



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

DANIELE LONGO MACHADO

ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR O  
DESEMPENHO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ALTAS  
CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS

CAMPINAS

2018

DANIELE LONGO MACHADO

**“ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR O DESEMPENHO DA  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
EM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SÓLIDOS”**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Ramos de Andrade

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELE LONGO  
MACHADO, E ORIENTADA PELA PROF<sup>ª</sup>. DRA. ALINE  
CARVALHO DA COSTA.

CAMPINAS

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES; CNPq, 155001/2016-7

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

M18e Machado, Daniele Longo, 1987-  
Estratégias para melhorar o desempenho da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em altas concentrações de sólidos / Daniele Longo Machado. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.  
Coorientador: Rafael Ramos de Andrade.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lignocelulose. 2. Hidrólise enzimática. 3. Adsorção. 4. Inibição. 5. Fermentação. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Andrade, Rafael Ramos de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Strategies for improving the performance of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse at high solids concentration

**Palavras-chave em inglês:**

Lignocellulose

Enzymatic hydrolysis

Adsorption

Inhibition

Fermentation

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Simone Coelho Nakanishi

Rosana Goldbeck

Betânia Hoss Lunelli

Cíntia Regina Sargo

**Data de defesa:** 20-06-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Tese de Doutorado defendida por Daniele Longo Machado e aprovada em 20 de Junho de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Dra. Aline Carvalho da Costa

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

---

Dra. Simone Coelho Nakanishi

CTBE - Lab. Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

---

Dra. Rosana Goldbeck

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

---

Dra. Betânia Hoss Lunelli

PUC– Pontifícia Universidade Católica de Campinas

---

Dra. Cíntia Regina Sargo

CTBE - Lab. Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

# DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Rosana e ao meu marido, João Paulo, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço meu marido, João Paulo, pela enorme paciência, compreensão e amor. Você foi meu pilar e durante minhas lágrimas me incentivou para o sucesso;

Aos meus pais, Rosana e José, que nunca me desampararam em momento algum e que, apesar da distância, sempre estiveram apoiando-me e incentivando-me. Obrigada por acreditarem em mim;

À minha orientadora, Aline Carvalho da Costa, pela oportunidade, apoio, confiança, acolhimento, orientação e preciosos ensinamentos;

Ao Dr. Rafael Ramos de Andrade, meu querido co-orientador, que teve paciência, atenção e disposição para acompanhar e ensinar mesmo estando em outra cidade e com seus deveres;

Aos meus queridos amigos da FEQ e UNICAMP que fazem e fizeram parte da equipe do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE), em especial Luiza Helena da Silva, João Moreira Neto e Thaynara Coradini;

Ao CNPq e a CAPES, pela concessão das bolsas;

Ao CTBE e a Dr. Sarita Rabelo, pelo fornecimento da matéria-prima e colaboração para realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização desse trabalho.

## RESUMO

Um dos grandes desafios para viabilizar o processo de produção do bioetanol de segunda geração (E2G) está relacionado ao custo da destilação do etanol no caldo de fermentação, que requer concentrações  $\geq 4\%$  (v/v). Assim, são necessárias altas concentrações de açúcares no passo de hidrólise enzimática, que só são alcançadas com alta concentração de sólidos. No entanto, as propriedades reológicas do meio mudam, ocasionando problemas de transferência de massa e calor e inibição por produto final, além de aumentar a demanda energética para uma mistura eficiente. Este trabalho propõe diversas estratégias para realizar a hidrólise em altas concentrações de sólidos do bagaço de cana-de-açúcar submetido a dois pré-tratamentos diferentes, o hidrotérmico (BH) e o ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH (BAD). O propósito de escolher esses pré-tratamentos foi avaliar as conversões do processo com biomassas que apresentam alto teor de lignina (BH) e baixo teor (BAD), e como a estrutura interfere nesses processos quando a concentração de sólidos é maior. Foram conduzidas e comparadas cinco estratégias: batelada alimentada em duas configurações diferentes, hidrólise enzimática em duas etapas, hidrólise enzimática em três etapas, hidrólise enzimática em ciclos e SSF - sacarificação e fermentação simultâneas. Os resultados mostraram que a conversibilidade da celulose em altas concentrações de sólidos depende do tipo de biomassa e do tempo reacional. O BAD foi o que apresentou os melhores resultados, contudo, o aumento da concentração de sólidos de 5% (m/v) para 20% interferiu na conversão ( $96,58 \pm 3,10\%$  e  $73,00 \pm 1,85\%$ , respectivamente). Das diferentes estratégias estudadas as que se destacaram foram: batelada alimentada com adsorção prévia das enzimas (C1) ( $136,63 \pm 1,59$  g/L de glicose e  $86,33 \pm 2,02\%$  de conversão de celulose) e a SSF, ambas para o BAD. A SSF com uma etapa de pré-sacarificação e oscilações na temperatura (50 e 38 °C) produziu durante todo o processo até 149,00 g/L de glicose (143 h) com rendimento de  $49,85 \pm 1,65\%$  em etanol (8h). A baixa concentração em etanol se deve ao aumento da temperatura, onde os microrganismos provavelmente não resistiram e somente glicose foi produzida quando a temperatura voltou para 38 °C. Os estudos sugerem a possibilidade de tornar o E2G competitivo e viável economicamente.

**Palavras-chave:** Lignocelulose, hidrólise enzimática, altas cargas de sólido, adsorção, fermentação, inibição.

## ABSTRACT

One of the major challenges to the viability of the second generation bioethanol (E2G) production process is related to the cost of ethanol distillation in the fermentation broth, which requires concentrations  $\geq 4\%$  (v/v). Thus, high sugar concentrations are required in the enzymatic hydrolysis step, which are only achieved with a high concentration of solids. However, the rheological properties of the slurry changes, which creates problems associated with mass and heat transfer and inhibition by the final product, as well as increasing the energy demand for an efficient mixture. This study proposes several strategies for performing hydrolysis in high solids concentrations of sugarcane bagasse pretreated by two different methods: hydrothermal (HB) and dilute acid followed by delignification with NaOH (ADB). These pre-treatments were chosen to evaluate the conversion process of biomasses that have high lignin content (HB) and low content (ADB), and also to investigate how the structure interferes in these processes when the concentration of solids is higher. Five strategies were carried out and compared: fed batch hydrolysis in two different configurations, enzymatic hydrolysis in two stages, enzymatic hydrolysis in three stages, enzymatic hydrolysis with recycles and SSF - simultaneous saccharification and fermentation. The results showed that cellulose conversion in hydrolysis with a high solid concentration depends on the type of biomass and reaction time. ADB had the most significant results, nonetheless, the increase in solids concentration from 5% (m/v) to 20% interfered with conversion ( $96.58 \pm 3.10\%$  and  $73.00 \pm 1.85\%$ , respectively). From the different strategies studied, the ones that stood out were; fed batch with previous enzymes adsorption (C1) ( $136.63 \pm 1.59$  g/L glucose and  $86.33 \pm 2.02\%$  cellulose conversion) and SSF, both for the ADB. SSF with a pre-saccharification stage and temperature oscillations (50 and 38 ° C) yielded up to 149.00 g/L of glucose (143 h) and  $49.85 \pm 1.65 \%$  (8 h) of yield in ethanol throughout the process. The low ethanol concentration was due to an increase in temperature, as likely microorganisms did not survive and thus, only glucose was produced when the temperature returned to 38 °C. This study indicates the possibility of making the process of E2G more competitive and economically feasible.

**Key words:** Lignocellulose, enzymatic hydrolysis, high solid loading, adsorption, fermentation, inhibition.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Desenho esquemático de uma planta de cana-de-açúcar, suas partes componentes (colmo, ponteiro e palha) e as respectivas composições em termos de umidade e biomassa (fibra e açúcar) Fonte: Adaptação:(MATSUOKA et al., 2012). .....	29
<b>Figura 2.2:</b> Processamentos termoquímico e bioquímico da biomassa lignocelulósica. Fonte: Figura adaptada (MENON; RAO, 2012).....	31
<b>Figura 2.3:</b> Estrutura básica da biomassa lignocelulósica. Fonte: Adaptação de (MENG; RAGAUSKAS, 2014). .....	32
<b>Figura 2.4:</b> Estrutura molecular da cadeia de celulose. Fonte: Adaptado (SANTOS et al., 2012).....	33
<b>Figura 2.5:</b> Unidades precursoras da lignina.....	35
<b>Figura 2.6:</b> Componentes bioquímicos da biomassa lignocelulósica e seus potenciais produtos da degradação. Fonte: Adaptação de Zabed et al. (2017). As linhas tracejadas denotam os produtos da degradação secundária.....	45
<b>Figura 2.7:</b> Ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico sobre a celulose. Fonte: Adaptação: (GUSAKOV et al., 2011).....	49
<b>Figura 2.8:</b> Estratégias de processamento da matéria-prima lignocelulósica. Cada diagrama representa um biorreator. Fonte: Adaptação de (LYND et al., 2002). .....	65
<b>Figura 2.9:</b> Via clássica da glicólise. Fonte: adaptação de Barre et al. (2000). .....	66
<b>Figura 3.1:</b> Comportamento da enzima celulase a) Celluclast 1.5 L, b) Cellic Ctec 2. Logaritmo da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de 0,5 mL de enzima diluída. ....	77
<b>Figura 3.2:</b> Curvas elaboradas para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, a) curva padrão para Celluclast 1.5 L e, b) curva padrão para Cellic Ctec 2. Os gráficos correlacionam a concentração de proteínas com a absorvância a 595 nm. ....	79
<b>Figura 3.3:</b> Cinética de adsorção da Celluclast 1.5 L no BH com adição de 10,59 mg de proteína/g de bagaço (a) e cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BH com adição de 9,68 mg de proteína/ g de bagaço (b), a 25 °C, pH 4,8 e agitação 150 rpm, concentração inicial de bagaço 5 % m/v, carga enzimática correspondente de celulase de 15 FPU/g de bagaço. ....	80

<b>Figura 3.4:</b> Cinética de adsorção da Celluclast 1.5 L no BAD com adição de 9,60 mg de proteína/ g de bagaço (a) e cinética de adsorção da Cellic CTec 2 no BAD com adição de 9,68 mg de proteína/ g de bagaço (b). Nas duas figuras as condições foram: 25 °C, pH 4,8 e agitação 150 rpm, concentração inicial de bagaço 5 % m/v, carga enzimática correspondente de celulase de 15 FPU/g de bagaço. ....	82
<b>Figura 3.5:</b> Formação de glicose e conversão da celulose do BH para Celluclast 1.5 L e Cellic CTec 2. a) Cinética da hidrólise enzimática e b) conversão da celulose. ....	84
<b>Figura 3.6:</b> Comparação da atividade enzimática e do teor de proteína para os diferentes coquetéis enzimáticos. ....	86
<b>Figura 4.1:</b> Perfis de glicose durante a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados a) BH e b) BAD. Concentração de sólidos: 1, 5, 10, 15 e 20 % (m/v). ....	90
<b>Figura 4.2:</b> Conversão de celulose em relação à concentração de sólidos para hidrólise em até 144 horas a) conversão celulose para BH e b) conversão celulose para BAD. ....	93
<b>Figura 4.3:</b> Gráficos do efeito do aumento da concentração de sólidos na conversão de celulose para os tempos de a) 48 horas reacionais e b) 144 horas reacionais. * corresponde ao gráfico de linearidade da conversão em relação à concentração de sólidos. ....	95
<b>Figura 4.4:</b> Produtividade volumétrica de glicose na hidrólise enzimática em batelada para todas as concentrações de sólidos a) BH, b) BAD. ....	96
<b>Figura 5.1:</b> Fluxograma da HE em batelada alimentada – C1. ....	102
<b>Figura 5.2:</b> Influência do tipo de pré-tratamento e das configurações de BA empregadas na HE. a) Concentração de glicose, b) Conversão de celulose em glicose. ....	105
<b>Figura 5.3:</b> Produtividade volumétrica de glicose nas configurações de BA. a) comparação entre C1 e C2 para BH e b) comparação entre C1 e C2 para BAD. ....	110
<b>Figura 5.4:</b> Produtividade volumétrica de glicose para as configurações de BA. a) referente à configuração C1 para BH e BAD e b) referente à configuração C2 para BH e BAD. ....	111
<b>Figura 5.5:</b> Comparação da produtividade volumétrica de glicose entre configurações de batelada alimentada e batelada na hidrólise enzimática. a) bagaço hidrotérmico – BH e b) bagaço ácido seguido de deslignificação com NaOH – BAD. ....	112
<b>Figura 5.6:</b> Cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD com adição de 7,4 mg de proteína/g de bagaço na presença de altas concentrações de glicose. Condições reacionais: 25	

°C, pH 4.8 e agitação 150 rpm, concentração inicial de bagaço 10 % m/v, carga enzimática correspondente de celulase de 15 FPU/g de bagaço.....	115
<b>Figura 6.1:</b> Esquema da hidrólise enzimática em duas etapas. E1: Celulase; E2: β-glicosidase, a) para Celluclast 1.5 L e b) para Cellic Ctec 2.....	118
<b>Figura 7.1:</b> Representação esquemática da hidrólise em três etapas.....	126
<b>Figura 7.2:</b> Representação esquemática da hidrólise em três etapas, a)Primeira hidrólise (2ª etapa) com 12 horas , bagaço BH, b) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 12 horas , bagaço BAD, c) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 24 horas , bagaço BH, d) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 24 horas , bagaço BAD. ....	127
<b>Figura 8.1:</b> Esquema da hidrólise enzimática em reciclo.....	134
<b>Figura 8.2:</b> Perfil da liberação de glicose e conversão celulose em cada ciclo dos processos R 12, R 24 e R 48, a) referente ao BH e b) referente ao BAD.....	136
<b>Figura 8.3:</b> Influência do tempo de cada reciclo nas conversões de celulose entre os processos R 12, 24 e 48 dos bagaços, a) BH e b) BAD. ....	142
<b>Figura 8.4:</b> Perfil de glicose para os reciclos sólidos sendo a) hidrólise do sólido reciclado BH e b) hidrólise do sólido reciclado BAD.....	143
<b>Figura 9.1:</b> Etapas para o preparo de inóculo e SSF (adaptação de Andrade (2012)). ....	148
<b>Figura 9.2:</b> Esquema da SSF proposta. ....	151
<b>Figura 9.3:</b> Perfil de SSF obtido para BAD nas temperaturas: a) 34 °C e b) 38 °C. ....	152
<b>Figura 9.4:</b> (a) Perfil da produção de etanol (b) Perfil de glicose durante o processo de SSF do BAD a 38 °C. ....	154

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Composição típica da biomassa seca. Fonte: (IOELOVICH, 2015).....	32
<b>Tabela 2.2:</b> Efeitos dos diferentes processos de pré-tratamento na composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos. Fonte: (SUN et al., 2016).....	39
<b>Tabela 2.3:</b> Vantagens e desvantagens de alguns dos diferentes métodos de pré-tratamento. Fonte: Adaptação: (ZABED et al., 2017).....	40
<b>Tabela 2.4:</b> Esquemas de hidrólise enzimática em batelada alimentada. Adaptação (MODENBACH; NOKES, 2013). .....	59
<b>Tabela 3.1:</b> Arranjo experimental para as cinéticas de adsorção dos diferentes coquetéis enzimáticos .....	74
<b>Tabela 3.2:</b> Composição química dos bagaços pré-tratados.....	76
<b>Tabela 3.3:</b> Cálculo da atividade enzimática em FPU para as celulasas dos complexos enzimáticos Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec2. ....	78
<b>Tabela 5.1:</b> Arranjo experimental para as cinéticas de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD na presença de diferentes concentrações de glicose. ....	103
<b>Tabela 5.2:</b> Concentração de glicose e conversão da hidrólise para as diferentes estratégias de HE para 144 horas de hidrólise.....	106
<b>Tabela 6.1:</b> Conversão de glicose liberada na reação de hidrólise enzimática do BH e concentração de açúcar gerada para as diferentes concentrações de sólidos. ....	120
<b>Tabela 6.2:</b> Conversão de celulose na reação de hidrólise enzimática do BH e do BAD e concentração de açúcares gerados para as diferentes concentrações de sólidos usando a Cellic Ctec2. Hidrólises convencionais realizadas por 48 horas.....	122
<b>Tabela 7.1:</b> Resultados da segunda hidrólise (3ª etapa) nas quatro configurações da Figura 7.2 nos tempos de 24 e 48h. ....	129
<b>Tabela 8.1:</b> Condições experimentais para realização dos processos de hidrólise com reciclo. ....	133
<b>Tabela 8.2:</b> Valores de glicose e conversão celulose para as diferentes estratégias de hidrólise enzimática.....	139

<b>Tabela 10.1:</b> Comparação entre as conversões obtidas das principais estratégias de hidrólise enzimáticas propostas nesse trabalho. ....	162
<b>Tabela 10.2:</b> Concentração dos padrões usados na construção das curvas de calibração. ....	180
<b>Tabela 10.3:</b> Reagentes para meio de ativação do microrganismo. ....	181
<b>Tabela 10.4:</b> Meio de crescimento dos microrganismos: reagentes utilizados e a quantidade. ....	181
<b>Tabela 10.5:</b> Concentração de celobiose alcançada durante as hidrólises enzimáticas convencionais do BH com variação na carga de sólidos de 1 a 20 % (m/v). ....	182
<b>Tabela 10.6:</b> Concentração de celobiose alcançada durante as hidrólises enzimáticas convencionais do BAD com variação na carga de sólidos de 1 a 20 % (m/v). ....	182
<b>Tabela 10.7:</b> Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em batelada alimentada para o BH nas configurações C1 (alimentação de bagaço com adsorção prévia das enzimas) e C2 (alimentação de bagaço em base seca). ....	183
<b>Tabela 10.8:</b> Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em batelada alimentada para o BAD nas configurações C1 (alimentação de bagaço com adsorção prévia das enzimas) e C2 (alimentação de bagaço em base seca). ....	183
<b>Tabela 10.9:</b> Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em reciclos nas configurações R 48, 24 e 12 para o BH. As concentrações de sólidos estão em m/v. ....	184
<b>Tabela 10.10:</b> Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em reciclos nas configurações R 48, 24 e 12 para o BAD. As concentrações de sólidos estão em m/v. ....	184

## ÍNDICE DE ABREVIACÕES

GP: Grau de polimerização

E1G: Etanol de primeira geração

E2G: Etanol de segunda geração

BH: Bagaço hidrotérmico

BAD: Bagaço ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH

CONAB: Companhia nacional de abastecimento

NREL: Laboratório Nacional de Energia Renovável

LI: Líquidos iônicos

HMF: Hidroximetilfurfural

HE: Hidrólise enzimática

BA: Batelada alimentada

C 1: Configuração batelada alimentada com alimentação de bagaço pré-hidrolisado

C 2: Configuração batelada alimentada convencional

SHF: Fermentação e hidrólise separadas

SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas

FPU: Unidades de Filtro de Papel

CBU: Unidades de Celobiose

CHB= celobiohidrolases

EG = endoglucanases

BG:  $\beta$ -glicosidases

T: Temperatura ( $^{\circ}$ C)

t: tempo

VRA: Valor de retenção de água

BEV: Bagaço de explosão a vapor

CTBE: Latoratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

E1: celulasas

E2:  $\beta$ -glicosidasas

$E_{\max}$ : Capacidade máxima de adsorção

DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 2-1 .....	66
Equação 9-1 .....	151
Equação 9-2 .....	151
Equação 10-1 .....	179
Equação 10-2 .....	179

## SUMÁRIO

<b>1 CAPÍTULO 1</b> .....	22
1.1 Objetivos .....	25
1.1.1 Objetivo geral .....	25
1.1.2 Objetivo Específico .....	26
1.2 Organização do Trabalho .....	26
1.3 Produção Bibliográfica .....	27
1.3.1 Trabalhos publicados em anais de congressos .....	27
1.3.2 Artigos publicados em revistas científicas .....	28
1.3.3 Artigos submetidos para publicação .....	28
<b>2 CAPÍTULO 2</b> .....	29
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	29
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR .....	29
2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	30
2.2.1 Componentes do bagaço de cana-de-açúcar .....	33
2.3 PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	36
2.3.1 Pré-tratamento .....	37
2.3.2 Formação de inibidores e detoxificação .....	44
2.3.3 Hidrólise .....	45
2.3.4 Hidrólise enzimática com alta carga de sólidos .....	53
2.3.5 Processos de fermentação dos materiais lignocelulósicos .....	64
2.3.6 Hidrólise e fermentação separadas (SHF) .....	67
2.3.7 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) .....	68
<b>3 CAPÍTULO 3</b> .....	71
EXPERIMENTOS PRELIMINARES .....	71
3.1 Introdução .....	71

3.2 Metodologia experimental .....	72
3.2.1 Matéria-prima.....	72
3.2.2 Enzimas .....	73
3.2.3 Determinação da atividade enzimática.....	73
3.2.4 Quantificação do teor de proteína presente nos coquetéis enzimáticos .....	73
3.2.5 Cinética de adsorção da celulase nos bagaços pré-tratados .....	74
3.2.6 Hidrólise enzimática preliminar do BH com os coquetéis Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2 .....	75
3.3 Resultados e discussão.....	75
3.3.1 Análise da composição química dos bagaços pré-tratados .....	75
3.3.2 Determinação da atividade enzimática das celulases comerciais .....	77
3.3.3 Determinação da concentração de proteína presente nos coquetéis enzimáticos .....	78
3.3.4 Cinética de adsorção das enzimas Celluclast 1.5 L e Cellic CTEC 2 nos bagaços pré-tratados BH e BAD.....	79
3.3.5 Hidrólise enzimática preliminar do BH com os coquetéis Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2 .....	83
3.4 Conclusões .....	86
<b>4 CAPÍTULO 4.....</b>	<b>88</b>
<b>VARIAÇÃO NA CARGA DE SÓLIDOS - EFEITOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</b>	
4.1 Introdução .....	88
4.2 Metodologia experimental .....	88
4.2.1 Hidrólise enzimática em batelada .....	88
4.3 Resultados e discussão.....	89
4.3.1 Hidrólise enzimática em batelada .....	89
4.4 Conclusões .....	98
<b>5 CAPÍTULO 5.....</b>	<b>100</b>

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA .....	100
5.1 Introdução .....	100
5.2 Metodologia experimental .....	101
5.2.1 Hidrólise enzimática em batelada alimentada com adsorção prévia da celulase – Configuração C1 .....	101
5.2.2 Hidrólise enzimática em batelada alimentada - Configuração C2 .....	102
5.2.3 Influência da alta concentração de açúcar na cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD .....	102
5.3 Resultados e discussão .....	104
5.3.1 Hidrólise enzimática em batelada alimentada - Configurações C1 e C2 ...	104
5.3.2 Influência de concentrações elevadas de açúcares na cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD .....	114
5.4 Conclusões .....	115
<b>6 CAPÍTULO 6</b> .....	117
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM DUAS ETAPAS – UMA ESTRATÉGIA DE HIDRÓLISE PARA ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS .....	117
6.1 Introdução .....	117
6.2 Metodologia experimental .....	118
6.2.1 Hidrólise enzimática em duas etapas – uma estratégia de hidrólise para altas concentrações de sólidos .....	118
6.2.2 Cinética de adsorção .....	119
6.3 Resultados e discussão .....	119
6.3.1 Hidrólise enzimática em duas etapas .....	119
6.4 Conclusões .....	123
<b>7 CAPÍTULO 7</b> .....	125
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM TRÊS ETAPAS – UMA ESTRATÉGIA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS .....	125
7.1 Introdução .....	125

7.2 Metodologia experimental .....	125
7.2.1 Hidrólise enzimática em três estágios .....	125
7.2.2 Cinética de adsorção .....	126
7.3 Resultados e discussão .....	126
7.3.1 Hidrólise enzimática em três etapas .....	126
7.4 Conclusões .....	130
<b>8 CAPÍTULO 8</b> .....	<b>132</b>
<b>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM RECICLOS</b> .....	<b>132</b>
8.1 Introdução .....	132
8.2 Metodologia experimental .....	132
8.2.1 Materiais .....	132
8.2.2 Descrição dos processos de hidrólise enzimática com reciclo .....	133
8.3 Resultados e discussão .....	134
8.4 Conclusões .....	145
<b>9 CAPÍTULO 9</b> .....	<b>146</b>
<b>SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS – SSF</b> .....	<b>146</b>
9.1 Introdução .....	146
9.2 Metodologia experimental .....	147
9.2.1 Microrganismo .....	147
9.2.2 Meio de ativação do microrganismo .....	147
9.2.3 Meio semi-sólido para ativação da levedura .....	147
9.2.4 Meio de crescimento do microrganismo .....	147
9.2.5 Meio de adaptação dos microrganismos – meio com hidrolisado .....	149
9.2.6 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) .....	149
9.2.7 Parâmetros de desempenho da SSF .....	151
9.3 Resultados e discussão .....	152

9.3.1 SSF preliminar em modo batelada .....	152
9.3.2 SSF modo batelada alimentada .....	153
9.4 Conclusões .....	156
<b>10 CAPÍTULO 10</b> .....	158
CONCLUSÕES FINAIS .....	158
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	164
APÊNDICES .....	177

# 1 CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Atualmente, sabe-se da dependência da importação de petróleo e derivados em que o país se encontra. É indubitável e bastante presente na literatura o fato de que o Brasil precisa diversificar sua matriz energética. Com isso, a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), criada em 2016, busca definir uma estratégia para garantir o papel dos biocombustíveis, principalmente quando se fala em segurança energética e em redução de emissões de gases causadores do efeito estufa.

