support for xylitol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.124:673-83
- SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. 2010. Comparação entre processos em shf e em ssf de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Quimica Nova*; 3:904-908
- SINGH, D.; BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. 2000. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. *Biotechnology Letters*; 20: 753-755.
- SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*; 99: 8156-63.
- SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BOM, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, A.; TORRES, F. A. G. 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*; 101: 4820-4825.
- SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I. M.; RAO, L. V. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technology*; 72: 43-46.

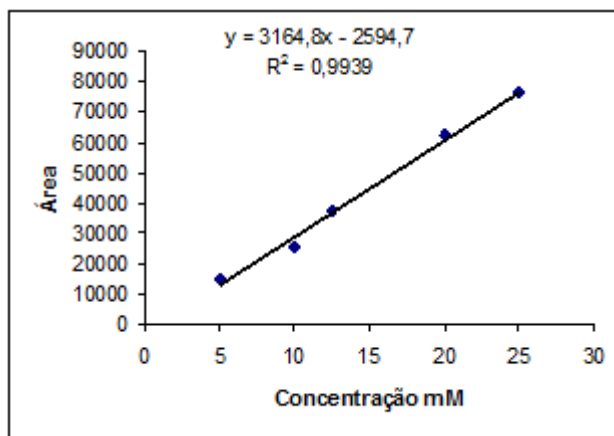
- STENBERG, K.; BOLLÓK, M.; RÉCZEY, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. 2000. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioenergy*; 68: 205– 210.
- SUN, Y.; CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*; 83: 1-111.
- SURYAWATI, L.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L.; MANESS, N. O.; BANAT, I. M. 2008. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering*; 101: 894-902
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol*; 9: 1621–1651.
- TOMÁS-PEJÓ, E.; GARCÍA-APARICIO, M.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, M. 2008. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*; 100: 890–895
- UDOP – União dos Produtores de Bioenergia (2009).
- VAN MARIS, A., J., A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*; 90:391-418.

- VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA JR, N. 2007. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*; 136–140: 104-114.
- ZHANG, Y.-HP.; LYND L. R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology and Bioenergy*; 88: 797-824.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 24: 452–481.
- ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology Biotechnology*; 82:815-27

VIII – ANEXO



Anexo 1 – Curva-padrão de glicose concentração de glicose x Área usada para a quantificação de glicose.



Anexo 2 – Curva-padrão de etanol concentração de etanol x Área usada para a quantificação de glicose.

Anexo 3 - Análise de variância das médias do rendimento em glicose da hidrólise para o pré-tratamento ácido e ácido/básico.

Fonte de variação	Graus de liberdade(GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	P-valor
Tratamentos	1	0,012887	0,012887	196,60	0,005
Erro	2	0,000131	0,000066		
Total	3	0,013018			

Anexo 4 - Análise de variância das médias do rendimento em glicose da hidrólise em diferentes temperaturas.

Fonte de variação	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	P-valor
Temperatura	1	0.1465645	0.7328×10^{-01}	7656.539	0,005
Resíduo	2	0.2871×10^{04}	0.9571×10^{-05}		

Coeficiente de Variação (%) = 1.092

Anexo 5 - Teste t para os efeitos dos fatores: tempo de hidrólise, temperatura de fermentação e levedura no rendimento em etanol no processo SSF ($\alpha=0,05$).

Fonte de variação	Efeito	T	P-valor
Constante		102,94	0,000
Tempo de pré-hidrólise	0,055172	20,59	0,000
Temperatura de fermentação	0,008491	3,17	0,009
Levedura	0,001446	0,54	0,600
Temperatura de fermentação*levedura	0,009891	3,69	0,004

R-Sq = 97,60% R-Sq(adj) = 96,73%

R-Sq(pred) = 94,93%

Anexo 6 - Análise de variância para as médias de rendimento

Fonte	Graus de liberdade	Graus de liberdade (GL)	Soma de quadrados (SQ)	Quadrado médio (QM)	F	P-valor
Efeitos principais	3	0,0124726	0,0124726	0,00415754	144,8	0,000
Efeito das interações	1	0,0003913	0,0003913	0,00039132	13,63	0,004
Erro residual	11	0,0003158	0,0003158	0,00002871		
Falta de ajuste	3	0,0001245	0,0001245	0,00004151	1,74	0,237
Erro puro	8	0,0001913	0,0001913	0,00002391		
Total	15	0,0131798				

CV (%) = 10,0