Segundo o programa RenovaBio objetiva-se dobrar a produção de etanol até 2030, ou seja, prevê crescimento do consumo dos atuais 28 bilhões de litros de etanol combustível consumidos anualmente para 50 bilhões de litros (RENOVABIO, 2017). Contudo, segundo Nogueira (2008) o aumento da produtividade teórica para o etanol de primeira geração já está limitado, onde é necessário o aumento da área agrícola ocupada com a cana-de-açúcar, o que gerará competição com outras culturas.

Uma alternativa para aumentar a produção em litros do etanol sem aumentar a área plantada de cana é o Etanol de 2ª Geração (E2G), produzido principalmente a partir de processamentos de biomassa lignocelulósica, como o bagaço da cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar é uma das biomassas lignocelulósicas mais importantes e amplamente disponíveis em climas tropicais e subtropicais, que é obtida após a extração do caldo da cana nos processos de produção de açúcar e etanol de primeira geração. Nesta rota, as estimativas de ganho na produtividade de etanol são de até 50% (NOGUEIRA, 2008).

O processo geral para produção do E2G pode ser conduzido por uma via bioquímica ou química para a conversão da biomassa em biocombustíveis e no caso da via bioquímica inclui as seguintes etapas: pré-tratamento para reduzir a recalcitrância do substrato, hidrólise dos polissacarídeos por enzimas celulolíticas a açúcares fermentescíveis, fermentação dos açúcares resultantes em etanol e a recuperação de etanol (ZHANG et al., 2014).

O objetivo do pré-tratamento é tornar a biomassa mais susceptível ao ataque enzimático e minimizar a perda dos açúcares e a formação de inibidores, logo, o pré-tratamento deve agir de forma a modificar ou remover parcialmente a lignina e/ou as hemiceluloses. Uma grande quantidade de pré-tratamentos foi estudada e cada uma tem suas vantagens e desvantagens (MODENBACH & NOKES, 2012). Por isso, a escolha do tipo de pré-tratamento tem um grande impacto nas etapas seguintes, hidrólise e fermentação. Um pré-tratamento que não promove a deslignificação do material, como o hidrotérmico, acarreta em vários problemas,

tais como, a adsorção improdutiva das enzimas, a menor porcentagem de celulose disponível e conseqüentemente menor conversão de celulose quando comparado a um pré-tratamento que promove a deslignificação do material lignocelulósico. Por outro lado, pré-tratamentos que removem a lignina, em geral, são mais caros e podem tornar o processo economicamente inviável. Assim, o pré-tratamento tem um papel muito importante no processo global do E2G.

Um dos grandes desafios para viabilidade do processo está relacionado com o custo das operações de destilação do etanol em solução. O trabalho de Modenbach & Nokes (2013) mostra que a destilação de soluções alcoólicas tem gasto energético viável quando a concentração do mesmo é  $\geq 4\%$  (v/v), e para tal, é necessário obter altas concentrações de açúcares fermentescíveis na etapa da hidrólise enzimática, porém, isso é atingido quando a reação de hidrólise é feita com alta concentração de sólidos. A operação em altas cargas de sólido também aumenta a produtividade volumétrica e diminui os custos de capital. Dessa forma, outro grande desafio é a realização de uma reação de hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos e alta conversão de celulose em glicose.

Entretanto, há desvantagens no aumento da carga de sólidos na hidrólise enzimática, dentre elas, o aumento da concentração dos produtos finais e dos inibidores, o que leva à diminuição na funcionalidade das enzimas e dos microrganismos fermentadores. Além disso, a elevada concentração de sólidos pode, também, causar problemas de transferência de massa, calor e consumo excessivo de energia na agitação em reatores, devido ao aumento na viscosidade do meio.

Em baixas concentrações de substrato (5% m/m), o rendimento da etapa de sacarificação é alto, próximo a 100% (SUN; CHENG, 2002), entretanto a concentração em etanol alcançada é baixa ( $< 4\%$  v/v).

Devido aos problemas relacionados às altas concentrações de sólidos, muitos estudos abordam a hidrólise em modo batelada alimentada, onde o substrato sólido fresco é adicionado gradualmente ao meio reacional, levando à manutenção de sólidos em baixos níveis no reator. Dentre suas vantagens estão a baixa viscosidade inicial associada à melhor difusão, pois a carga de sólidos é mantida relativamente baixa. Esse modo de operação permite que o substrato se liquefaça antes da adição de sólidos adicionais, o que mantém o nível de água livre disponível para a reação e difusão de produtos formados, os quais são potencialmente inibidores (HOYER et al., 2010). Contudo, alguns estudos reportam que os rendimentos alcançados em modo batelada e batelada alimentada foram próximos (LÓPEZ-LINARES et al., 2014; RUDOLF et al., 2005).

Outras estratégias também têm sido sugeridas para lidar com a operação em altas

concentrações de sólidos, como a proposta por Xue et al. (2012), que promove a adsorção das enzimas (por 10 min a 50 °C) em baixas concentrações de sólidos, seguida de filtração para obter a carga de sólidos desejada. Segundo os autores, que trabalharam com lascas de madeira como biomassa, com esta estratégia é possível obter uma distribuição uniforme das enzimas no substrato pré-tratado. Eles afirmam ter conseguido manter a mesma conversão obtida a 5% (m/v) de sólidos trabalhando com 20% de sólidos. Já Yang et al. (2011) mostraram que é possível aumentar a conversão na hidrólise com 30% de sólidos se esta for realizada em 3 etapas, por 9h, 9h e 12h. Entre uma etapa e outra é realizada uma separação sólido/líquido e o sólido é ressuspenso em nova solução tampão, de forma que a glicose é separada, eliminando a inibição por produto. Embora este esquema comprove que a retirada da glicose aumenta a conversão, não resolve o problema, já que o objetivo da operação com altas concentrações de sólidos é aumentar a concentração de glicose. Neste caso a concentração de glicose vai diminuindo em cada etapa e em nenhuma delas atinge os valores esperados para 30% de sólidos.

Diversos autores explicam que o aumento na carga de sólidos diminui o rendimento da hidrólise enzimática, principalmente, devido à inibição pelo produto. Olsen et al. (2014), López-Linares et al. (2014) e Hodge et al. (2008) observaram que a inibição pelo produto é maior com o aumento na carga de sólidos e que, dentre outros fatores também observados (problemas de transferência de massa, aumento na viscosidade e diminuição do conteúdo de água), esse ainda é o efeito mais significativo sobre o rendimento. Por isso, uma opção para contornar os problemas existentes na hidrólise enzimática realizada em qualquer estratégia é realizar a hidrólise e a fermentação em uma única etapa, processo chamado de “sacarificação e fermentação simultânea” (SSF, do inglês “Simultaneous Saccharification and Fermentation” (PARK et al., 2010).

Esse processo tem várias vantagens sobre a sacarificação e a fermentação separadas (SHF, do inglês “Separate Hydrolysis and Fermentation”). Na SSF os açúcares formados na hidrólise são simultaneamente fermentados a etanol. Com isso, a inibição das enzimas celulases pelos produtos finais é evitada, o que pode ajudar quando a concentração de sólidos é aumentada devido à maior obtenção de açúcares fermentescíveis. Além disso, o processo de SSF vem mostrando ótimos resultados em termos de rendimento em etanol (GLADIS et al., 2015; LINDE et al., 2007; RUDOLF et al., 2005). Apesar destas vantagens, a SSF possui algumas limitações devido à diferença de temperatura ótima para a ação das enzimas celulolíticas (cerca de 50 °C) e a fermentação alcoólica (faixa de 30-38 °C). Contudo, esta diferença pode ser contornada com a utilização de diversas estratégias, como o uso de

microrganismos termotolerantes, os quais tem a capacidade de crescer em temperaturas mais altas, ou por variações de temperatura ao longo do tempo de reação, visando encontrar valores ótimos de temperatura que favoreça as duas reações (OLOFSSON et al., 2008).

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do tipo de pré-tratamento e modo de operação da hidrólise sobre a conversão da celulose em glicose durante a hidrólise enzimática para altas cargas de sólidos. A obtenção de altas concentrações de sólidos de lignocelulose e altos rendimentos de açúcar são alguns dos principais objetivos. Neste estudo, diversas estratégias de hidrólise enzimática, como a hidrólise enzimática em batelada alimentada, foram avaliadas. Para isso, dois tipos de pré-tratamento foram empregados no bagaço de cana-de-açúcar: hidrotérmico (BH) e ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH (BAD). O tipo de pré-tratamento tem um fator bastante relevante ao se trabalhar com altas cargas de sólidos.

O processo de SSF com alta concentração de sólidos também foi analisado, já que a inibição por produto é o fator mais relevante. Retirar a glicose do meio reacional proporciona melhores rendimentos. Para tentar contornar um dos grandes desafios desse processo, uma estratégia com oscilações na temperatura foi proposta e avaliada.

Enfim, este estudo fornece informações valiosas para o desenvolvimento de um processo com concentrações elevadas de sólidos, o que é importante para melhorias econômicas na produção de combustível celulósico.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi um amplo estudo de diferentes estratégias de hidrólise enzimática para alta concentração de sólidos com o intuito de melhorar a eficiência da hidrólise geral, onde dois tipos diferentes de pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar, o hidrotérmico - BH (que não promove deslignificação) e o método de ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH – BAD (deslignificante), foram aplicados para a posterior produção viável do etanol, tendo em vista o grande número de questões a serem superadas (alta viscosidade do meio, falta de água disponível, diferenças estruturais e químicas entre as biomassas, inibição da adsorção, inibição das enzimas pelo produto final e a diferença de temperatura entre a hidrólise e fermentação, no processo de sacarificação e fermentação simultâneas - SSF).

### 1.1.2 Objetivo Específico

Os objetivos específicos desta tese são:

- Determinar cinéticas de adsorção para Cellic Ctec 2 nos bagaços estudados na temperatura de 25 °C para determinar a máxima adsorção e o tempo de equilíbrio necessário;
- Realizar ensaios de hidrólise enzimática em modo batelada com diferentes cargas de sólidos e avaliar a interferência do tipo de pré-tratamento e do aumento da concentração de massa na HE;
- Promover diferentes estratégias de alimentação na hidrólise enzimática em batelada alimentada a fim de melhorar a conversão de celulose para altas cargas de sólidos;
- Avaliar e modificar estratégias da literatura para HE em altas concentrações de sólidos que mostraram resultados satisfatórios por seus autores (XUE et al., 2012a, 2012b; YANG et al., 2011) para as biomassas deste trabalho (BH e BAD);
- Realizar a etapa de fermentação em SSF para duas temperaturas distintas (34 e 38 °C), com etapa de pré-hidrólise a 50°C, para a biomassa com os melhores resultados em termos de concentração de glicose e conversão de celulose;
- Desenvolver uma estratégia de SSF com perfis de temperatura variáveis com a temperatura de hidrólise enzimática (50 °C), além de utilizar na etapa da pré-hidrólise, a melhor estratégia para altas cargas de sólidos;

## 1.2 Organização do Trabalho

O presente trabalho foi organizado da seguinte forma: no **Capítulo 1** é apresentada a introdução do trabalho, os objetivos geral e específico, bem como a produção bibliográfica obtida no decorrer desta pesquisa. O **Capítulo 2** é composto pela revisão da literatura com toda teoria necessária para a realização deste estudo. A partir do **Capítulo 3** as metodologias experimentais e resultados são apresentados, começando então com os experimentos preliminares como: a composição química dos bagaços pré-tratados pelos métodos hidrotérmico (BH) e ácido sulfúrico diluído seguido de deslignificação com NaOH (BAD), a determinação da atividade enzimática e a quantificação do teor de proteínas dos complexos celulolíticos Celluclast e Cellic Ctec 2. O desempenho de ambos os coquetéis durante a hidrólise enzimática do bagaço hidrotérmico (BH) e a cinética de adsorção dos coquetéis nos bagaços BH e BAD também foram avaliadas neste capítulo. O **Capítulo 4** apresenta o estudo

da hidrólise enzimática em função da carga de sólidos considerando dois tipos de biomassas, BH e BAD, além, de obter dados de hidrólise por longos períodos de tempo (144 horas) para avaliar se é possível aumentar a conversão em tempos muito altos. No **Capítulo 5** foram realizadas também comparações entre as biomassas pré-tratadas (BH e BAD) levando em consideração a alta produção de glicose na etapa de hidrólise enzimática em duas distintas configurações de batelada alimentada. No **Capítulo 6** os estudos foram voltados para uma estratégia diferente de hidrólise enzimática na qual se realizaram modificações no processo desenvolvido por Xue et al. (2012 a), de modo a obterem-se concentrações de glicose satisfatórias, bem como a conversão da celulose em glicose para a hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos para os bagaços. O **Capítulo 7** visou melhorar a estratégia de hidrólise enzimática citada acima, e baseia-se na separação da fase líquida da hidrólise dos bagaços a fim de evitar inibição por produto e manter alta a conversão de celulose em glicose. O **Capítulo 8** foi destinado ao estudo da hidrólise enzimática em forma de reciclo da fase líquida, onde quatro hidrólises foram conduzidas de forma contínua. O objetivo foi de analisar a interferência do produto final sob a conversão da celulose e de tentar contornar esse problema com reciclos do hidrolisado em novas hidrólises com adição de bagaço fresco. No **Capítulo 9** foram descritas e analisadas as sacarificações e fermentações simultâneas (SSF) para a melhor condição de hidrólise estudada, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As SSFs foram feitas somente para o bagaço BAD.

## 1.3 Produção Bibliográfica

### 1.3.1 Trabalhos publicados em anais de congressos

- MACHADO, D.L.; DE ANDRADE, R.R.; DA COSTA, A.C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with high solid concentration for bioethanol production. (Apresentação de Trabalho/Simpósio). In: Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, Campos do Jordão-SP, Brasil, 2017.
- MACHADO, D.L.; RABELO, S.C.; DE ANDRADE, R.R., DA COSTA, A.C. Estudo da influência do tipo de pré-tratamento na hidrólise enzimática em modo batelada alimentada do bagaço de cana-de-açúcar com altas concentrações de sólidos. (Apresentação de Trabalho/Congresso). In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza-CE, Brasil, 2016.
- PEDROSA, N.R.; MACHADO, D.L.; DA COSTA, A.C. Sugarcane bagasse

hydrolysis at high solids concentration. (Apresentação Trabalho/Congresso). In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas-SP, Brasil, 2016.

- CASTAGNINO, L.B.; MACHADO, D.L.; DA COSTA, A.C. Estudo da cinética de adsorção da celulase em bagaço de cana pré-tratado pelo método hidrotérmico. (Apresentação Trabalho/Congresso). In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas-SP, Brasil, 2015.

### **1.3.2 Artigos publicados em revistas científicas**

- MACHADO, D.L; MOREIRA NETO, J; PRADELLA, J.G; BONOMI, A; RABELO, S.C; CARVALHO, A.C. Adsorption characteristics of cellulase and  $\beta$ -glucosidase on Avicel, pretreated sugarcane bagasse, and lignin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62, (5), p. 681-689, 2015.

### **1.3.3 Artigos submetidos para publicação**

- Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with high solid concentration for bioethanol production. Daniele Longo Machado, Rafael Ramos de Andrade, Aline Carvalho da Costa. *Biomass & Bioenergy*.

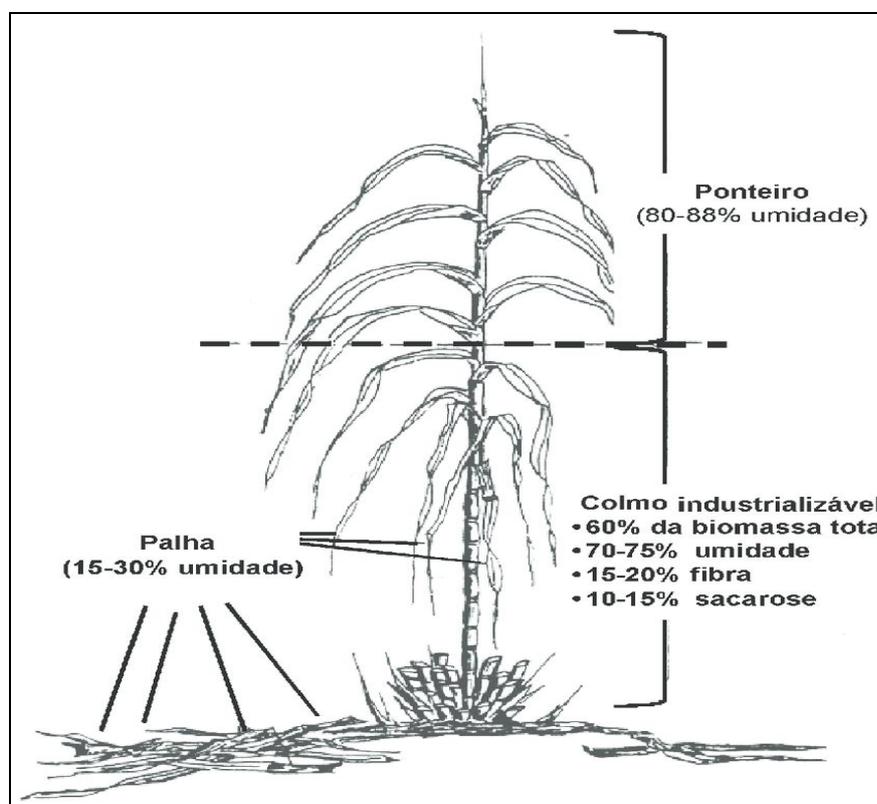
## 2 CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum*) é uma planta tropical pertencente à família das gramíneas ou poáceas juntamente com os gêneros *Zea* e *Sorghum*. A cana-de-açúcar como conhecida atualmente é considerada um híbrido complexo entre duas ou mais espécies do gênero *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. robustum*) (CHEN & CHOU, 1993). De forma geral, a planta (Figura 2.1) é constituída dos colmos, onde a sacarose é predominantemente estocada, das folhas dispostas ao redor da cana, dos nódulos inter-colmos e também da parte superior da planta onde se localiza o ponteiro. As folhas secas que estão para cair ou que já caíram do caule são denominadas de palha.

**Figura 2.1:** Desenho esquemático de uma planta de cana-de-açúcar, suas partes componentes (colmo, ponteiro e palha) e as respectivas composições em termos de umidade e biomassa (fibra e açúcar) Fonte: Adaptação:(MATSUOKA et al., 2012).



O Brasil se destaca como o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. (2016), na safra 2016/17 foram

produzidos e destinados ao setor sucroalcooleiro 691 milhões de toneladas em colmos de cana-de-açúcar que foram cultivados em uma área de 9,1 milhões de hectares, onde 90% se concentra somente na região centro-sul do país. Dentro da produção estima-se que foram gerados aproximadamente 90 milhões de toneladas de bagaço da cana-de-açúcar de alto valor energético.

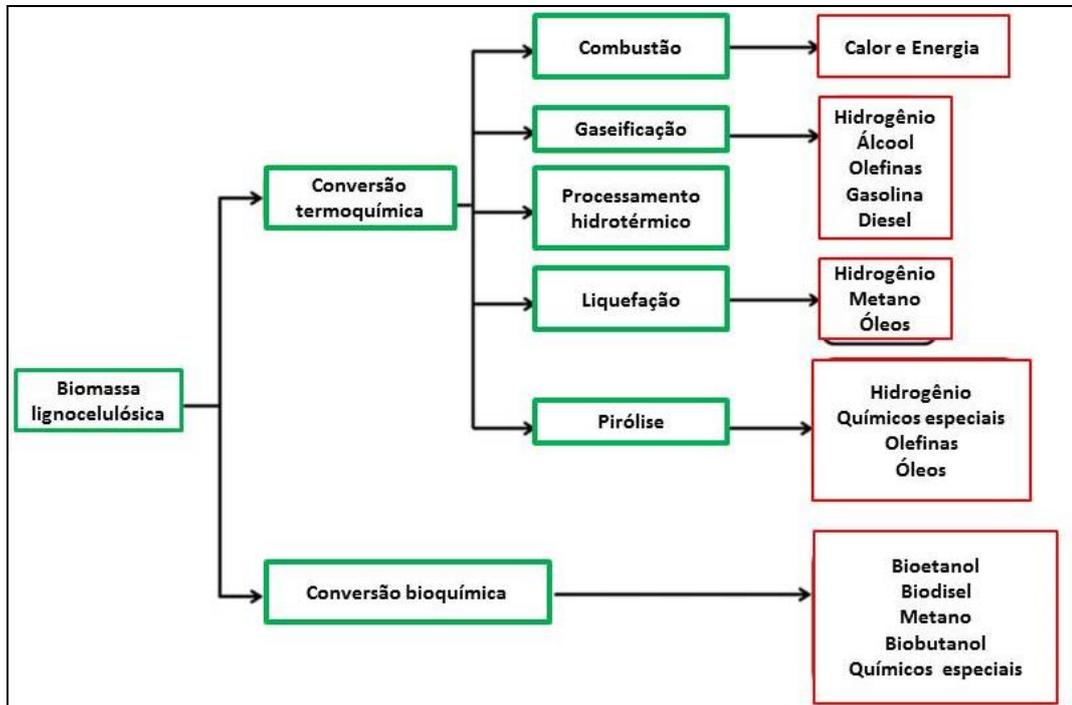
Sendo assim, na indústria da cana-de-açúcar, grandes quantidades de subprodutos agroindustriais (bagaço e outros) são gerados durante a produção de etanol e açúcar. Após a colheita da cana-de-açúcar, obtêm-se três componentes principais: folhas secas, folhas verdes e topos. Os topos são os segmentos da planta de cana-de-açúcar entre a extremidade superior e o último nó do caule com os anexos de folhas verdes, enquanto as folhas secas são conhecidas como palha. A moagem da cana para extrair o suco gera o bagaço. Neste processo, cada tonelada de cana processada gera 140 kg de bagaço e 140 kg de palha, em base seca. Em instalações contemporâneas, o bagaço é atualmente usado como combustível, ou seja, é queimado em caldeiras para atender às demandas de energia da planta industrial, com a energia elétrica excedente sendo exportada para a rede (PEREIRA et al., 2015).

O etanol de segunda geração (E2G) produzido a partir de material lignocelulósicos (bagaço e palha de cana) tem sido considerado o biocombustível com o maior potencial para substituir combustíveis à base de petróleo (MACRELLI S, MOGENSEN J, 2012).

## **2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

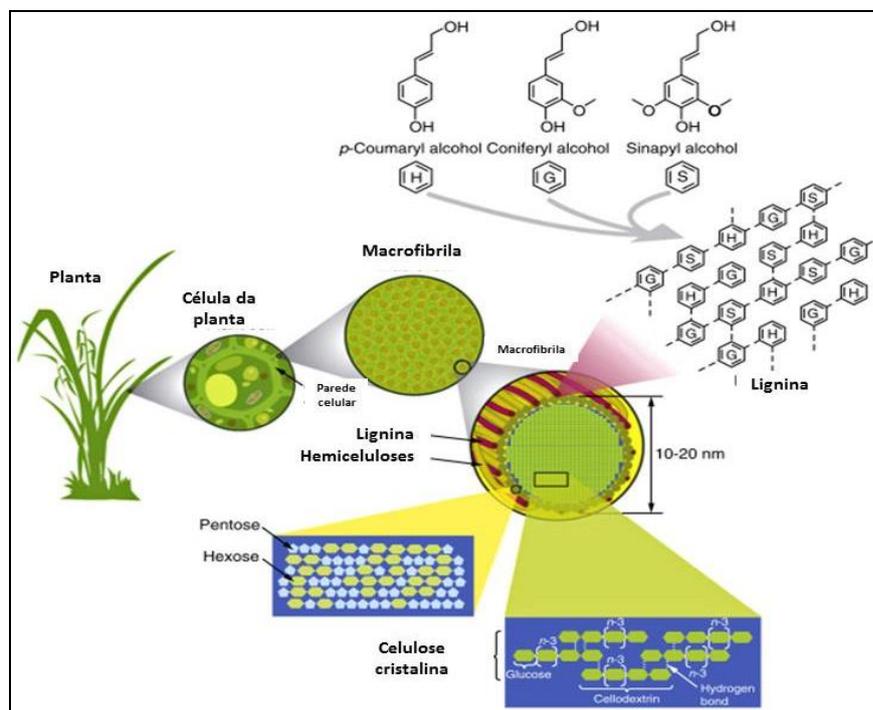
Em geral, a biomassa pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de biocombustíveis líquidos para veículos, e sólidos para queimar e/ou gaseificar e gerar calor, vapor e eletricidade, além também de servir como matéria-prima para a fabricação de vários bioprodutos e bioquímicos (IOELOVICH, 2015). Três tipos de energia podem ser produzidos a partir da lignocelulose através do processamento termoquímico ou bioquímico: os combustíveis líquidos como o etanol ou óleo de pirólise, os combustíveis gasosos como o biogás (metano), e a eletricidade (Figura 2.2).

**Figura 2.2:** Processamentos termoquímico e bioquímico da biomassa lignocelulósica. Fonte: Figura adaptada (MENON; RAO, 2012).



Esses materiais lignocelulósicos são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina (Figura 2.3). Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, e torna a estrutura desses materiais rígidos e pouco reativos. A biomassa lignocelulósica é constituída principalmente por três componentes: celulose, hemiceluloses e lignina, que somadas totalizam em torno de 90% da biomassa seca, os demais 10% são dados por uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (MENON; RAO, 2012). A distribuição desses constituintes varia de acordo com a espécie vegetal, solo onde foi cultivada e aspectos climáticos.

**Figura 2.3:** Estrutura básica da biomassa lignocelulósica. Fonte: Adaptação de (MENG; RAGAUSKAS, 2014).



Os subprodutos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, palha da cana-de-açúcar, palha de trigo, sabugo e palha de milho), subprodutos florestais (madeira, eucalipto) e também os resíduos industriais (indústria do papel) abrangem os tipos de biomassas lignocelulósicas mais disponíveis atualmente no mundo. Na Tabela 2.1 estão listados alguns dos materiais lignocelulósicos juntamente com a composição química.

**Tabela 2.1:** Composição típica da biomassa seca. Fonte: (IOELOVICH, 2015).

Biomassa	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)
<b>Bagaço de cana-de-açúcar</b>	37-39	23-25	19-21
<b>Casca de arroz</b>	34-36	25-27	7-9
<b>Palha de milho</b>	35-37	28-30	18-20
<b>Palha de trigo</b>	34-36	28-30	15-17

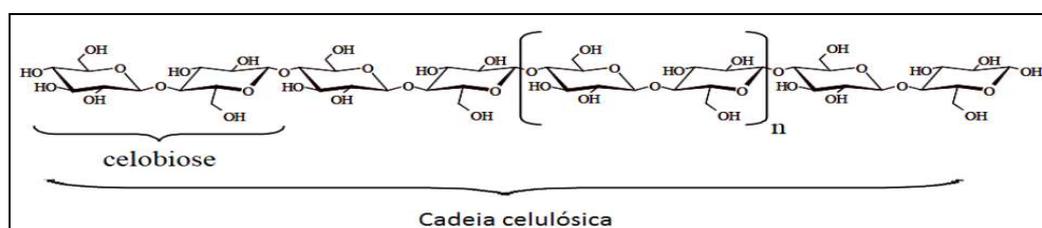
## 2.2.1 Componentes do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço é um subproduto agroindustrial barato, derivado a partir do processamento de cana de açúcar e rico em conteúdo celular que serve para geração de diversos produtos químicos e de energia (Figura 2.2). A composição química do bagaço “*in natura*”, obtido, vai depender da maturidade da cana-de-açúcar, do método de colheita, do tipo de solo e da eficiência do equipamento utilizado para o processo de extração durante a moagem (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016). Mas, em geral, é composto por 45% de fibras lignocelulósicas, 50% de umidade, 2 a 3% de sólidos insolúveis e de 2 a 3% de sólidos solúveis em água. A composição média do bagaço seco está disposta na Tabela 2.1. Abaixo segue breve exposição dos principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

### 2.2.1.1 Celulose

A celulose é um polissacarídeo linear constituído por moléculas de D-glicose ligadas entre si através das ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas (Figura 2.4). Cada ligação glicosídica forma um dímero de glicose chamado também de celobiose, que é definido como unidade conformacional da celulose. A celulose é encontrada principalmente na parede celular da biomassa vegetal e pode existir na forma natural denominada como cristalina (devido às ligações de hidrogênio que facilitam a agregação em fibras) e também na forma amorfa, que é solúvel e pode ser facilmente digerida por enzimas. Nas biomassas lignocelulósicas a celulose é o componente mais abundante.

**Figura 2.4:** Estrutura molecular da cadeia de celulose. Fonte: Adaptado (SANTOS et al., 2012).



No bagaço da cana-de-açúcar o peso molecular médio da celulose pode variar de 157.800 a 168.400 g mol<sup>-1</sup> e o tamanho de suas fibras de celuloses de 1,0 a 1,5 mm. O grau de polimerização refere-se ao número de unidades de glicose no polímero molecular e pode influenciar na eficiência da hidrólise enzimática. O grau médio de polimerização (GP) na celulose do bagaço de cana varia de 974 a 1039 (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016).

### 2.2.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos e semelhantes estruturalmente à celulose, compostos por diferentes pentoses, hexoses e ácidos orgânicos (D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-*O*-metilglucurônico). Geralmente são classificadas de acordo com o principal açúcar presente na cadeia, podendo ser formadas por um monômero (xilanas, arabinanas, etc) ou por dois ou mais tipos de monômeros (glicomananas, xiloglicanas, arabinoglucuronoxilanas, etc) (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

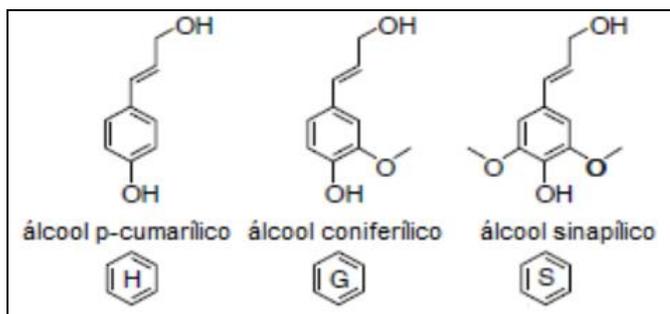
Sua estrutura apresenta ramificações que interagem com a celulose (ligações de hidrogênio) e também se associam com a lignina por ligações covalentes, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. Comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. A reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos ((RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; SANTOS et al., 2012). Entretanto, as hemiceluloses dificultam a digestibilidade enzimática da celulose por contribuírem com a recalcitrância da biomassa, pois recobrem e protegem as fibras de celulose.

No bagaço de cana o peso médio das hemiceluloses é de aproximadamente  $7.380 \text{ g.mol}^{-1}$ . O principal açúcar que compõem as hemiceluloses no bagaço é a xilose (15,5-28,9%), em menores proporções encontram-se: arabinose, manose, ramnose e os ácidos urônicos (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; SUN et al., 2004).

### 2.2.1.3 Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula mais abundante nas biomassas lignocelulósicas. É um polímero aromático altamente ramificado presente na parede celular das plantas, e está ligada a polímeros de celulose formando uma matriz lignocelulósica. Tem uma natureza aromática e amorfa, e sua estrutura varia de acordo com as espécies de plantas de que é derivado. A lignina consiste em três diferentes unidades de fenil-propanos (Figura 2.5): álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. A lignina no bagaço de cana-de-açúcar tem peso molecular em uma faixa média de  $507\text{-}3.973 \text{ g.mol}^{-1}$  (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

**Figura 2.5:** Unidades precursoras da lignina.



No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar sua recuperação após a hidrólise. Devido à íntima associação recalcitrante existente entre os três componentes poliméricos da biomassa, a liberação dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis para produção de etanol está entre as mais importantes e urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento do etanol celulósico (SANTOS et al., 2012).

#### 2.2.1.4 Extrativos

Além dos principais compostos encontrados na biomassa lignocelulósica, são encontradas também uma quantidade de substâncias extrativas e não-extrativas. As cinzas são materiais não extraíveis e são geradas a partir da queima do bagaço.

Após o bagaço ser queimado para geração de energia em usinas com a co-geração, a cinza é gerada como subproduto. A cinza do bagaço de cana-de-açúcar é de cor preta e suas partículas possuem  $2,39 \text{ g cm}^{-3}$  de densidade. Contém cerca de 87,8% de areia, 0,7% de argila e 10,32% de matéria orgânica. No Brasil, a geração de cinzas a partir da queima do bagaço de cana-de-açúcar foi estimada em aproximadamente 2,5 milhões de toneladas por ano, as quais são descartadas no solo e servem principalmente como fertilizantes. O desenvolvimento econômico e tecnológico para a aplicação de cinzas cresceu nos últimos anos. A cinza do bagaço é rica em sílica e, portanto, pode ser usada para fins de reciclagem, como matéria-prima cerâmica, aditivo em cimento, concreto e agregado fino em argamassa (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Os extrativos solúveis, ou seja, aqueles que são solúveis em água ou solventes, tais como: ceras, ácidos graxos, terpenos, álcoois, esteroides e compostos fenólicos de baixo peso molecular, no bagaço de cana de açúcar, variam de 2,3 a 10,5% da composição química total. Para fins de análise química, os extrativos geralmente são removidos do bagaço de cana-de-

açúcar. Os extrativos são encontrados em sua grande maioria na raiz, caule e folhas, sendo responsáveis por determinadas características das plantas, como cor, cheiro e resistência natural ao apodrecimento (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; FENGEL; WEGENER, 1989).

### **2.3 PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

A busca para aumentar a produtividade de etanol da cana-de-açúcar por área plantada motivou o desenvolvimento da produção do etanol de segunda geração (E2G) no Brasil. Através desta tecnologia, o etanol é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar. Assim, toda a biomassa da cana-de-açúcar poderia ser utilizada industrialmente quando os processos de produção de E1G e E2G estivessem integrados, o que melhoraria a cadeia produtiva do etanol (MORAES et al., 2015).

No entanto, o custo da produção do etanol a partir da lignocelulose ainda é excessivamente alto, que é o principal motivo do não avanço da sua produção. Devido à forte cristalinidade da estrutura da celulose e da presença do complexo lignocelulósico existente, alguns pré-tratamentos devem ser realizados anteriormente à etapa de hidrólise enzimática, estágio onde os açúcares são formados a partir da quebra dos polissacarídeos. Subsequentemente, ocorre a etapa de fermentação dos açúcares para a produção do etanol. A celulose e hemiceluloses estão entre os polissacarídeos de maior interesse presentes no bagaço e na palha da cana-de-açúcar para a produção de subprodutos (MORAES et al., 2015).

Nota-se, então, que a produção do E2G a partir do bagaço de cana-de-açúcar e de outras biomassas pode ser dividida em quatro etapas principais que incluem um pré-tratamento adequado (para facilitar a hidrólise de material lignocelulósico), a hidrólise, a fermentação e a recuperação do produto. Nos últimos anos, foram realizados esforços para desenvolver tecnologias para produção de etanol de segunda geração, especialmente na fase de pré-tratamento (ZABED et al., 2017).

A Agência internacional de energia - AIE estima que até 2030 o custo da produção de bioetanol pode atingir US\$ 0,55-0,65/lge (equivalente em litro de gasolina). A previsão também apontou o custo de produção em 2050, onde atingiria uma faixa de US\$ 0,55-0,60/lge. Além disso, a previsão mostra cenários com a redução de 50% da emissão anual de dióxido de carbono até 2050 (ADITIYA et al., 2016).

Contudo, o futuro sustentável para a produção do etanol de segunda geração está fortemente relacionado com o desenvolvimento da tecnologia atual. O avanço da tecnologia é o que faz com que a produção atual de 270 L/tonelada de biomassa seja de até 400 L/tonelada de biomassa no futuro (~ 2030), conforme previsto pelo Laboratório Nacional de Energia

Renovável - NREL (LARSON, 2008). O sucesso da produção do etanol de segunda geração também é fortemente dependente das políticas governamentais (ADITIYA et al., 2016).

### 2.3.1 Pré-tratamento

Uma vez que os materiais lignocelulósicos “*in natura*” exibem uma forte recalcitrância, é necessário que um processo de pré-tratamento adequado seja realizado para facilitar, posteriormente, o acesso das enzimas aos polissacarídeos da biomassa. Nas últimas décadas foram desenvolvidos diferentes processos de pré-tratamento para melhorar a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos (SUN et al., 2016). Os principais objetivos da etapa do pré-tratamento incluem: (1) redução da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose, bem como aumento da porosidade dos polissacarídeos para aumentar os rendimentos de açúcares durante a posterior hidrólise enzimática, (2) evitar a degradação de açúcares (particularmente as hexoses), bem como aqueles derivados das hemiceluloses, (3) minimizar a formação de produtos inibitórios para os processos subsequentes, (4) recuperar a lignina para conversão em co-produtos de alto valor agregado e (5) minimizar os custos com a energia e ter facilidade na operação. Além desses objetivos, muitos outros fatores devem ser levados em consideração, como por exemplo, (i) o tipo e o rendimento dos produtos finais; (ii) a escolha e o desempenho dos processos de “down-stream”; (iii) os requisitos de energia e água; (iv) o volume de efluentes para tratamento; (v) o nível de emissões de CO<sub>2</sub> e os (vi) custos da inclusão (ou não) de lavagem, detoxificação e processos de recuperação de solventes ou catalisadores, bem como o uso de materiais anticorrosivos especiais.

De maneira indireta outros fatores também devem ser pensados ao se escolher o método de pré-tratamento, como: (i) as quantidades de enzimas e o complexo enzimático que serão adicionados na sacarificação; (ii) o grau de tolerância dos microrganismos aos produtos e subprodutos da transformação do açúcar e da lignina; (iii) o uso de complexos enzimáticos capazes de hidrolisar e converter em glicose e xilose em uma escala comercial; (iv) a configuração e integração dos processos de sacarificação e fermentação; (v) as barreiras físicas da lignina ou de oligômeros de celulose e hemiceluloses que permanecem na fração sólida após o pré-tratamento e (vi) a quantidade de sólidos (SEIDL; GOULART, 2016).

Enfim, a escolha do processo de pré-tratamento pode variar de acordo com o tipo de matéria-prima devido à diferença em suas características físicas e composição química e também, de acordo com múltiplos outros fatores como os citados acima. A Tabela 2.2 resume alguns dos métodos de pré-tratamento disponíveis que podem ser utilizados na produção do E2G. Estes métodos de pré-tratamento são categoricamente especificados como pré-

tratamento biológico, pré-tratamento químico, pré-tratamento físico e pré-tratamento físico-químico (ADITIYA et al., 2016). Os métodos de pré-tratamento diferem uns dos outros em relação ao modo de ação, condições de reação e resultados globais. Em particular, cada técnica de pré-tratamento tem algumas vantagens e desvantagens, como mostrado na Tabela 2.3 (ZABED et al., 2017).

**Tabela 2.2:** Efeitos dos diferentes processos de pré-tratamento na composição e estrutura dos materiais lignocelulósicos. Fonte: (SUN et al., 2016).

<b>Categoria</b>	<b>Métodos de pré-tratamento</b>	<b>Remoção lignina</b>	<b>Remoção hemiceluloses</b>	<b>Aumento da área acessível</b>	<b>Aumento da porosidade</b>	<b>Decristalinização da celulose</b>	<b>Geração de inibidores</b>
<b>Físico</b>	Mecânico	-	-	A	-	A	B
<b>Químico</b>	Alcalino	A	A	A	A	-	B
	Ácido-diluído	M	A	A	M	-	A
	Líquidos iônicos	M	B	A	A	A	B
<b>Físico-Químico</b>	Hidrotérmico	M	A	M	M	-	A
	Explosão a vapor	B	A	A	A	B	A
<b>Biológico</b>	Fungos	A	M	A	A	-	B

A: Efeito alto; M: Efeito médio; B: Efeito baixo.

**Tabela 2.3:** Vantagens e desvantagens de alguns dos diferentes métodos de pré-tratamento. Fonte: Adaptação: (ZABED et al., 2017).

<b>Categoria</b>	<b>Método do pré-tratamento</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Físico</b>	Mecânico	-Rompe a estrutura da lignocelulose; -Reduz a cristalinidade da celulose.	-Alto consumo energético; -Não economicamente viável.
	Alcalino	-Baixa degradação dos açúcares; -Alteração na estrutura de lignina; -Operação a baixa temperatura	-Conversão dos álcalis em sais irre recuperáveis ou incorporação como sais na biomassa; -Necessidade de ajuste do pH.
<b>Químico</b>	Ácido-diluído	-Alta taxa de reação e altos rendimentos; -Menor problema de corrosão e formação de inibidores em comparação com o pré-tratamento ácido concentrado.	-Pouca remoção de lignina; -Lavagem da biomassa pré-tratada e neutralização antes da hidrólise enzimática; -Remover os sais da neutralização
	Líquidos iônicos	-Não formação de gases tóxicos ou explosivos; -Degradação mínima dos produtos de desejados	-Caro; -Lavagem antes da reutilização; -Poucos métodos comerciais de recuperação dos LI.
<b>Físico-Químico</b>	Hidrotérmico	-Não requer catalisadores ou reagentes químicos; -Baixo impacto ambiental; -Aumento da área superficial;	-Alta demanda de água; -Degradação das hemiceluloses; -Alto consumo energético
	Explosão a vapor	-Aumento da área superficial acessível; -Diminuição do grau de polimerização; -Desenvolvido industrialmente; -Sem restrições ambientais significativas.	-Menos eficaz para madeira macia; -Degradação parcial de pentoses e lignina; -Perda de rendimento e formação de inibidores.
<b>Biológico</b>	Fungos	-Redução do grau de polimerização da celulose e das hemiceluloses;	
		-Sem adição de químicos; -Baixa demanda energética; -Baixos custos de capital; -Condições ambientais suaves; -Baixa formação de inibidores.	-Taxa de degradação e deslignificação muito lentas; -Perda de carboidratos consumidos pelos microrganismos; -Longos tempos de residência (10-14 dias).

A Tabela 2.2 mostra que alguns pré-tratamentos funcionam preferencialmente para: (1) reduzir a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, quebrando as interações hidrofóbicas entre as glicoses bem como as ligações de hidrogênio que ligam os monômeros (Líquido Iônico, Biológico e Alcalino); (2) separação total ou parcial da lignina dos demais polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) por clivagem das ligações (Alcalino, Biológico e Líquido Iônico); (3) reduzir a polimerização, alterar a estrutura ou redistribuir a lignina na parede celular (Explosão a Vapor, Alcalino e Hidrotérmico); (4) despolimerizar ou dissolver as hemiceluloses (Ácido Diluído, Explosão a Vapor, Líquido Iônico e Hidrotérmico); (5) aumentar a área superficial e a porosidade bem como reduzir a espessura, o volume, o tamanho de partícula e a presença de feixes vasculares na parede celular (Físico e Explosão a Vapor) (SEIDL; GOULART, 2016).

Nas seções a seguir os processos de pré-tratamento usados neste trabalho, hidrotérmico e ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH, são revisados para discutir seus respectivos impactos no bagaço de cana-de-açúcar e seus efeitos na melhoria da hidrólise enzimática.

### ***2.3.1.1 Pré-tratamento Hidrotérmico***

O pré-tratamento hidrotérmico emprega altas temperaturas (160-240 °C) e pressão para manter a água em estado líquido sem adição de produtos químicos ou catalisadores, exceto a água. Além disso, esse pré-tratamento provoca pouca erosão no equipamento e forma quantidades baixas de inibidores, proporcionando pouca inibição para as etapas seguintes de hidrólise enzimática e fermentação (ALVIRA et al., 2010; WANG et al., 2012; ZHUANG et al., 2016).

Neste tipo de pré-tratamento, as biomassas lignocelulósicas sofrem um processo de cozimento, melhorando a digestibilidade da celulose, com a vantagem do hidrolisado produzido apresentar pouca concentração de inibidores. A água quente tem uma constante dielétrica elevada e assim permite dissolver quase todas as hemiceluloses e ainda certa quantidade de lignina. Logo, a água quente atua como um ácido que hidrolisa as hemiceluloses, onde ocorre a liberação de açúcares e ácidos (ZHENG et al., 2009). O pKa da água diminui quando a temperatura se eleva e o pH passa de 7 para aproximadamente 5. Com isso, o pré-tratamento promove as clivagens das ligações do complexo lignina-carboidratos com a ruptura das ligações glicosídicas dos polissacarídeos, principalmente das hemiceluloses. Nesse momento o ácido acético formado a partir da desacetilação da fração hemicelulósica atua como catalisador da reação de hidrólise da biomassa, que despolimeriza

mais hemiceluloses (processo autocatalítico). A deslignificação completa não é possível neste pré-tratamento devido à recondensação dos componentes solúveis originados da lignina. Com isso, surge um efeito negativo sobre a subsequente reação de hidrólise enzimática, pois essa lignina depositada funciona como barreira física para a acessibilidade da celulase à celulose e/ou adsorção não produtiva de enzimas (WANG et al., 2015; ZHUANG et al., 2016).

Para evitar a formação de inibidores e a degradação dos açúcares durante o método hidrotérmico, o pH deve ser controlado entre 4 e 7 durante todo o processo. Nessa faixa de pH os açúcares hemicelulósicos são retidos na forma oligomérica e a formação de monômeros é minimizada, havendo, então, menor degradação de produtos (MOOD et al., 2013). Embora seja vantajoso do ponto de vista da formação de inibidores, os açúcares oligoméricos não são diretamente metabolizados pela maioria dos microrganismos e uma etapa de pós-hidrólise é necessária para aproveitar a fração hemicelulósica (NAKASU et al., 2016)

Alguns estudos mostraram que o pré-tratamento hidrotérmico é um método eficiente para várias biomassas, incluindo espigas de milho (GARROTE & DOMINGUEZ, 2001), bagaço de cana-de-açúcar (LASER et al., 2002) e palha de trigo (PEREZ et al., 2008). Relata-se que esse método solubiliza mais de 80 % das hemiceluloses presentes na biomassa (LASER et al., 2002).

Xiao et al.(2014) investigaram as alterações da composição química do bambu em diferentes condições do pré-tratamento hidrotérmico (140 a 200 °C por 10 a 120 min) e exploraram seus comportamentos na hidrólise enzimática. A maioria das hemiceluloses foi gradualmente removida do bambu conforme o aumento da severidade do pré-tratamento, enquanto que apenas uma pequena quantidade de celulose e lignina foi degradada.

Em geral, os pré-tratamentos hidrotérmicos são considerados ambientalmente corretos muito atraentes por causa de suas excelentes vantagens, tais como: nenhum requisito de catalisador, baixo custo do reator, conteúdo de inibidor relativamente baixo em amostras pré-tratadas, não necessidade de etapas de neutralização e utilização direta de materiais lignocelulósicos úmidos ou frescos. (SUN et al., 2016).

### ***2.3.1.2 Pré-tratamento com Ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH***

Conforme explicado na Tabela 2.2, o pré-tratamento ácido pode deslignificar e aumentar a área superficial da fibra de celulose. No entanto, dependendo do ácido a ser utilizado, sua quantidade pode ser alta (50%, com base na quantidade inicial de materiais secos). O pré-tratamento ácido diluído com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é um dos mais conhecidos e aplicados, sendo, geralmente, realizado a temperaturas de 100 a 200 °C com uma concentração baixa de

0,5 a 2,5%. No entanto, o pré-tratamento com ácido mineral não é propício para a remoção de lignina e um processo de deslignificação seguinte pode melhorar a digestibilidade dos resíduos lignocelulósicos (SUN et al., 2016).

A fim de melhorar o desempenho do pré-tratamento sem adicionar grandes quantidades de ácidos, um segundo pré-tratamento pode ser aplicado para remover parcialmente a lignina. O pré-tratamento alcalino é conhecido como um método adequado para a deslignificação e, portanto, pode ser usado em combinação com o pré-tratamento com ácido diluído (MOOD et al., 2013).

O pré-tratamento alcalino solubiliza em melhor proporção a lignina, o que torna a celulose mais acessível para a etapa posterior de hidrólise. No pré-tratamento alcalino, NaOH e cal ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) são encontradas como as soluções alcalinas mais frequentemente utilizadas, conforme realizado em várias pesquisas (CHENG & ZHENG, 2010; XU et al., 2010; RABELO et al., 2007). A biomassa lignocelulósica pré-tratada com NaOH, por exemplo, apresenta maior porosidade, o que leva a um melhor rendimento de glicose após a hidrólise enzimática. A utilização de NaOH diluído é mais sábia do que a utilização de NaOH concentrado quando se pensa nos benefícios ambientais e econômicos (ADITIYA et al., 2016).

Em um estudo, o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com a combinação dos pré-tratamentos alcalino (NaOH) e ácido - peracético (PAA) em condições suaves. Resumidamente, no primeiro passo, utilizou-se 10% de NaOH (com base na quantidade inicial dos materiais secos) com uma razão líquido/sólido de 3:1 a 90 °C durante 1,5 h. Em seguida, utilizou-se ácido peracético (poderoso agente oxidante) a 10% e a 75 °C durante 2,5 h para deslignificar a biomassa obtida no primeiro passo. Como resultado, o rendimento de açúcares redutores produzidos durante a hidrólise enzimática (120 h, carga de celulase de 15 FPU/g de sólido) chegou a 92,04%. Portanto, o pré-tratamento combinado (por exemplo, alcalino-ácido) em comparação com os pré-tratamentos alcalino ou ácido em um único estágio, proporcionou condições mais suaves e uma deslignificação mais eficaz com menores degradações de carboidratos (LU et al., 2009).

Outro grupo de pesquisadores, Lee et al. (2015), exploraram a viabilidade de aplicar um pré-tratamento ácido com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído combinado com o pré-tratamento de NaOH em palha de milho. Foi relatado que o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído, utilizado no primeiro passo, hidrolisou de 74,6-77,3% de hemiceluloses, enquanto o NaOH utilizado no segundo passo removeu 85,9-89,4% de lignina. Após o pré-tratamento combinado, a digestibilidade enzimática da palha de milho

foi significativamente melhor, onde se obteve cerca de 89,1-97,9% de glicose e 71,0-75,9% de xilose (SUN et al., 2016).

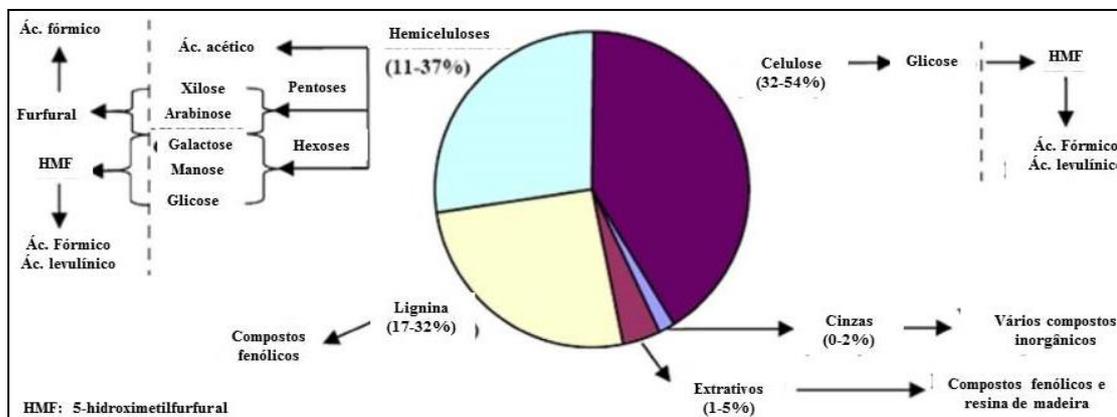
De um modo geral, a maioria dos pré-tratamentos combinados mostra um efeito benéfico na etapa posterior de hidrólise enzimática para os materiais lignocelulósicos, mas o aumento do custo operacional deve ser visto como uma barreira. Um pré-tratamento combinado adequado não deve apenas melhorar a digestibilidade de materiais lignocelulósicos a um custo operacional relativamente baixo, mas também maximizar a utilização de componentes lignocelulósicos. Para facilitar a recuperação de lignina e das hemiceluloses ou seus derivados, deve-se escolher uma abordagem adequada que separe individualmente as hemiceluloses e a lignina, além, é claro, de manter o resíduo sólido rico em celulose para a hidrólise enzimática. Uma vez que as hemiceluloses estão intimamente associadas à lignina em materiais lignocelulósicos e a maioria dos processos de deslignificação é acompanhada pela remoção das hemiceluloses, recomenda-se que as hemiceluloses sejam separadas no primeiro passo de um processo de pré-tratamento combinado (SUN et al., 2016).

### **2.3.2 Formação de inibidores e detoxificação**

Os compostos formados durante o processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica podem ser inibitórios para a atividade enzimática, bem como para o crescimento e metabolismo microbiano. As condições, muitas vezes severas, que são aplicadas durante o pré-tratamento termoquímico podem levar à quebra parcial dos principais componentes lignocelulósicos (celulose, hemiceluloses, lignina, extrativos e cinzas) em diferentes produtos, tais como, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, hidroximetilfurfural (HMF), furfural e outros compostos fenólicos (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; ZABED et al., 2017).

Estes subprodutos, muitas vezes em quantidades baixas atuam como inibidores tanto para microrganismos fermentadores como para enzimas de degradação da celulose. Os inibidores são classificados em três grupos principais com base na origem da decomposição, tais como, ácidos alifáticos, derivados de furano e compostos fenólicos. A formação de diferentes produtos de degradação está descrita na Figura 2.6. O tipo e as quantidades de inibidores gerados durante o pré-tratamento dependem da natureza da biomassa e das condições de pré-tratamento, que incluem temperatura, tempo, pressão, pH e adição de catalisadores (ZABED et al., 2017).

**Figura 2.6:** Componentes bioquímicos da biomassa lignocelulósica e seus potenciais produtos da degradação. Fonte: Adaptação de Zabed et al. (2017). As linhas tracejadas denotam os produtos da degradação secundária.



Existem várias maneiras de neutralizar os problemas com os inibidores, removendo-os ou neutralizando-os da solução pré-tratada. Esses métodos são amplamente classificados em técnicas físicas, químicas, físico-químicas, biológicas e emergentes. Um método de detoxificação eficiente deve remover os inibidores seletivamente, além de ser barato e fácil de integrar no processo. Em geral, a remoção de inibidores pode ser feita por algumas técnicas que incluem extração, permuta iônica, carvão ativo, sobreposição, remoção de vapor ou evaporação a baixo pH e ação enzimática usando lacase e peroxidase (KLINKE et al., 2004).

### 2.3.3 Hidrólise

Após o pré-tratamento, é realizada a etapa de hidrólise, a qual é responsável pela quebra da celulose e das hemiceluloses em açúcares monoméricos, principalmente glicose e xilose. A hidrólise poder ser realizada tanto por via química como enzimática. Na rota química utilizam-se ácidos concentrados ou diluídos e na rota enzimática faz-se o uso de complexos enzimáticos celulolíticos (ZABED et al., 2017). Contudo, o processo de hidrólise deve ser realizado de forma economicamente viável e com o uso de tecnologias ambientalmente amigáveis. O Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) estimou uma redução nos custos associados ao processo enzimático de até quatro vezes mais do que para o processo de ácido diluído. As duas rotas são descritas nos itens 2.3.3.1 e 2.3.3.2 (PENGILLY, 2013).

#### 2.3.3.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida da biomassa pré-tratada pode ser feita através de duas abordagens, tratamento com ácido diluído e tratamento com ácidos concentrados. O primeiro método é feito em altas temperatura e pressão, que exige um curto tempo de reação, variando entre

segundos e minutos, enquanto que no tratamento com ácido concentrado a temperatura pode ser mais baixa. O ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) é o principal ácido utilizado em ambas as abordagens de hidrólise ácida, embora outros ácidos inorgânicos, bem como alguns ácidos orgânicos fracos, tais como ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico ( $HNO_3$ ), ácidos trifluoroacéticos (TFA) e ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) também possam ser usados (ZABED et al., 2017).

O ácido diluído é geralmente aplicado para fins de hidrólise das hemiceluloses e pré-tratamento de celulose. No entanto, ambos os polímeros podem ser hidrolisados nesta metodologia, que requer dois estágios. O primeiro estágio é realizado a baixa temperatura para maximizar a conversão das hemiceluloses, já que estas são despolimerizadas a temperaturas mais brandas que a celulose. Por outro lado, o segundo estágio é conduzido em temperatura elevada (230 a 240 °C) de forma a converter a celulose em glicose. Normalmente, a concentração do ácido utilizado para esta hidrólise varia de 0,5% a 1,5%. Porém, a alta temperatura aumenta as taxas de decomposição dos açúcares, causando assim a formação de compostos tóxicos, como furfural e 5-hidroximetil furfural (HMF). Estes compostos inibem as células de levedura (etapa fermentação), que causa uma menor taxa de produção de etanol (ZABED et al., 2017).

A hidrólise por via do ácido concentrado pode ser aplicada para hidrolisar as hemiceluloses e celulose. A concentração de ácido utilizado para este propósito varia entre 41% a 100%. O tempo de reação requerido para esse método geralmente é muito maior do que o tempo necessário para hidrólise de ácido diluído. No entanto, o ácido concentrado oferece uma conversão completa e rápida de celulose em glicose e das hemiceluloses em açúcares de cinco carbonos (ZABED et al., 2017).

A hidrólise ácida, seja via diluída ou concentrada, apresenta alguns pontos difíceis, tais quais: a lignina restringe o acesso à celulose (precisando ser removida anteriormente); condições para remoção da lignina são severas e demoradas; o reagente utilizado na hidrólise ácida pode atacar os açúcares formados, reduzindo a conversão da reação. Além disso, apresenta desvantagens em relação às condições de manuseio severas (pH e temperatura), o alto custo de manutenção devido aos problemas de corrosão e os custos com energia (FENGEL, D., WEGENER, 1989).

### ***2.3.3.2 Hidrólise enzimática***

Devido a uma gama maior de vantagens como a perda minimizada de monômeros de açúcares, a diminuição da produção de subprodutos durante a hidrólise e maiores eficiências

de conversão, os processos baseados em enzimas são preferidos em relação aos tratamentos químicos, como a hidrólise ácida. Isso se dá, pois na hidrólise enzimática as condições de operação (pressão, temperatura) são baixas e moderadas e apresentam baixos requisitos de processo, além das enzimas celulolíticas serem altamente específicas ao substrato celulósico. A desvantagem, no entanto, é que o processo é mais lento e caro (PENGILLY, 2013).

Após a etapa de pré-tratamento, a celulose e as hemiceluloses residuais precisam ser hidrolisadas em monômeros de açúcar fermentescíveis para serem transformados em etanol. Logo, a hidrólise enzimática é influenciada por vários fatores, incluindo o tipo de substrato e sua concentração, a combinação de enzimas e suas condições de dosagem e processo (temperatura, pH, tempo de residência etc.). A recalcitrância intrínseca da lignocelulose dificulta a conversão enzimática efetiva dos polímeros de celulose e hemiceluloses. Além disso, a taxa de conversão de celulose cai acentuadamente à medida que a hidrólise prossegue. Esses fatores tornam a produção de enzimas e seu uso durante a hidrólise um gargalo para a produção de etanol (PENGILLY, 2013).

#### ***2.3.3.2.1 Enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose***

Na natureza, a degradação das lignoceluloses ocorre através de uma bateria de enzimas oxidativas e hidrolíticas, as quais são produzidas por várias bactérias e fungos. Existem inúmeras enzimas com diferentes atividades catalíticas envolvidas na degradação da lignocelulose.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) classificou as enzimas de acordo com um código, EC, de quatro números. Este número EC é baseado na reação catalisada e na especificidade do substrato. No caso das hidrolases, este número corresponde à EC 3.2.1.X, onde o primeiro dígito refere-se à classe de enzima (hidrolases), o segundo dígito refere-se à subclasse e sua capacidade de hidrolisar a ligação glicosídica, o terceiro número corresponde ao doador do grupo funcional (água) e o quarto refere-se à molécula aceitadora, que é o substrato específico (PENGILLY, 2013).

As enzimas centrais que estão envolvidas na degradação da lignocelulose são as chamadas celulasas altamente específicas ao substrato. Essas enzimas são produzidas por plantas superiores, alguns invertebrados e principalmente por microrganismos. Existem vários tipos de microrganismos que podem produzir sistemas de celulasas. Atualmente, as enzimas utilizadas para a desconstrução de biomassa são derivadas de fungos como *Trichoderma* e *Aspergillus*. O fungo *Trichoderma reesei* é atualmente o produtor predominante de enzimas

celulolíticas industriais que segrega os sistemas enzimáticos capazes de degradar a celulose (PENGILLY, 2013).

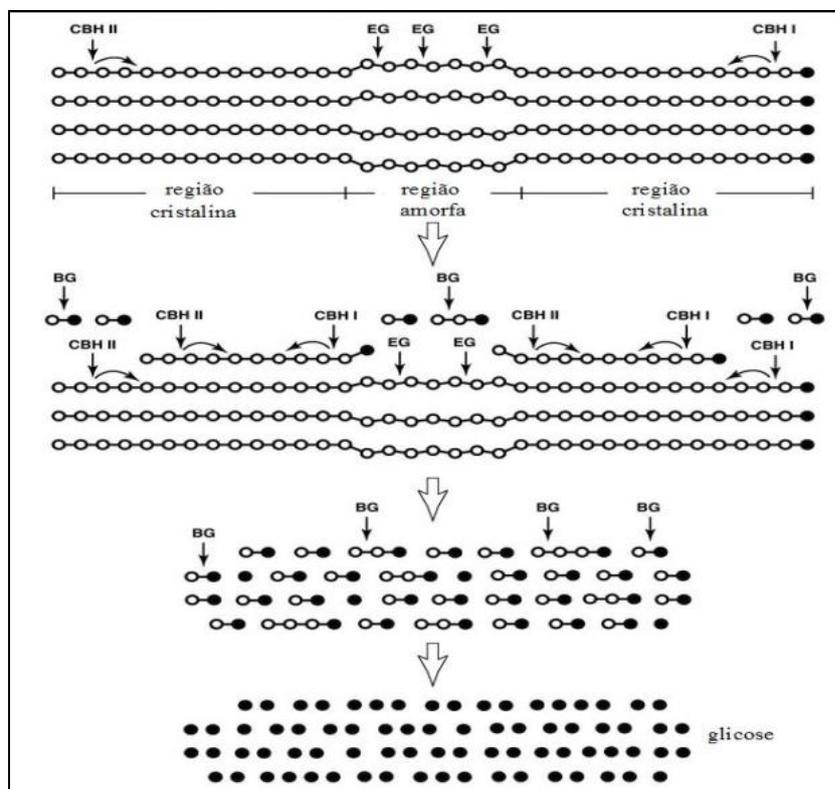
As três classes de enzimas que constituem o complexo celulolítico envolvidas na degradação da celulose são: 1) exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.91), que hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses, 2) endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória, e 3) 1,4- $\beta$ -D-glucosidases (EC 3.2.1.21), que promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuoligossacarídeos (Figura 2.7).

O papel das endoglucanases é degradar as regiões menos cristalinizadas da fibra de celulose (ligações internas da cadeia de celulose), produzindo oligossacarídeos e celobiose. Essas enzimas hidrolisam de forma aleatória as ligações  $\beta$ -(1,4)-glicosídicas internas na cadeia de celulose, concentrando-se principalmente nas regiões amorfas dentro da celulose.

As celobiohidrolases (CBH) ou exoglucosidases atuam nas regiões terminais do polímero de celulose, promovendo sua despolimerização gradativa pela remoção de unidades de celobiose terminais. Estas enzimas ainda são divididas em dois grupos, CBH I e CBH II. As CBH I hidrolisam as unidades de celobiose das extremidades redutoras, enquanto as enzimas CBH II atuam hidrolisando as extremidades não redutoras da cadeia. Já as  $\beta$ -glucosidases ou celobiasas são necessárias para hidrolisar as unidades de celobiose em glicose, e com isso aliviam o efeito inibidor desses açúcares sob as endo e exoglucanases. Atualmente, os complexos enzimáticos industriais já possuem uma quantidade ótima das enzimas  $\beta$ -glucosidases, sem necessidade de suplementação extra para evitar que a celobiose se acumule no meio de hidrólise.

**Figura 2.7:** Ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico sobre a celulose.

Fonte: Adaptação: (GUSAKOV et al., 2011).



Além dos três grupos principais das enzimas celulasas, existem também enzimas auxiliares que atacam as hemiceluloses, como as glucomanases, xilanases,  $\beta$ -xilosidases, galactomanases, entre outras. Todas essas enzimas trabalham juntas em sinergismo para sacarificar a celulose, criando novas regiões disponíveis, eliminando obstáculos e aliviando a inibição do produto final (PENGILLY, 2013). Atualmente, um novo grupo de enzimas foi identificado nos coquetéis enzimáticos mais atuais, denominadas como mono-oxigenases polissacarídicas dependentes do cobre (GH61). Essas enzimas promovem a hidrólise da celulose em conjunto com as demais celulasas. Elas contêm superfícies planas de ligação ao substrato e clivam as cadeias de polissacarídeos em sua forma cristalina através de um mecanismo de oxidação, que é dependente na presença de um doador de elétrons, como os íons metálicos divalentes. A Cellic CTec2, por exemplo, produzido pela Novozymes, contém as enzimas GH61, e quando comparado com coquetéis mais antigos, este apresenta melhor desempenho hidrolítico (BANERJEE et al., 2010).

Heidorne et al. (2006) observaram e reconheceram pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas: sinergia endoglucanase-exoglucanase: a endoglucanase disponibiliza terminais redutores e não redutores para a atuação das CBH I e CBH II, respectivamente; sinergia exoglucanase-exoglucanase: as CBH I e CBH II atuam conjuntamente nos terminais

liberados pela hidrólise das endoglucanases; sinergias exoglucanase- $\beta$ -glucosidase e endoglucanase- $\beta$ -glucosidase: as celobiohidrolases e endoglucanases liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a  $\beta$ -glucosidase.

O rendimento da hidrólise enzimática é determinado por muitos fatores, os quais podem ser classificados como fatores relacionados à enzima e relacionados aos substratos. Na seção seguinte esses fatores são detalhados separadamente.

### ***2.3.3.3 Fatores que influenciam a sacarificação enzimática***

A hidrólise de celulose ocorre em um sistema heterogêneo de duas fases, onde as enzimas estão dissolvidas na fase líquida e a celulose existe como uma fase sólida. Além disso, a própria celulose é um polímero heterogêneo, constituído por formas cristalinas e amorfas, que requer uma multiplicidade de enzimas pertencentes a pelo menos três classes diferentes (numeradas no item 2.3.3.2.1) para uma hidrólise eficiente. Assim, os fatores que afetam a degradação enzimática da celulose podem ser divididos em dois grupos:

1. Fatores relacionados à enzima, e,
2. Fatores relacionados ao substrato.

Embora esta divisão entre os fatores seja feita, é importante ressaltar que muitos dos fatores são inter-relacionados durante um processo de hidrólise, o que torna difícil a quantificação isolada de cada um. Portanto, a digestibilidade da biomassa é altamente dependente da combinação da composição do substrato, do tipo de pré-tratamento e da dosagem e eficiência das enzimas utilizadas para hidrólise. A seguir tem-se um breve detalhamento dos fatores separadamente.

#### ***2.3.3.3.1 Fatores relacionados à enzima***

Vários fatores associados à natureza do sistema enzimático de celulase foram sugeridos como sendo influentes durante o processo de hidrólise. Estes incluem:

1. Concentração de enzimas,
2. Adsorção,
3. Sinergismo,
4. Inibição pelo produto final,
5. Desativação mecânica (tensão de cisalhamento do fluido ou interface gás-líquido),

## 6. Inativação térmica e

## 7. Adsorção Irreversível (não produtiva) à lignina.

Em geral, a conversão do substrato aumenta com o aumento de concentração/dosagem da enzima, mas, como já mostrado em alguns trabalhos, o aumento da conversão não é proporcional ao aumento da dosagem enzimática (ANDERSEN, 2007; MARTINS, 2015). Como mencionado anteriormente, a hidrólise de celulose difere da maioria das outras reações enzimáticas pelo fato de que o substrato é insolúvel; conseqüentemente, para garantir a reação, o contato físico, isto é, a adsorção das enzimas ao substrato, é pré-requisito para hidrólise de celulose.

Além da adsorção produtiva à celulose, as celulasas também adsorvem na lignina, o que torna a adsorção não produtiva (OOSHIMA et al., 1990). Esta adsorção é altamente indesejada, pois é irreversível e explica a perda contínua da enzima ativa durante o processo de hidrólise. Outros fatores, como desativação mecânica (alteração permanente devido a tensão de cisalhamento do fluido ou interface gás-líquido) e desativação térmica (alteração temporária/reversível) das enzimas durante o processo industrial de hidrólise da lignocelulose (T~50 °C, pH~4,8, t~7 dias), adicionalmente contribuem para a perda da atividade enzimática.

Por último, mas não menos importante, a inibição do produto final é muitas vezes considerada como o principal fator relacionado à enzima que influencia o processo de hidrólise. A glicose inibe as  $\beta$ -glucosidases, bem como as endoglucanases e celobiohidrolases. Embora a celobiose seja um inibidor mais potente das celulasas do que a glicose (HOLTZAPPLE et al., 1990), devido a altas concentrações de glicose no meio reacional, Hodge et al. (2008) identificaram a glicose como o componente único com o maior impacto na hidrólise enzimática da palha de milho pré-tratada pelo método de ácido diluído.

O efeito da inibição por produto tem sido amplamente estudado (GUSAKOV & SINITSYN, 1992; HOLTZAPPLE et al., 1990), mas ainda é uma área de debate, pois o mecanismo de inibição real, bem como a sua magnitude, depende fortemente da fonte de enzimas, da relação enzima-substrato (GUSAKOV & SINITSYN, 1992) e da natureza do substrato (GRUNO et al., 2004). HOLTZAPPLE et al. (1990) resumiram os dados da literatura sobre a inibição da celulase, cuja maioria caracterizou a inibição como do tipo competitivo, embora existam evidências muito convincentes de enzimas que apresentam inibição não competitiva. A confusão e os desentendimentos relacionados à determinação do tipo de inibição resultam da dificuldade em realizar experiências conclusivas.

Embora diferentes pesquisadores que estudem os efeitos de um ou vários inibidores sobre a hidrólise enzimática da lignocelulose tenham chegado a conclusões diferentes, pode-se dizer que a conclusão geral é que a redução do rendimento na hidrólise enzimática de toda a biomassa lignocelulósica pré-tratada pode não ser completamente explicada pelos inibidores identificados e listados acima. Isso sugere que existem outras substâncias não identificadas em pré-hidrolisados lignocelulósicos que têm efeitos inibitórios. A lignina, por exemplo, é um grupo heterogêneo de compostos poliaromáticos onde muitos não foram identificados (HOYER et al., 2013).

Algumas estratégias podem ser aplicadas para contornar e ou minimizar os problemas de inibição, tais como, aumento da dosagem enzimática, remoção açúcares durante a hidrólise ou realizar a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (KADIC, 2017).

#### **2.3.3.3.2 Fatores relacionados ao substrato**

A taxa de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é também afetada pelas características estruturais da celulose, tais como (ANDERSEN, 2007):

1. Cristalinidade da celulose,
2. Grau de polimerização (GP), isto é, peso molecular da celulose,
3. Área de superfície disponível/acessível,
4. Organização estrutural, ou seja, macroestrutura (fibra) e microestrutura (microfibrilas elementares) e tamanho de partícula,
5. Presença de materiais associados, como hemiceluloses e lignina e,
6. Concentração elevada de substrato.

As taxas e os rendimentos da hidrólise enzimática são altamente dependentes dos fatores relacionados aos substratos. Alguns substratos lignocelulósicos apresentam maior recalcitrância durante a hidrólise enzimática do que outros (MANSFIELD et al., 1999). Isso pode estar relacionado à origem do substrato, tipo e condições de pré-tratamento e/ou o tipo de enzimas empregadas (MANSFIELD et al., 1999).

O efeito da cristalinidade do substrato demonstrou desempenhar um papel importante ao limitar a hidrólise enzimática (FAN et al., 1980, 1981), enquanto outros estudos mostraram que, quando todos os outros fatores de substrato são semelhantes, o grau de cristalinidade do substrato não tem efeito sobre a hidrólise (LYND et al., 2002; ZHANG & LYND, 2004). O

efeito do grau de polimerização está essencialmente relacionado a outras características do substrato, como a cristalinidade.

A área superficial disponível está intimamente relacionada à forma e tamanho da partícula, e, portanto, uma maior relação entre área e peso deve significar mais locais disponíveis para adsorção. A remoção de lignina e hemiceluloses pelos métodos de pré-tratamento provoca mudanças extensivas na estrutura e, portanto, na acessibilidade da celulose. A remoção destes componentes deixa a celulose mais acessível e aberta para o contato com as celulasas (ANDERSEN, 2007).

O principal papel inibitório da lignina foi atribuído à adsorção inespecífica das enzimas na lignina, impedindo, assim, sua reação com os substratos. O seu conteúdo, bem como o tipo de lignina, tem efeitos significativos sobre a hidrólise de substratos lignocelulósicos. O grau de diminuição da adsorção das enzimas na lignina depende do pré-tratamento aplicado, bem como da quantidade removida da lignina. Logo, a remoção de lignina pode facilitar a hidrólise, além de aumentar a área de superfície disponível da celulose, o que leva a uma grande melhoria na acessibilidade do substrato às diferentes enzimas e à subsequente eficiência da hidrólise (PENGILLY, 2013).

Um dos aspectos mais importantes é a concentração de substrato. Realizar hidrólise em cargas sólidas elevadas (15-20% m/v) leva a uma maior concentração de etanol e reduz os custos de energia e de recuperação do produto devido aos requisitos de destilação. No entanto, ao realizar a hidrólise com um teor maior de sólidos insolúveis (150-200 g.L<sup>-1</sup>), podem ocorrer diversos problemas relacionados ao processo, tais como os associados à eficácia das celulasas (inibição pelo açúcar, adsorção improdutivo) e à mistura enzimática. Uma desvantagem adicional do alto teor de sólidos é a capacidade reduzida das enzimas em alcançar o local das reações, isso leva à inibição do açúcar devido à dificuldade crescente para que os açúcares se difundam longe do sítio catalítico. A viscosidade, portanto, tem um grande impacto na mistura enzima-substrato e deve ser diminuída (PENGILLY, 2013).

### **2.3.4 Hidrólise enzimática com alta carga de sólidos**

A hidrólise enzimática da lignocelulose tem sido estudada como um método onde a biomassa é transformada em açúcares fermentescíveis para conversão em biocombustíveis e bioquímicos, com um foco mais recente na operação com alto teor de sólidos. Sugeriu-se que a hidrólise enzimática conduzida com elevadas concentrações de sólidos é necessária para tornar o processo de conversão do material lignocelulósico economicamente viável. Um processo é considerado "alto teor de sólidos" se a proporção de sólidos/líquidos for tal que

muito pouca ou nenhuma água livre esteja presente na pasta ou que a carga de sólidos seja de aproximadamente de 15% (m/m). A hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos oferece várias vantagens em relação a uma hidrólise com conteúdo de sólidos baixo ou moderado, sendo a principal a maior concentração de açúcar obtida no final da reação (MODENBACH; NOKES, 2013).

Em teoria, as maiores concentrações de açúcar se traduzem em maiores concentrações de etanol, o que poderia reduzir o uso de energia e os custos associados ao processo de destilação. A destilação é mais econômica quando a concentração de etanol é de pelo menos 4% (m/m). Para obter este rendimento de etanol, a carga de biomassa deve ser de aproximadamente 20% (m/m) para hidrólise enzimática. Estas estimativas apenas representam a conversão de celulose; no entanto, à medida que novas tecnologias ou a melhoria delas aperfeiçoem a conversão de hemiceluloses (hidrólise e fermentação) que funcionam em combinação com a conversão de celulose, esta estimativa inicial para carga de sólidos pode diminuir. Outra vantagem potencial é a redução de capital e os custos de produção. Equipamentos menores e / ou menos reatores podem ser utilizados para produzir uma saída equivalente (BARNERJEE et al., 2010; LARSEN et al., 2008).

#### ***2.3.4.1 Fatores que limitam a hidrólise enzimática com altas concentrações de sólidos***

A água é essencial para uma hidrólise eficaz por duas razões: transferência de massa e lubrificação das partículas de biomassa, e um dos principais desafios para a hidrólise enzimática com alta carga de sólidos é a falta de água disponível no reator. A água fornece um meio que solubiliza e auxilia na transferência de massa dos produtos. Além disso, também reduz a viscosidade da suspensão por agir como lubrificante das partículas, e diminui por consequência a taxa de cisalhamento, o que permite menor consumo de energia para a mistura. É importante ressaltar que as propriedades físicas e químicas da biomassa específica afetam o modo de como a biomassa absorve a água. À medida que as cargas de sólidos se aproximam de 20% (m/m), a fração líquida é absorvida completamente pela biomassa, o que deixa pouca água livre. Com menores quantidades de água livre, a viscosidade aparente do meio reacional aumenta e, conseqüentemente, a mistura e o manuseio de material tornam-se mais difíceis (HODGE et al., 2009; KRISTENSEN, 2009).

A quantidade de água no sistema afeta a transferência de massa, o que limita a difusão de produtos para longe da enzima. As enzimas, além de liberarem seus produtos da hidrólise, os açúcares, que são seus próprios inibidores devido ao mecanismo de “feedback” enzimático, também liberam outros compostos da biomassa que são inibitórios para os organismos da

etapa posterior de fermentação. Logo, a não remoção destes produtos por métodos de tratamento prévio podem ocasionar efeitos prejudiciais nos rendimentos de glicose. Enquanto a inibição também é vista em sistemas de hidrólise com baixa concentração de sólidos, o aumento da concentração dos inibidores ao se trabalhar com alto teor de sólidos, além da redução da taxa de transferência de massa, torna a inibição mais evidente quando a concentração de sólidos é maior (HODGE et al., 2009; HOLTZAPPLE et al., 1990).

Os fatores relacionados à hidrólise realizada com alta concentração de sólidos estão inter-relacionados, logo, uma determinada condição acaba exacerbando os efeitos negativos de outra propriedade. Por exemplo, as propriedades físico-químicas dos substratos afetam o valor de retenção de água (VRA) da biomassa. Um VRA elevado (devido ao alto teor de sólidos e às propriedades específicas do substrato) reduz a difusão dos inibidores para longe dos sítios onde ocorrem as reações enzimáticas. Além disso, tem-se o aumento da viscosidade aparente da mistura, o que dificulta a agitação, responsável por também auxiliar na difusão dos produtos (MODENBACH; NOKES, 2013). Zhang et al. (2010) descobriram que a energia necessária para agitar a mistura aumentou quando o teor de sólidos da palha de milho pré-tratada aumentou de 15% a 30% m/m (79,5 MJ/t de biomassa para 1009,2 MJ/t de biomassa, respectivamente). Na maior concentração de sólidos conseguiu atingir o objetivo de se produzir maior teor de etanol na reação, entretanto, mais da metade da energia produzida através do etanol foi consumida para agitar a mistura em comparação com os 9% da energia necessários para misturar um sistema onde se produz menor concentração de etanol. Os autores dizem que um balanço deve ser realizado para alcançar um custo de energia ótimo ao se trabalhar com concentrações elevadas de sólidos.

Sabe-se que o aumento na concentração de sólidos aumenta a concentração de produto formado na reação, mas também se reconhece que juntamente a esse aumento de sólidos ocorre uma diminuição no rendimento de glicose (esse declínio na conversão de celulose está relacionado ao tipo de substrato, pré-tratamento e carga enzimática, entre outras coisas) (ZHANG et al., 2010; KRISTENSEN, 2009). Na verdade, esse problema já é bem reconhecido e foi observado com frequência por Kristensen et al. (2009) que deram o nome ‘efeito de sólidos’ aos fenômenos que descrevem a redução na conversão quando se aumenta as cargas de sólidos. A comunidade científica ainda não chegou a um acordo sobre a causa do ‘efeito de sólidos’; no entanto, as teorias incluem entre outros os efeitos do substrato, inibição por produto, conteúdo de água e as características de adsorção das enzimas.

Outros desafios específicos na hidrólise enzimática com alto teor de sólidos incluem os longos tempos necessários para a hidrólise. A hidrólise enzimática é considerada como o

gargalo de todo o processo de conversão em termos de tempo e dinheiro, uma vez que o tempo de reação necessário para que as enzimas convertam a lignocelulose em açúcares fermentescíveis está na ordem dos dias (~ 3 dias). Os tempos de hidrólise prolongados só podem ser reduzidos pelo aumento da carga enzimática. Contudo, alguns estudos sugeriram que adicionar concentrações altas de enzimas podem sobrecarregar os sítios acessíveis de celulose, o que ocasiona uma depressão no potencial hidrolítico (BOMMARIUS et al., 2008; XU, 2007). Além disso, assim como na hidrólise a baixos teores de sólidos, o custo da enzima também é um fator limitante. A enzima é geralmente adicionada em relação à quantidade de substrato. Portanto, à medida que a concentração de sólidos aumenta a quantidade de enzima também adicionada é maior. Embora o custo das enzimas tenha diminuído drasticamente ao longo dos anos devido às intensas pesquisas que buscam desenvolver esquemas de produção mais baratos, o custo ainda está em um nível onde a etapa da hidrólise se torna um dos processos mais caros (MODENBACH; NOKES, 2013).

Cara et al. (2007) estudaram a hidrólise da poda de oliveira pré-tratada (folhas e ramos finos) variando a concentração de sólidos de 2 a 30% (m/v). As concentrações finais de glicose aumentaram com o aumento da carga de sólidos, atingindo 61 g/L e 52 g/L de glicose a 30% de sólidos para a biomassa pré-tratada pelo método hidrotérmico (BH) e pelo método de explosão à vapor (BEV), respectivamente. No entanto, as conversões para a biomassa BH diminuíram quase linearmente de 76,2% com 2% de sólidos para 49,9% com 30% de sólidos após 72 horas de reação. As conversões da biomassa pré-tratada BEV mantiveram-se entre 60% e 63% até 10% de sólidos antes de diminuir para 39,6% em 30% de sólidos. Em um estudo diferente, os pesquisadores observaram que a concentração de glicose diminuiu à medida que a concentração de sólidos aumentou acima de 10% para a palha de centeio pré-tratada com NaOH (INGRAM et al., 2011). A conversão global de celulose diminuiu de ~ 65% para 40% à medida que as concentrações de sólidos aumentaram de ~10% para 17,5%.

Modenbach et al. (2013) relata que ao pensarmos no termo "biomassa lignocelulósica" temos que lembrar que este se refere a muitos tipos diferentes de biomassa, como os subprodutos florestais e os agrícolas (biomassa lenhosa, palha, estacas), os subprodutos de fermentação e as culturas energéticas (gramíneas). Cada tipo de material lignocelulósico é diferente em relação à composição, o que resulta em problemas diferentes a serem enfrentados na etapa de hidrólise enzimática durante o processo de conversão. Os autores enumeram vários trabalhos diferentes com a finalidade de tentar melhorar os aspectos listados acima referentes à hidrólise enzimática com altas concentrações de sólidos. Nesta revisão, a

seguir, alguns trabalhos são apresentados com base em fatores que precisam ser considerados separadamente e em conjunto durante a conversão da biomassa com alto teor de sólidos.

Primeiramente é importante destacar os esquemas de alimentação por batelada alimentada como um método alternativo para se obter alto teor de sólidos na hidrólise enzimática devido a algumas das vantagens que oferece em relação ao regime de batelada única (CHANDRA et al., 2011; GAO et al., 2014a; HODGE et al., 2009; ROSGAARD et al., 2007; YANG et al., 2011). Por exemplo, a viscosidade inicial é menor, de modo que as limitações de difusão e misturas são minimizadas ou até totalmente evitadas. Um regime de alimentação pelo método de batelada alimentada permite que a biomassa seja liquefeita antes da adição de sólidos adicionais, o que mantém um nível de água livre disponível para o processo de reação e para a difusão (para longe das enzimas) dos produtos potencialmente inibitórios resultantes da reação de hidrólise. No entanto, na estratégia de batelada alimentada, é preciso considerar como e quando adicionar o substrato, bem como as enzimas, à reação, para que as taxas e a conversão sejam mantidas altas. A Tabela 2.4 ilustra uma variedade de estudos de hidrólise enzimática em batelada alimentada. Onde o termo adição enzimática refere-se a forma de alimentação da enzima, conteúdo enzimático adicionado totalmente no início da reação de hidrólise (Integral) e conteúdo enzimático adicionado proporcionalmente com o substrato alimentado (Proporcional).

Hodge et al. (2009), por exemplo, realizou um estudo de hidrólise enzimática em batelada alimentada com palha de milho pré-tratada. A concentração de sólidos insolúveis totais final foi de 15% (m/m). Uma conversão elevada de celulose (> 80% de conversão de celulose) foi relatada; no entanto, o tempo de reação foi mais que o dobro do tempo típico de uma reação de hidrólise (168h vs. 72 h). O problema do tempo prolongado pode ser superado através do uso de maiores cargas de enzimas ou enzimas que podem tolerar maiores concentrações de açúcar. O carregamento enzimático utilizado neste estudo foi de 10,7 FPU/g de celulose, uma concentração relativamente baixa, e foi adicionada proporcionalmente com cada adição de substrato. Outro estudo, conduzido por Yang et al. (2011), mostrou uma conversão de celulose semelhante (70,6%), com maior carga de sólidos (30% m/v). A carga de enzimas foi adicionada juntamente com cada alimentação de biomassa fresca e a concentração adicionada foi quase duas vezes (20 FPU / g de celulose) maior em comparação com o estudo anterior e com tempo reacional muito menor (30 h). Ambos os estudos atribuem a alta conversão, pelo menos em parte, ao fato de que os substratos foram lavados antes da hidrólise, possivelmente eliminando quaisquer potenciais produtos inibitórios resultantes da etapa anterior de pré-tratamento. Para o último estudo, a enzima fresca também pode ter

aumentado o rendimento de glicose, substituindo a enzima que pode ser ligada de forma não produtiva à lignina ou desativada por tempos de hidrólise prolongado.

**Tabela 2.4:** Esquemas de hidrólise enzimática em batelada alimentada. Adaptação (MODENBACH; NOKES, 2013).

Substrato	Pré-tratamento	Adição de substrato	Concentração total de sólidos (baseada nos sólidos insolúveis totais)	Intervalo entre as alimentações	Tempo total da hidrólise	Adição enzimática	Conversão (%)	Referencias
Bagaço de cana	NaOH	9% + 8% + 7% + 6%	30%	0, 8, 24, 48 h	144 h	Integral	51%	(ZHANG et al., 2012)
Bagaço de cana	NaOH	10% + 8% + 7%	25%	0, 12, 24 h	120 h	Proporcional	60,7%	(GAO et al., 2014a)
Bagaço de cana	NaOH	12% + 7% + 7% + 7%	33%	0, 6, 12, 24 h	120 h	Integral	59,9%	(GAO et al., 2014b)
Bagaço de cana	Hidrotérmico	10% + 5% + 5%	20%	0, 24, 48h	120 h	Proporcional	68,3%	(WANG et al., 2016)
Palha de milho	Vapor	2.5% + 2.5% + 2.5%	10%	0, 3, 6, 9 h	72 h	Integral	60%	(CHANDRA et al., 2011)
		+ 2.5%	10%	0, 24, 48, 72 h	192 h	Integral	62%	
Palha de milho	Ácido diluído	Variável-manteve 15% de sólidos insolúveis	25%	~ a cada 24 h	288 h	Proporcional	~ 80%	(HODGE et al., 2009)
Palha de trigo	NaOH	9% + 8% + 7% + 6%	30%	0, 8, 24, 48 h	144 h	Integral	35%	(ZHANG et al., 2012)
Palha de cevada	Vapor	5% + 5% + 5%	15%	0, 6, 24 h	72 h	Proporcional	64%	(ROSGAARD et al., 2007)
		10% + 5%	15%	0, 24 h		Proporcional	69%	
		5% + 5% + 5%	15%	0, 6, 24 h		Integral	65%	
Bagaço de sorgo doce	Hidrotérmico	7.5% + 3.75% + 3.75%	15%	0, 24, 48 h	120 h	Proporcional	59%	(WANG et al., 2012)
Bagaço de mandioca	Ácido diluído	10% + 7.5% + 7.5%	25%	0, 6, 12 h	72 h	Integral	74%	(MA et al., 2011)

Zhang et al. (2012) estudaram outro método de batelada alimentada para a conversão do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de trigo pré-tratados com NaOH. As biomassas foram alimentadas no reator com 9%, 8%, 7% e 6% de sólidos ao longo de 48 h para obter uma carga de sólidos final de 30% (m/v). Todas as enzimas foram adicionadas com a primeira adição de biomassa. A conversão de glicose para palha de trigo atingiu um máximo de aproximadamente 60% após a primeira alimentação, mas diminuiu com as sucessivas alimentações. A maior conversão provavelmente ocorreu devido ao baixo carregamento de sólidos e alta carga de enzimas no início da reação, e com o passar das alimentações, a proporção enzima/substrato diminuiu. Após 72 h de hidrólise, a conversão começou a nivelar, resultando em uma conversão final de glicose de 39%. Um perfil ligeiramente diferente foi notado para a conversão do bagaço. A conversão continuou a aumentar ao longo da reação de hidrólise, com exceção da última alimentação (6% de sólidos em 48 h). A alimentação final resultou em uma diminuição acentuada na conversão, mas que se recuperou após 24 h de reação, levando a um aumento na conversão. A conversão final de glicose para o bagaço de cana foi de 55%. As diferenças na forma de como o pré-tratamento afetou as biomassas lignocelulósicas podem ter levado a diferentes rendimentos de glicose entre os dois substratos. Foi relatado pelos autores que o pré-tratamento fez com que a superfície dos dois substratos tornasse-se áspera e fragmentada à medida que a lignina foi removida, permitindo um melhor acesso à celulose; no entanto, o bagaço parecia ter uma superfície mais áspera e fragmentada do que a palha de trigo (MODENBACH; NOKES, 2013).

Wang et al. (2012), ao trabalhar com bagaço de sorgo doce pré-tratado pelo método hidrotérmico, considerou o uso de hidrólise enzimática por batelada alimentada. O sistema contendo 30% (m/v) de sólidos ao final da última alimentação obteve a concentração final de açúcar de quase 115 g/L. Mesmo com o sistema de batelada alimentada, a conversão diminuiu com o aumento da carga de sólidos; no entanto, a conversão da reação de 30% de sólidos foi apenas 5% menor do que nos sistemas com 15% e 20% de sólidos (55% vs. 60%, respectivamente).

A batelada alimentada também foi testada por Ma et al. (2011) para obter uma carga de sólidos de 25% (m/v). As enzimas foram adicionadas de uma única vez no início da reação com o bagaço de mandioca pré-tratado com ácido diluído. Nessa carga de sólidos a reação por batelada atingiu uma conversão de 50%, enquanto que na reação por batelada alimentada a conversão atingiu uma porcentagem de aproximadamente 75%. Esses resultados são semelhantes aos relatados em outros estudos conduzidos na configuração de batelada alimentada (HODGE et al., 2009; YANG et al., 2011), indicando que, nas condições certas, os

sistemas com alimentações podem ser uma solução para obter maiores taxas de conversão para a hidrólise realizada com alto teor de sólidos.

Rosgaard et al. (2007) investigaram vários regimes para a hidrólise enzimática por batelada e batelada alimentada, incluindo variações no tempo de adição do substrato, bem como do substrato juntamente com a enzima fresca. A adição de enzima com cada adição de substrato manteve uma proporção constante de enzima/substrato ao longo de toda a reação, em oposição aos outros esquemas de alimentação por batelada alimentada, onde toda a enzima foi adicionada de uma única vez. Nestes casos, a proporção efetiva da enzima diminuiu subsequentemente com cada adição do substrato. Não surpreendentemente, os esquemas de alimentação por batelada que receberam a aplicação enzimática completa no início da reação produziram maiores rendimentos de glicose durante as primeiras horas, em comparação com as reações que receberam enzima fresca juntamente a cada adição de substrato. No entanto, a extensão da reação de hidrólise não foi afetada pelo método de adição das enzimas, uma vez que as concentrações finais de glicose não foram diferentes entre as estratégias de batelada alimentada (62 e 67 g/L). Além disso, a viscosidade mais baixa é muitas vezes considerada como uma vantagem para os sistemas de batelada alimentada em relação aos sistemas de batelada, porque a mistura torna-se mais fácil à medida que a viscosidade diminui. As viscosidades dos sistemas com batelada alimentada neste estudo foram menores do que nos sistemas de hidrólise por batelada única, mas não foram observados benefícios em relação à produção de glicose, pois o sistema de batelada com 15% de sólidos resultou em maior produção de glicose (78 g/L) após 72 h de hidrólise. As concentrações finais de glicose dos sistemas em batelada alimentada foram impactadas por cada adição de substrato. As taxas de hidrólise diminuíram e não se recuperaram completamente, o que resultou em menores rendimentos finais.

Adicionalmente, Chandra et al. (2011) também reportaram sobre a hidrólise por batelada alimentada com uma concentração de sólidos moderada, o que não funcionou tanto como em uma batelada de um único estágio. As concentrações de sólidos totais alcançadas para ambas às estratégias foram de 10%. Duas concentrações de celulase foram avaliadas nos experimentos (5 e 60 FPU / g de celulose) e, em ambas as cargas, a reação por batelada produziu rendimentos mais altos, aproximadamente 66% e 90%, respectivamente, para a palha de milho pré-tratado à vapor. No entanto, quando os sólidos foram alimentados a intervalos de 24 h, os respectivos rendimentos foram mais baixos (aproximadamente 55% e 80%) e as taxas de hidrólise mais lentas. Os autores sugerem que estas reduções são resultado da ligação não produtiva da enzima às frações de lignina e hemiceluloses presentes no

substrato ou ainda à incapacidade da enzima de se desligar (dessorção) do substrato parcialmente hidrolisado e encontrar novos locais de celulose acessíveis no substrato fresco. A taxa de hidrólise mais baixa observada para a maior concentração de enzimas pareceu indicar que as enzimas estavam saturando os locais acessíveis da celulose, atingindo assim uma taxa de hidrólise máxima que foi menor do que a da reação em batelada quando todos os locais de celulose estavam disponíveis ao mesmo tempo.

Outro estudo de hidrólise enzimática em batelada alimentada foi realizado por Wang et al. (2016), que utilizaram como substrato o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método hidrotérmico. Esses autores obtiveram ao final das alimentações, 20% de sólidos insolúveis totais, e após 120 horas a concentração de glicose foi de aproximadamente 91,6 g/L com conversão de 68,3%. Nesse esquema de batelada alimentada, as enzimas foram adicionadas integralmente no início, juntamente com uma concentração otimizada de Tween80, um surfactante não iônico, que melhorou o desempenho das reações de hidrólise da biomassa pré-tratada em estudos anteriores dos mesmos autores. Em outra situação, Gao et al. (2014a) e Gao et al. (2014b), também trabalhando com bagaço de cana, entretanto, pré-tratado com NaOH, obtiveram resultados semelhantes de conversão (60,7 e 59,9%, respectivamente), mesmo quando as alimentações de substrato e enzima foram divergentes entre si.

Os resultados dos esquemas de alimentação por batelada alimentada ainda não são conclusivos, conforme indicado pelos estudos anteriores, onde a conversão de celulose não necessariamente melhorou ou aumentou em relação a estudos de uma única batelada, o que torna a decisão de usar uma abordagem por alimentação não tão clara.

Outras estratégias também têm sido sugeridas para lidar com a operação em altas concentrações de sólidos, como a proposta por Xue et al. (2012), que promove a adsorção das enzimas em baixas concentrações de sólidos seguida de filtração para obter a carga de sólidos desejada. Segundo os autores, como a adsorção ocorre rapidamente, é possível obter uma distribuição uniforme das enzimas no substrato pré-tratado. Eles afirmam ter conseguido manter a mesma conversão obtida a 5% de sólidos trabalhando com 20% de sólidos. Em outro artigo, Xue et al. (2012b) propuseram um esquema de reciclo do hidrolisado como forma não só de aumentar a concentração de açúcares, mas também reciclar a parte das enzimas que desorve após a hidrólise. No esquema proposto, a hidrólise ocorre por 48h seguida de uma separação sólido/líquido, com a corrente líquida sendo usada para diluir uma nova carga de biomassa. Geng et al. (2015) compararam as duas estratégias (XUE et al., 2012a, 2012b) com uma estratégia em batelada alimentada e chegaram à conclusão que a estratégia de reciclo do

hidrolisado com algumas modificações em relação à de Xue et al. (2012b) era a mais eficiente.

A inibição por produto (glicose) é reconhecidamente um dos fatores determinantes para a diminuição da conversão com o aumento da concentração de sólidos. Yang et al. (2012) mostraram que é possível aumentar a conversão na hidrólise com 30% de sólidos se esta for realizada em 3 etapas, por 9h, 9h e 12h. Entre uma etapa e outra é realizada uma separação sólido/líquido e o sólido é ressuspenso em nova solução tampão, de forma que a glicose é separada, eliminando a inibição por produto. Embora este esquema comprove que a retirada da glicose aumenta a conversão, não resolve o problema, já que o objetivo da operação com altas concentrações de sólidos é aumentar a concentração de glicose. Neste caso a concentração de glicose vai diminuindo em cada etapa e em nenhuma delas atinge os valores esperados para 30% de sólidos.

Sendo assim, ainda pensando nos desafios para realizar a hidrólise enzimática com altas concentrações de sólidos, Kristensen et al. (2009) estudaram quatro mecanismos que possivelmente contribuíram para o “efeito de sólidos” que podem também influenciar a batelada alimentada e outras estratégias como as citadas acima, uma vez que nesses esquemas, concentrações elevadas de glicose são alcançadas sem necessariamente obter-se conversão de celulose satisfatória: (1) efeitos de composição e substrato, (2) inibição por produto, (3) concentração de água e (4) adsorção das celulasas. Estes mecanismos foram estudados com o papel de filtro, que é essencialmente um substrato de celulose pura. Os pesquisadores observaram a mesma tendência decrescente na conversão à medida que os sólidos aumentaram, muito parecido com o observado para as biomassas lignocelulósicas. Portanto, concluiu-se que a lignina, que está ausente no papel de filtro, não é o motivo principal do efeito de sólidos. O estudo do segundo mecanismo, a inibição por produto, resultou em conversões e concentrações de glicose significativamente diferentes após 48 h de hidrólise para 5% e 20% de sólidos (64,5% vs. 38,6% ou 30 g/L vs. 86 g/L, respectivamente). No entanto, as conversões finais para essas cargas de sólidos com adição de 50 g/L de glicose resultaram em conversões bastante semelhantes (29,7% e 26,3% ou 64 g/L vs. 109 g/L para 5% e 20% de sólidos, respectivamente). Este experimento não elucidou o motivo exato das conversões similares observadas, mas duas hipóteses foram tiradas. Sugeriu-se que outros componentes na hidrólise mascaram a inibição por produto ou que as enzimas sejam inibidas de forma semelhante quando uma determinada concentração de glicose é alcançada.

Kristensen et al. (2009) levantaram a hipótese de que as concentrações crescentes de glicose e celobiose inibem a adsorção de enzimas, e sugeriram também, a adsorção da

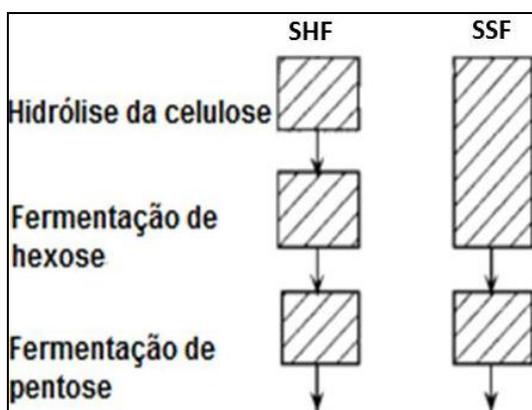
celulase como uma possível fonte para o efeito de sólidos. A adsorção de celulase no papel de filtro foi determinada medindo o teor total de nitrogênio da biomassa após 24 h de hidrólise. A quantidade de celulase adsorvida foi reduzida para metade (40% e 17%) à medida que o teor de sólidos aumentou de 5% para 25%. Ao mesmo tempo, a conversão reduziu de aproximadamente 60% para menos que 50%. Os autores observaram uma forte correlação entre a diminuição da adsorção e a conversão, indicando que a celulase não é adsorvida somente na celulose, o que causou uma diminuição no rendimento. Contudo, os autores trabalharam com uma agitação baixa (60 rpm) durante a hidrólise enzimática, o que levou a uma menor adsorção das enzimas e, conseqüentemente, uma queda na conversão. Machado et al. (2015) mostraram em seu estudo que o aumento das concentrações de sólidos até 10 % (m/v) não influenciou a cinética de adsorção se a agitação empregada nos sistemas for alta o suficiente (> 100 rpm para Avicel e > 150 rpm para bagaços pré-tratados). Logo, a adsorção não necessariamente é vista como um dos “efeitos sólidos” se a agitação empregada for suficientemente alta para o tipo e a quantidade de biomassa empregada na hidrólise enzimática.

Os conhecimentos dos mecanismos de inibição por produto para altas concentrações de sólidos e os mecanismos de inibição na adsorção das enzimas podem fornecer a chave para melhorar o processo de conversão global (MODENBACH; NOKES, 2013).

### **2.3.5 Processos de fermentação dos materiais lignocelulósicos**

A configuração clássica utilizada para fermentar hidrolisados de biomassa lignocelulósica envolve um processo sequencial onde a hidrólise da celulose e a fermentação são realizadas em unidades diferentes, sendo, portanto, 2 etapas. Esta configuração é conhecida como hidrólise e fermentação separadas (SHF). Na variante alternativa, a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF- “Simultaneous Saccharification and Fermentation”), a hidrólise e a fermentação são realizadas em uma única unidade. Na Figura 2.8, o esquema para as duas configurações é apresentado.

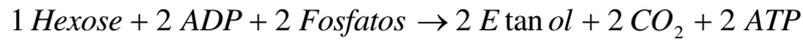
**Figura 2.8:** Estratégias de processamento da matéria-prima lignocelulósica. Cada diagrama representa um biorreator. Fonte: Adaptação de (LYND et al., 2002).



### 2.3.5.1 Metabolismo microbiano

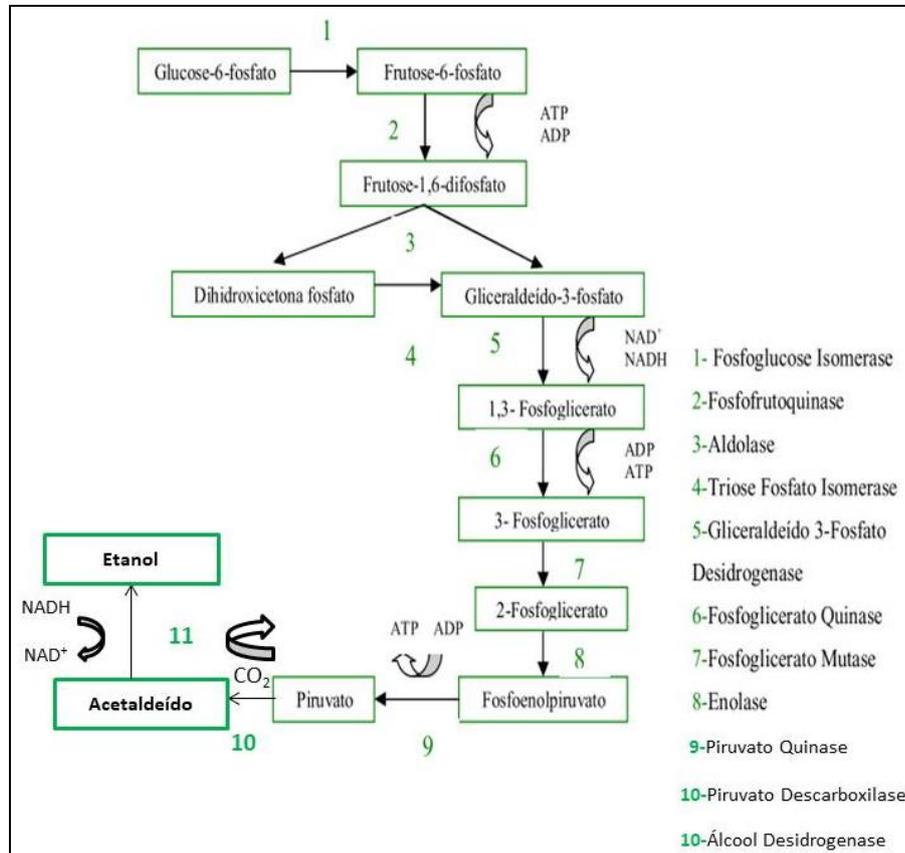
Há uma grande variedade de microrganismos, em geral bactérias ou leveduras, que são reportadas para o uso na produção do etanol sob condições anaeróbias, sendo que o metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* em tais condições é estritamente fermentativo. Durante a fermentação, são metabolizadas pelas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) D-glucose e D-frutose. Historicamente, as leveduras são os microrganismos mais comuns. A *Saccharomyces cerevisiae* pode produzir etanol em altas concentrações. Também foram reportados altos rendimentos (acima de  $0,45 \text{ g.g}^{-1}$  em condições ótimas), e tolerância elevada ao etanol (concentrações acima de  $100 \text{ g L}^{-1}$ ) (MARGEOT et al., 2009).

Na primeira etapa da fermentação alcoólica, uma vez efetuado o transporte de D-glucose ou de D-frutose na célula, ocorre a fosforilação do açúcar. As enzimas hexoquinase PI e PII são capazes de fosforilar estes açúcares, porém em razões diferentes (razão de 3:1 em favor da D-glucose), enquanto que a glucoquinase fosforila exclusivamente a D-glucose. Estas diferenças explicam o fato da D-glucose ser consumida a uma velocidade maior que a D-frutose no decorrer da fermentação (D'AMORE et al., 1989). O metabolismo dos açúcares fosforilados é baseado na transformação em piruvato através da via clássica da glicólise, como é mostrada na Figura 2.9. Em anaerobiose, o piruvato está principalmente orientado à produção de etanol para regenerar o cofator  $\text{NAD}^+$  para que possa ser consumido ao nível de gliceraldeído-3-fosfato. O piruvato é então descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, depois este é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. O balanço global da fermentação alcoólica é dado pela Equação 2-1.



### Equação 2-1

**Figura 2.9:** Via clássica da glicólise. Fonte: adaptação de Barre et al. (2000).



No entanto, a levedura pode ser inibida por uma série de compostos químicos, mesmo em condições ótimas de fermentação. Esses compostos inibitórios podem ser produtos de degradação formados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico ou formados nos processos de hidrólise catalisada por ácidos, e podem ser agrupados em três categorias (DOMÍNGUEZ, 2003):

- Derivados de furano: furfural formado a partir da degradação de pentoses e HMF (hidroximetilfurfural), formado como consequência da degradação das hexoses;
- Derivados fenólicos originados a partir da degradação da lignina;
- Ácidos alifáticos de baixa massa molar.

O furfural pode ainda se degradar a ácido fórmico ou se polimerizar. Já o HMF pode se degradar a ácido fórmico e levulínico. Além destes ácidos, o ácido acético é formado devido à hidrólise dos radicais acetil das hemiceluloses. Os efeitos negativos produzidos pelo furfural e HMF são: redução da velocidade específica de crescimento do microrganismo, da

produtividade de etanol, e do rendimento celular. Os compostos aromáticos são os mais tóxicos para os microrganismos, pois causam danos na membrana celular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Além da presença de inibidores na matéria-prima lignocelulósica, a cepa selvagem da *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar a xilose. Contudo, a obtenção do etanol por pentoses é importe, especialmente quando a xilose, principal açúcar hemicelulósico, está presente em quantidades relativamente altas. Neste caso, a fermentação da pentose reduziria o custo da produção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Nesse sentido, uma co-fermentação eficiente de glicose e xilose seria de grande interesse para o desenvolvimento do E2G (NAKANISHI et al., 2017).

Aproximadamente apenas 1% das espécies de microrganismos pode fermentar xilose a etanol (FERREIRA et al., 2011). A *Scheffersomyces stipitis* é uma levedura capaz de metabolizar D-xilose e, portanto, de grande interesse para o desenvolvimento do E2G (LEE et al., 1986). Esse microrganismo, também é capaz de metabolizar grande parte dos açúcares encontrados na biomassa lignocelulósica, tais como a glicose, manose, galactose, celobiose e oligômeros pequenos de xilana e manana (AGBOGBO FK, 2008). Outra levedura fermentadora de xilose e recentemente isolada, *Spathaspora passalidarum*, pode metabolizar a xilose mais rapidamente que a glicose e pode também, co-utilizar a glicose, xilose e celobiose como fontes de carbono ( HOU et al., 2012; NGUYEN et al., 2006). Além disso, uma vantagem adicional desta levedura em comparação com outras leveduras fermentadoras de pentose é a sua capacidade de produzir etanol sob condições estritamente anaeróbicas (HOU, 2012).

Cabe destacar que vários fatores influenciam a fermentação de pentoses por leveduras, incluindo pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, concentração inicial de xilose, concentração de inibidores, concentração celular e a suplementação dos meios de fermentação com nutrientes, entre outros (FERREIRA et al., 2011).

### **2.3.6 Hidrólise e fermentação separadas (SHF)**

Quando o processo sequencial em 2 etapas é utilizado, a fração sólida do material lignocelulósico pré-tratado é submetido à hidrólise (sacarificação). Uma vez que a hidrólise é completada, o hidrolisado resultante é fermentado e convertido em etanol. Uma das principais características do processo SHF é que cada etapa pode ser realizada sob as condições ótimas de operação. Os fatores mais importantes para a etapa de sacarificação são: tempo de reação, temperatura, pH, dosagem da enzima e a concentração de substrato. Nessa configuração de

processo, o acúmulo do produto final da hidrólise, a glicose, inibe as celulases. Logo, sob essas condições, esse processo tem melhor desempenho se realizado a baixas cargas de sólidos ( $\leq 10\%$  m/m) o que resulta em concentração menor de açúcares (10%) no hidrolisado, e subsequentemente, a concentração final de etanol é menor que 4% m/m (QUIN, 2010). Vale a pena lembrar, como discutido nos tópicos anteriores, que a baixa concentração de etanol obtida no reator resultaria em altos custos na etapa de destilação, além de requerer reatores de grandes dimensões.

### **2.3.7 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)**

Modenbach & Nokes (2013), em um artigo de revisão sobre hidrólise com altas concentrações de sólidos, sugerem em suas conclusões que se empreguem reatores ou regimes de reação que permitam a remoção da glicose do meio reacional. O regime de reação que permite a remoção da glicose é o chamado processo SSF. Neste regime o produto da hidrólise, a glicose, é continuamente consumido na fermentação.

A ideia de realizar a hidrólise enzimática e a fermentação em uma única etapa foi apresentada por Gauss et al. (1976). A inibição da hidrólise pelo produto final provavelmente é ainda a razão mais importante para usar SSF, mas há várias outras vantagens adicionais. Gauss et al. (1976) mencionaram, por exemplo, a vantagem da glicose não ser retirada/separada da fração do hidrolisado, evitando uma perda potencial desse açúcar. Além disso, a combinação da hidrólise e da fermentação em única etapa diminui o número de tanques necessários para o processamento do etanol, o que reduz os custos de investimento e manutenção (OLOFSSON et al., 2008).

Neste processo, as celulases e os microrganismos (leveduras) são adicionados na mesma unidade de processamento. Assim, a glicose formada durante a hidrólise enzimática da celulose é imediatamente consumida pelo microrganismo e convertida em etanol. O efeito de inibição provocada pelos açúcares sobre as celulases é neutralizado. Além disso, de acordo com Quin (2010), o processo de SSF ainda apresenta as seguintes vantagens em comparação com o processo de SHF: (1) aumento da taxa de hidrólise pela conversão dos açúcares que inibiriam a atividade enzimática; (2) potencial uso de menores quantidades de enzimas; (3) maiores rendimentos em produtos; (4) menor risco de contaminação, desde que a glicose seja convertida em etanol; (5) menor tempo de processamento e, (6) necessidade de reator de volume menor.

Apesar das vantagens apresentadas anteriormente, esse processo também apresenta alguns inconvenientes, como a dificuldade de reciclar as células de leveduras fermentativas,

pois estas se misturam com a biomassa e tornam o processo mais caro. A temperatura também é um problema, existem duas faixas de temperaturas ótimas, uma para a hidrólise (45-50 °C) e outra para a fermentação (28-38 °C). A levedura, *S. cerevisiae*, limita a temperatura do processo em 38 °C (ANDRADE, 2012). Nessa temperatura, as celulases têm uma perda na atividade, que por sua vez resulta em queda na taxa da hidrólise (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Esta diferença pode ser contornada com a utilização de diversas estratégias, como o uso de microrganismos termotolerantes, os quais tem a capacidade de crescer em temperaturas mais altas, ou por variações de temperatura ao longo do tempo reacional, visando encontrar valores ótimos que favoreçam as duas reações em momentos distintos do processo. Varga et al. (2004) propuseram um regime não-isotérmico para processo de SSF para palha de milho pré-tratado pelo método de oxidação úmida. No primeiro passo da SSF, pequenas quantidades de celulases foram adicionadas a 50 °C para obtenção de melhores condições de mistura. Na segunda etapa, foram adicionadas mais celulases em conjunto com a levedura *S. cerevisiae*, e a temperatura foi reduzida para 30 °C, o que favorece a fermentação.

Outro obstáculo bastante importante na SSF é a inibição do metabolismo microbiano e da atividade das celulases pelo etanol. Wu e Lee (1997) estudaram o efeito do etanol sobre a hidrólise enzimática através da taxa de hidrólise inicial. A taxa da hidrólise inicial foi determinada através da concentração de glicose na primeira hora da reação. Os autores observaram que para cada 10 g de etanol/L, a enzima celulase havia perdido 7,7% de sua atividade original a 30 °C, 9,8% a 38 °C, e 10,3% a 50 °C. Para a temperatura tipicamente usada na SSF, 38 °C, a celulase perde 9%, 36%, e 64% da sua atividade original, em concentrações de etanol de 9 g/L, 35 g/L e 60 g/L, respectivamente. Contudo, os dados publicados nesta área são conflitantes. Blotkamp et al. (1978) não relataram nenhum efeito inibitório sobre a celulase de *T. reesei* na concentração de 5% (m/v) de etanol no meio reacional. Por outro lado, Takagi et al. (1977) demonstraram que a sacarificação de 10% de celulose diminuiu em 70% a taxa reacional para concentrações de etanol até 6% (m/v). Hogan et al. (1984) mostraram que o etanol não afetou a atividade da celulase, enquanto que a da xilanase foi ligeiramente menor em concentrações mais elevadas de etanol (acima de 10% m/v). Szczodrak & Tarqopsski (1989) testaram a estabilidade de uma preparação de celulases sob a exposição ao etanol nas concentrações de 0 a 10% (m/v) na ausência de substrato celulósico. Após a exposição ao etanol as amostras foram destiladas a vácuo, e a sua eficácia determinada através da medição da atividade enzimática. Os autores mostraram que não houve efeito do etanol sobre a atividade das celulases.

Apesar das desvantagens acima, a diminuição dos custos fixos devido ao uso de um único reator para as etapas de hidrólise e fermentação e o tempo menor de conversão da celulose a etanol também tornam o processo atraente (SAHA et al., 2013) e vários trabalhos recentes têm sido publicados usando este sistema (KOPPRAM & OLSSON 2014; CUEVAS et al., 2015; WANG et al., 2015; UNREAN et al., 2016). Alguns trabalhos ainda sugerem a realização de uma etapa prévia de liquefação da biomassa e só então a inoculação do microrganismo fermentador, para minimizar o problema das diferentes temperaturas de hidrólise e fermentação. Zhou et al. (2015) chamaram este processo de Quasi-Simultaneous Saccharification and Fermentation (q-SSF), Paulová et al. (2014) de SSF com inoculação tardia (d-SSF, de "delayed SSF").

Assim, para os estudos de SSF, é importante considerar: (1) temperatura incompatível de hidrólise e fermentação; (2) tolerância das leveduras ao etanol; e (3) inibição das enzimas pelo etanol (SUN; CHENG, 2002).

## 3 CAPÍTULO 3

### EXPERIMENTOS PRELIMINARES

#### 3.1 Introdução

Um passo limitante em um processo de biorefinaria com base em enzimas é a hidrólise rápida e completa da celulose para açúcares monoméricos, que podem ser posteriormente convertidos em uma ampla gama de combustíveis, produtos químicos e até mesmo biomateriais. Para melhorar a perspectiva hidrolítica das preparações de enzimas celulase, as tentativas consideradas tradicionalmente se concentraram nas celulases, porque a celulose é o constituinte polissacarídeo mais abundante na lignocelulose. No entanto, se reconhece atualmente que é necessário alcançar uma co-hidrólise enzimática eficiente da celulose e das hemiceluloses presentes nos substratos lignocelulósicos pré-tratados, o que requer uma suplementação das celulases com algumas enzimas acessórias (SUN et al., 2015).

Por isso, esse Capítulo teve como um dos objetivos avaliar, primeiramente, o desempenho de dois coquetéis enzimáticos, Celluclast 1.5 L e Cellic CTec 2, ambos da Novozymes durante a hidrólise enzimática do bagaço hidrotérmico (BH). O primeiro é tido como mais antigo e não possui quantidade otimizada de  $\beta$ -glicosidase, responsável por evitar o acúmulo de celobiose e, portanto, a inibição severa das celuloses. Já o segundo complexo é mais novo e possui em sua fórmula diversas enzimas acessórias que melhoram e contribuem significativamente a liberação de açúcares em variados graus, dependendo do tipo de substrato e de pré-tratamento.

Os experimentos preliminares também foram realizados para averiguar a composição química das biomassas estudadas.

Neste capítulo será apresentada a metodologia, bem como os resultados dos experimentos preliminares que compõe a determinação da composição química das biomassas (bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico e bagaço submetido ao pré-tratamento ácido seguido de deslignificação com NaOH), a atividade enzimática e o teor de proteína de dois coquetéis enzimáticos, a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico na presença de dois coquetéis enzimáticos diferentes e a cinética de adsorção dos coquetéis enzimáticos nas biomassas.

## 3.2 Metodologia experimental

### 3.2.1 Matéria-prima

O substrato utilizado nos ensaios foi o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) submetido a dois tipos de pré-tratamento diferentes: hidrotérmico (BH) e ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH (BAD). Ambos os materiais pré-tratados foram fornecidos e caracterizados pela Dra. Sarita Cândida Rabelo do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

#### 3.2.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O bagaço de cana integral foi submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em um reator de liga Alloy C-276 (liga níquel-molibdênio-cromo com adição de tungstênio) com capacidade de 7,5 L, marca Parr, modelo 4554. Adicionaram-se ao reator 300 g de bagaço com 3L de água destilada mantendo a razão sólido-líquido de 1:10 (m/v). A reação ocorreu por 10 minutos a uma temperatura de 190°C. Após o tempo reacional, realizou-se o resfriamento do reator com fluxo de água e, então, o bagaço de cana seguiu para lavagem com água até pH neutro, para remoção dos resíduos de hemiceluloses e outros compostos presentes no hidrolisado. Em seguida, o material permaneceu em temperatura ambiente para secagem e foi guardado para as análises posteriores de caracterização química, hidrólises e fermentação.

#### 3.2.1.2 Pré-tratamento por ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH

Primeiro realizou-se o pré-tratamento ácido como descrito a seguir:

##### Pré-tratamento ácido:

Para o pré-tratamento ácido, 15 kg de bagaço bruto (50% m/m de teor de umidade) foram alimentados a um reator de aço leve de 350 L (Pope Scientific inc, Saukville, EUA), sem moagem ou lavagem anterior, na concentração de 10% (m/m) de sólidos. A reação foi realizada a 140 °C por percolação de fluido térmico através do revestimento do reator, durante 15 min com 0,5% (v/v) de ácido sulfúrico a 150 rpm (SANTORO *et al.*, 2015). Após a reação, o reator foi resfriado com água, despressurizado e aberto. As frações do material pré-tratado foram separadas por um filtro nutsche (Pope Scientific inc, Saukville, EUA) com 140 L de capacidade. A fração sólida, composta principalmente de celulignina, foi armazenada em um recipiente refrigerado para depois ser submetida a uma segunda etapa de pré-tratamento (deslignificação).

### Deslignificação:

A reação foi realizada no mesmo reator (Pope Scientific inc, Saukville, EUA) e com a celulignina obtida após o primeiro passo de pré-tratamento, a 130 °C por percolação de fluido térmico através do revestimento do reator, durante 30 min com 1,5% (m/v) de hidróxido de sódio a 150 rpm e 8% (m/m) de sólido (NASCIMENTO et al., 2016). Quando o tempo de reação terminou, o reator foi aberto, e a fração sólida (a seguir designada como material pré-tratado ou BAD) foi separada da fração solúvel rica em lignina (licor negro) por filtração. O material pré-tratado foi completamente lavado até atingir pH 7.

### **3.2.2 Enzimas**

Nesse capítulo foram utilizados dois coquetéis enzimáticos de celulase, Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2, ambos da Novozymes.

### **3.2.3 Determinação da atividade enzimática**

A determinação da atividade das enzimas celulasas (Celluclast 1.5L e Cellic Ctec 2 - Novozymes) utilizada no presente trabalho foi realizada conforme recomendado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (ADNEY & BAKER, 1996; GHOSE, 1987) baseado em Unidades de Filtro de Papel - “Filter-Paper Units” por mililitro da solução de enzima (FPU/mL). As metodologias para o preparo do tampão citrato de sódio pH 4,8, do reagente Ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS), e de determinação das atividades das enzimas estão descritas nos Apêndices I e II, respectivamente.

### **3.2.4 Quantificação do teor de proteína presente nos coquetéis enzimáticos**

A quantificação de proteínas foi realizada para os complexos celulolíticos Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2, ambos da Novozymes. Para determinação da concentração de proteína foi utilizado o método de Bradford (1976). Esse método baseia-se na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma-Aldrich) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve em 595 nm (ZAIA et al., 1998). O cálculo para a dosagem de proteínas foi realizado a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina da Sigma-Aldrich na faixa de 0,01-0,2 mg/mL.

A quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford foi realizada com 1 mL do reagente de Bradford mais 0,1 mL da amostra, que permaneceram incubados por 5

minutos. Após o período de incubação, realizou-se a leitura das amostras em cubetas para espectrofotômetro de 1,5 mL no espectrofotômetro 600S (Femto, Brasil) a 595 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

### 3.2.5 Cinética de adsorção da celulase nos bagaços pré-tratados

A cinética de adsorção das celulasas (Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2) nos materiais pré-tratados foi realizada em concentração de 5% (m/v) das biomassas e adicionando uma carga fixa de enzima de 15 FPU/g biomassa. A carga de sólidos foi definida baseada no trabalho de Machado et al. (2015). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e para cada ponto analisado foi utilizado um frasco. Para uma melhor visualização, os experimentos e as condições experimentais estão listadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1:** Arranjo experimental para as cinéticas de adsorção dos diferentes coquetéis enzimáticos

<b>Cinética de adsorção</b>			
<b>Substrato (5% m/v)</b>	<b>Proteína Celluclast 1.5 L (mg proteína/g substrato)</b>	<b>Proteína Cellic Ctec 2 (mg proteína/g substrato)</b>	<b>Tempo amostragem (horas)</b>
<b>BH</b>	10,59	9,68	4
<b>BAD</b>	10,59	9,68	6

Os ensaios de cinética de adsorção foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL com volume reacional de 100 mL, onde se adicionou: biomassa em base seca e tampão de citrato de sódio pH 4,8 50mM complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa. Em seguida, os frascos foram para a incubadora refrigerada MA 832 (Marconi, Brasil) a 25°C, com agitação de 150 rpm, permanecendo por 30 minutos para que a temperatura se equilibrasse, e, posteriormente, a enzima foi adicionada em cada frasco. Durante o experimento, amostras do sobrenadante foram recolhidas, centrifugadas em centrífuga NT 810 (Novatecnica, Brasil) e filtradas. Os diferentes tempos na amostragem se devem ao fato de que os experimentos foram realizados em momentos diferentes e também devido à diferença encontrada no tempo de equilíbrio ao utilizar pré-tratamentos distintos na biomassa.

Para a filtragem, utilizaram-se filtros MILLEX - HV com membrana de PVDF, 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro (Milipore). As amostras, então, foram analisadas para a quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford descrito no item 3.2.4.

### **3.2.6 Hidrólise enzimática preliminar do BH com os coquetéis Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2**

As hidrólises foram realizadas para o bagaço pré-tratado hidrotérmico (BH) em duplicata, nas condições ótimas de temperatura e pH das enzimas, com a finalidade de quantificar os açúcares liberados durante esta etapa e, então, analisar o melhor coquetel para as hidrólises posteriores. Após a secagem do bagaço resultante do pré-tratamento, a hidrólise enzimática foi realizada para cada um dos coquetéis enzimáticos, utilizando uma concentração de 20% (m/v) de sólidos com volume reacional total de 200 mL em frascos Erlenmeyers de vidro de 500 mL, selados com rolha de borracha. O pH das amostras foi ajustado para 4,8 (pH ótimo) e os Erlenmeyers foram incubados em um “shaker” (MA 832 - Marconi, Brasil) a 50°C e 150 rpm. A dosagem enzimática variou de acordo com o coquetel analisado, sendo 30 FPU/g BH de celulase para Celluclast 1.5 L e de 15 FPU/g BH de celulase para o coquetel Cellic Ctec 2.

Para avaliar a liberação em glicose, alíquotas do meio reacional da hidrólise (aproximadamente 2 mL) foram coletadas em períodos de tempo pré-determinado (12, 24, 36, 48, e 72 h), e em seguida, fervidas por 10 minutos, em tubos identificados, para inativação das enzimas e posterior análise dos carboidratos liberados por HPLC, metodologia descrita no Apêndice III.

## **3.3 Resultados e discussão**

### **3.3.1 Análise da composição química dos bagaços pré-tratados**

A composição química dos bagaços pré-tratados foi determinada pelo grupo de pesquisa da Dra. Sarita Cândida Rabelo no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE). A Tabela 3.2 detalha a composição para os bagaços BH e BAD.

**Tabela 3.2:** Composição química dos bagaços pré-tratados.

<b>Composição química</b>	<b>BH (%)</b>	<b>BAD (%)</b>
<b>Celulose</b>	61,07 ± 0,97	71,22 ± 0,19
<b>Hemiceluloses</b>	2,1 ± 0,06	2,05 ± 0,18
<b>Lignina Total (Solúvel e Insolúvel)</b>	31,97 ± 0,047	20,10 ± 0,47
<b>Cinza</b>	6,44 ± 0,056	7,55 ± 0,17
<b>Extrativos</b>	-	-
<b>Total</b>	101,58 ± 1,05	100 ± 0,28

Como esperado, cada pré-tratamento teve um efeito diferente em termos dos principais componentes estruturais da biomassa, mas, em geral, as maiores mudanças ocorreram para a celulose e lignina. A lignina foi afetada de forma diferente pelos métodos de pré-tratamento. Para os bagaços pré-tratados, observa-se que houve quase que total solubilização das hemiceluloses. O pré-tratamento hidrotérmico é caracterizado pela remoção de mais de 80% das hemiceluloses, que melhora a digestibilidade da biomassa na etapa de hidrólise enzimática, porém a solubilização de lignina é pouca ou nenhuma. Observa-se que a combinação do pré-tratamento ácido seguido da deslignificação com NaOH (BAD) foi capaz de aumentar em aproximadamente 10% a quantidade de celulose na composição do bagaço em comparação com o pré-tratamento hidrotérmico ao remover uma quantidade maior de lignina do bagaço.

Os pré-tratamentos aplicados neste trabalho deram resultados semelhantes aos apresentados na literatura. Como exemplo, no trabalho de Robl et al. (2016) o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar (BH) resultou na seguinte composição (% m/m): celulose (56,03 ± 0,26), hemiceluloses (4,59 ± 0,40), lignina (36,36 ± 0,34) e cinzas (4,24 ± 0,14). Bussamara et al. (2015) também descreveram uma composição química bem próxima do resultado obtido nesse trabalho para o BH utilizado em seu trabalho: 60,56% de celulose, 3,13% de hemiceluloses, 29,88% de lignina e 6,2% de cinzas. Guilherme et al. (2015) ao trabalharem com pré-tratamento combinado ácido e alcalino no bagaço de cana-de-açúcar obtiveram celulose (65,03 ± 2,34), hemiceluloses (10,95 ± 0,19), lignina (8,12 ± 0,31) e cinzas (4,60 ± 0,76) como composição química. Rezende et al. (2011) utilizaram a combinação de pré-tratamento ácido e alcalino com NaOH (0,5%) no bagaço de cana-de-açúcar e mostraram a seguinte composição: 68,00% de celulose, 3,30% de hemiceluloses, 23,10% de lignina e

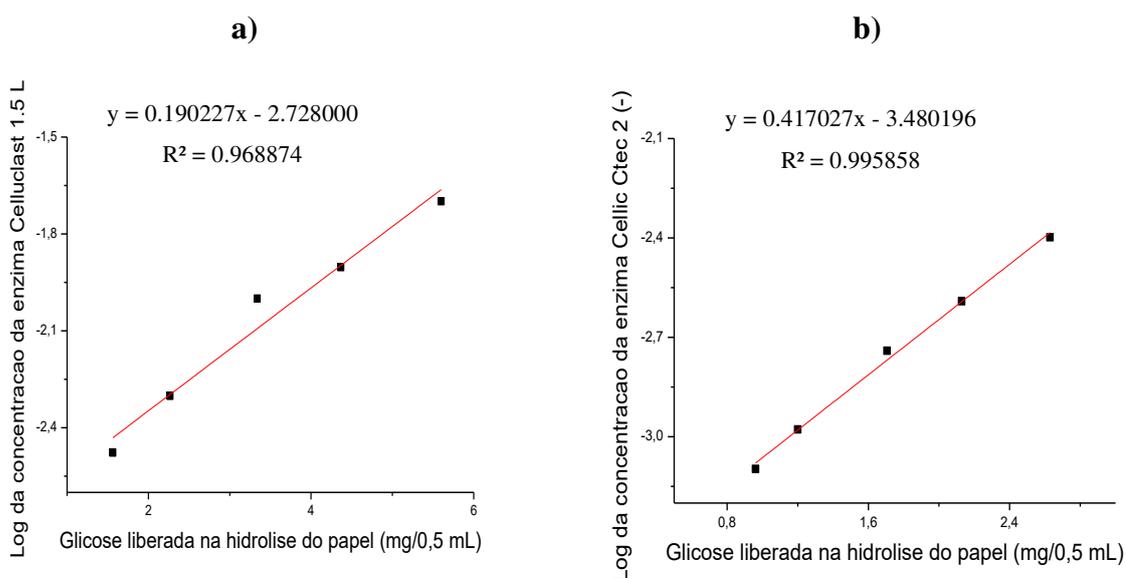
4,30% de cinzas.

Nota-se uma variação, mesmo que pequena, entre as composições listadas da literatura com as observadas deste trabalho (Tabela 3.2). Entretanto, cabe destacar que a composição química do material “*in natura*” que está relacionada às espécies da cana-de-açúcar, ao clima (temperatura, umidade), à constituição do solo, a época de colheita entre outros aspectos, varia, o que tornam as composições diferentes, além também das variações relacionadas aos pré-tratamentos, como tamanho do reator, tempo e temperatura da reação, reagentes químicos diferentes, entre outros.

### 3.3.2 Determinação da atividade enzimática das celulases comerciais

Para a determinação da atividade das celulases dos complexos Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2, partiu-se de uma solução de celulase (Celluclast 1.5 L ou Cellic Ctec 2) de diluição de 1:20, e então, 5 novas diluições foram realizadas a partir desta. Seguindo a metodologia disposta no Apêndice II efetuou-se a hidrólise do papel de filtro e a sequente quantificação de glicose liberada. A Figura 3.1 (a e b) exibe a correlação dos dados obtidos na determinação da atividade enzimática para as celulases dos diferentes coquetéis comerciais.

**Figura 3.1:** Comportamento da enzima celulase a) Celluclast 1.5 L, b) Cellic Ctec 2. Logaritmo da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de 0,5 mL de enzima diluída.



Como descrito por Ghose et al. (1987), a atividade enzimática da celulase em FPU é calculada com base na concentração enzimática necessária para liberar 2 mg de glicose.

Sendo assim, com a Equação 10-1 e Equação 10-2 exibidas no Apêndice II e com as equações da reta obtidas pelos gráficos na Figura 3.1(a e b), foi possível determinar as atividades enzimáticas dos coquetéis Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2, como segue na

Tabela 3.3:

**Tabela 3.3:** Cálculo da atividade enzimática em FPU para as celulasas dos complexos enzimáticos Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec2.

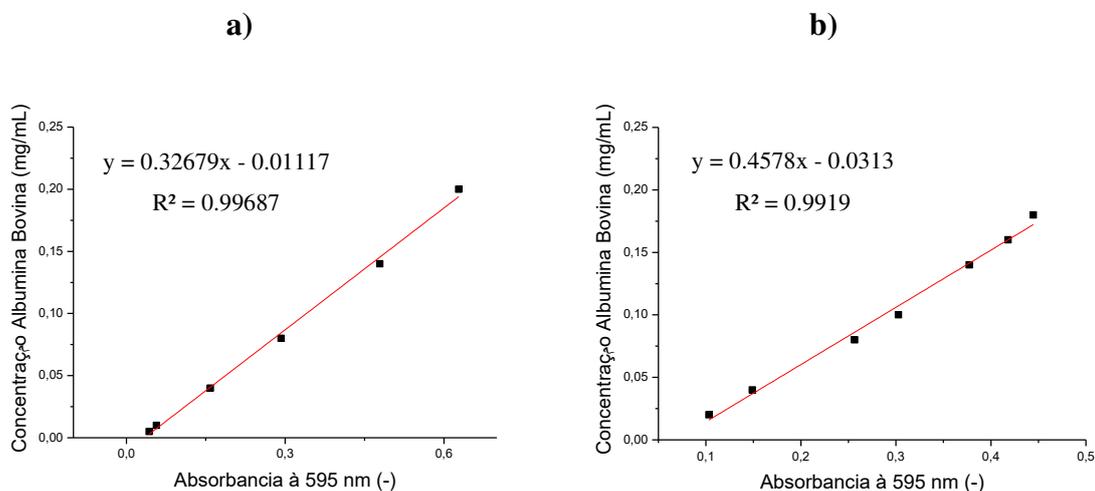
Cálculo atividade Celluclast 1.5 L	Cálculo atividade Cellic Ctec 2
$\log [enzima] = 2,372$	$\log [enzima] = 2,646$
$[enzima] = 4,244 \times 10^{-3} \text{ v/v}$	$[enzima] = 2,258 \times 10^{-3} \text{ v/v}$
$FPU / mL = \frac{0,37}{[enzima \text{ diluída}]} =$	$FPU / mL = \frac{0,37}{[enzima \text{ diluída}]} =$
$\frac{0,37}{4,244 \times 10^{-3}} = 87,17 \text{ FPU / mL}$	$\frac{0,37}{2,258 \times 10^{-3}} = 163,81 \text{ FPU / mL}$

Assim, os valores obtidos para as atividades em FPU/mL das enzimas celulasas Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2 foram de 87,17 e 163,81, respectivamente. Esses valores foram utilizados para encontrar os volumes necessários de cada coquetel para as hidrólises enzimáticas realizadas ao longo do trabalho. É importante destacar que esses ensaios foram repetidos a cada 3 meses para garantir as quantidades das enzimas adicionadas aos experimentos das reações de hidrólise enzimática com um valor preciso FPU/ g de bagaço.

### 3.3.3 Determinação da concentração de proteína presente nos coquetéis enzimáticos

A dosagem de proteínas para as enzimas foi realizada com o intuito de se saber o teor proteico presente em cada coquetel (Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2) que, posteriormente, foi correlacionado com a quantidade de proteína utilizada nos ensaios de cinética de adsorção das enzimas do complexo celulolítico. As curvas de calibração estão apresentadas na Figura 3.2 (a e b). Pode-se observar que as correlações entre absorbância a 595nm e concentração de albumina bovina se mostraram lineares para concentrações de albumina variando entre 0,01 e 0,2 mg/mL em ambos os casos.

**Figura 3.2:** Curvas elaboradas para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, a) curva padrão para Celluclast 1.5 L e, b) curva padrão para Cellic CTec 2. Os gráficos correlacionam a concentração de proteínas com a absorbância a 595 nm.



Com as equações da reta obtidas a partir de cada um dos gráficos (Figura 3.2 a e b), foi possível realizar os cálculos para a quantificação de proteínas. As absorbâncias alcançadas a 595nm para cada solução enzimática previamente diluída foi substituída nas devidas equações. O teor proteico para a Celluclast e para a Cellic CTec 2 foi de  $44,25 \pm 1,70$  mg/mL e  $105 \pm 6,08$  mg/mL, respectivamente. Igualmente ao das atividades enzimáticas, a dosagem de proteínas para as enzimas celulase (Celluclast 1,5 L e Cellic CTec 2 - Novozymes) foram realizadas a cada 3 meses para garantir o teor proteico das mesmas.

### 3.3.4 Cinética de adsorção das enzimas Celluclast 1.5 L e Cellic CTec 2 nos bagaços pré-tratados BH e BAD

Sabe-se que a estrutura das celulasas é adaptada para adsorver nos substratos lignocelulósicos e que a hidrólise da celulose começa com a adsorção das enzimas nas moléculas de celulose. Logo, a adsorção / dessorção de enzimas é uma das principais propriedades que afetam a taxa de hidrólise (CONVERSE et al., 1988).

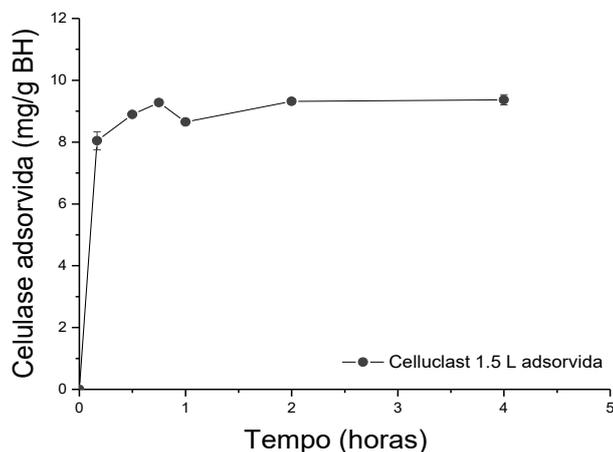
A cinética de adsorção das enzimas (Celluclast e Cellic CTec 2) foi determinada para os bagaços, BH e BAD, e tal avaliação buscou observar o tempo em que a adsorção se estabilizou, assim como a máxima quantidade de proteína que foi adsorvida neste tempo determinado. Com isso, também foi possível verificar a quantidade de enzima perdida no

sobrenadante e então, os dados obtidos foram aplicados posteriormente, como apoio no desenvolvimento dos demais experimentos realizados nesse trabalho.

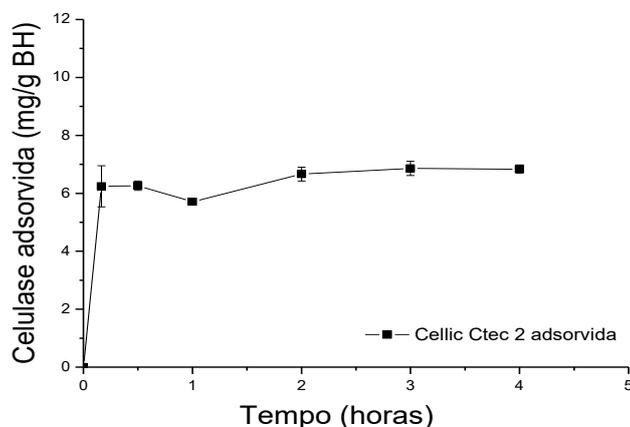
Para esses ensaios de adsorção seguiram-se os passos da metodologia que está descrita no item 3.2.5. Para isso, foram adicionados aos Erlenmeyers, tampão citrato 0,05 M pH 4,8 complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa juntamente com a biomassa (BH ou BAD) na concentração de 5% de sólidos (m/v). A enzima (Celluclast ou Cellic CTec 2) foi adicionada no meio reacional na carga de 15 FPU/g biomassa. A agitação foi de 150 rpm e a temperatura da reação foi de 25°C, temperatura ambiente, que evita uma possível hidrólise do material, conforme dados obtidos anteriormente (MACHADO et al, 2015). As cinéticas de adsorção das enzimas celulases (Celluclast 1.5 L e Cellic CTec 2) estão dispostas na Figura 3.3 (a e b) e na Figura 3.4 (a e b) para os bagaços BH e BAD, respectivamente.

**Figura 3.3:** Cinética de adsorção da Celluclast 1.5 L no BH com adição de 10,59 mg de proteína/g de bagaço (a) e cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BH com adição de 9,68 mg de proteína/ g de bagaço (b), a 25 °C, pH 4,8 e agitação 150 rpm, concentração inicial de bagaço 5 % m/v, carga enzimática correspondente de celulase de 15 FPU/g de bagaço.

a)



b)

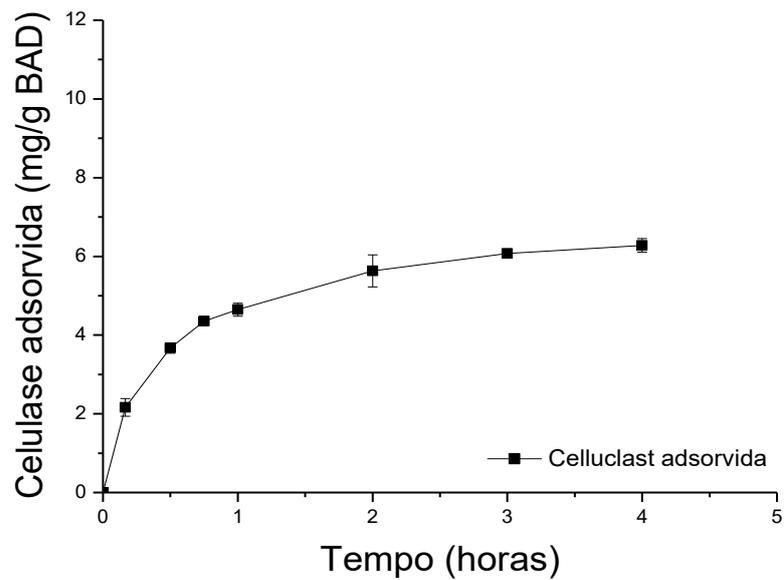


Pode-se dizer que a adsorção do coquetel enzimático Celluclast no BH (Figura 3.3 a) foi praticamente completa, sendo aproximadamente 90% do total mássico de enzima adicionado na solução adsorvida, dos 10,49 mg proteína/g de BH adicionado, 9,31 mg proteína/g de BH  $\pm$  0,009 foi adsorvido quando se atingiu o equilíbrio da adsorção (2 horas).

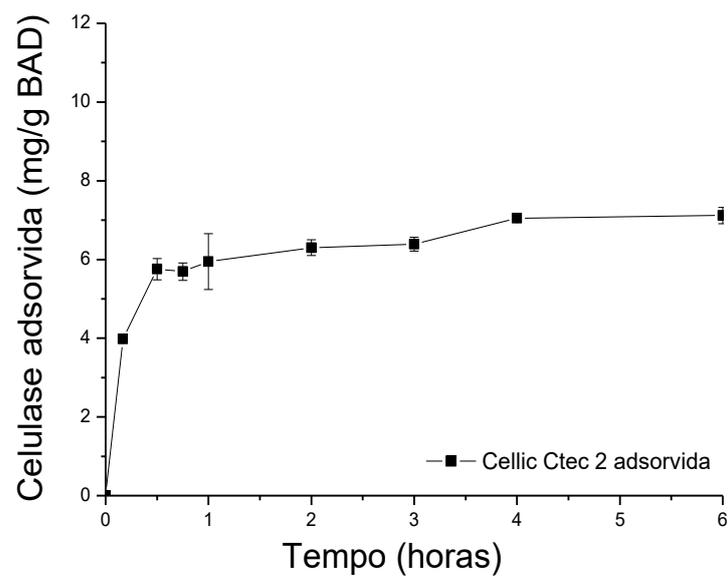
Quando o coquetel Cellic Ctec 2 (Figura 3.3 b) foi usado, a adsorção atingiu o equilíbrio também em 2 horas após o início da reação, com adsorção máxima de 6,66 mg proteína/g BH  $\pm$  0,24 quando 9,69 mg proteína/g de BH foram adicionados no meio reacional. Nesse caso, somente 68 % da massa de enzima adicionada foi adsorvida no bagaço após o tempo de equilíbrio ser atingido. Isso provavelmente se deve ao fato de que na Cellic Ctec 2 existem outras enzimas acessórias além da celulase, como por exemplo, as  $\beta$ -glicosidases, que atuam em solução e não adsorvidas (SUN et al., 2015). No caso da Celluclast, embora também haja atividade de  $\beta$ -glicosidase, esta é muito baixa e é aconselhável sempre adicionar  $\beta$ -glicosidase de outras fontes como complemento.

**Figura 3.4:** Cinética de adsorção da Celluclast 1.5 L no BAD com adição de 9,60 mg de proteína/ g de bagaço (a) e cinética de adsorção da Cellic CTec 2 no BAD com adição de 9,68 mg de proteína/ g de bagaço (b). Nas duas figuras as condições foram: 25 °C, pH 4,8 e agitação 150 rpm, concentração inicial de bagaço 5 % m/v, carga enzimática correspondente de celulase de 15 FPU/g de bagaço.

a)



b)



Para o bagaço BAD (Figura 3.4 a e b) tem-se que o equilíbrio da adsorção para Celluclast foi também atingido em aproximadamente 2 horas, enquanto que para Cellic CTec

2, o equilíbrio foi atingido somente em 4 horas de reação. Observa-se que a taxa de adsorção é mais rápida no início da reação, ficando mais lenta até praticamente não mudar a quantidade de celulase adsorvida quando se atinge o equilíbrio da adsorção.

A adsorção máxima da Celluclast 1.5 L no BAD (Figura 3.4 a) foi na faixa de  $6,28 \pm 0,17$  mg/g de bagaço (cerca de 2 h depois do início da reação), aproximadamente 65,42 % do total mássico enzimático adicionado no meio reacional foi adsorvido. Enquanto que para Cellic Ctec (Figura 3.4 b), o valor máximo de celulase adsorvida é na faixa de  $7,08 \pm 0,15$  mg proteína/g de bagaço, cerca de 73 % da massa enzimática inicial adicionada foi adsorvida pelo BAD após 4 horas de reação. Neste cenário é observado que para os dois coquetéis da Novozymes, a Celluclast 1.5 L e a Cellic CTec 2, grande quantidade de enzima fica livre no sobrenadante. No caso da Celluclast 1.5L a quantidade de enzima livre é maior em comparação com a cinética de adsorção da Celluclast 1.5 L no BH, o que sugere que boa parte das enzimas adsorvidas no BH devem estar adsorvidas improdutivamente à lignina.

Nota-se que nas cinéticas de adsorção usando o coquetel Cellic Ctec 2 para o BH, a quantidade de enzima adsorvida foi menor (até 22 % menor) em comparação ao coquetel Celluclast. Por isto, cabe destacar que as diferenças encontradas nos perfis cinéticos de adsorção (Figura 3.3 e Figura 3.4), são reflexos das diversidades entre os coquetéis enzimáticos (presença e conteúdo de outras enzimas) bem como a diferença na composição dos bagaços, como analisado anteriormente (item 3.3.1). Entretanto, nem toda enzima é adsorvida na celulose e quando isso acontece, a adsorção é denominada de adsorção não específica da celulase, por exemplo, as enzimas são adsorvidas na lignina, o que pode ter um importante papel limitante na hidrólise (KUMAR; WYMAN, 2008, 2009), já que, em vez da celulose, as enzimas celulolíticas são adsorvidas na lignina, o que reduz as enzimas disponíveis para a hidrólise da celulose. Além disso, uma série de outras propriedades do substrato lignocelulósico, como por exemplo, cristalinidade, área superficial acessível, tamanho de partícula e conteúdos de lignina e hemiceluloses estão envolvidas na adsorção / dessorção da celulase.

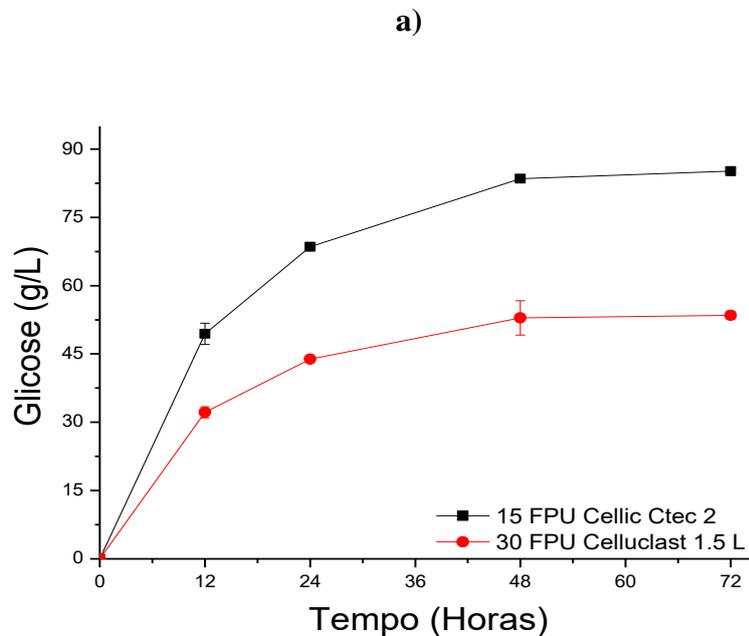
### **3.3.5 Hidrólise enzimática preliminar do BH com os coquetéis Celluclast 1.5 L e Cellic Ctec 2**

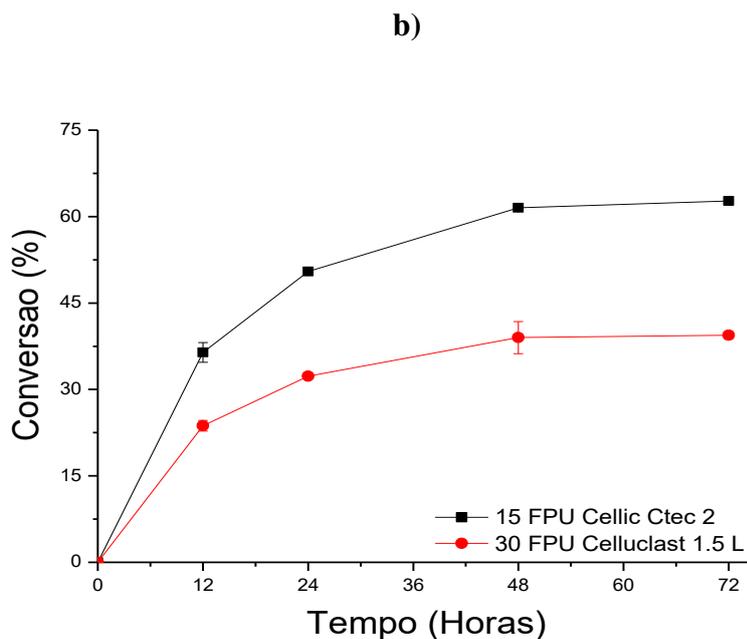
Os coquetéis enzimáticos, Celluclast 1.5 L e Cellic CTec 2, ambos da Novozymes, foram testados com a finalidade de avaliar o desempenho durante a hidrólise enzimática com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BH). Para isso, foram realizados experimentos de hidrólise enzimática conforme metodologia descrita no item 3.2.6. O bagaço usado foi o BH e

a concentração de sólidos foi de 20% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mMol/L, pH 4,8. Os frascos com os substratos e o tampão foram pré-incubados a 50 °C em “shaker”. A dosagem enzimática variou de acordo com o coquetel analisado, sendo 30 FPU/g BH de celulase para Celluclast 1.5 L e de 15 FPU/g BH de celulase para o coquetel Cellic Ctec 2. A maior concentração em FPU/g de bagaço ao se usar a Celluclast se deu devido à falta de suplementação extra de  $\beta$ -glicosidase, por se tratar de um coquetel mais antigo.

Nos dados apresentados a seguir (Figura 3.5), tem-se a diferença da produção de glicose e da conversão de celulose em glicose para o processo de hidrólise enzimática entre os diferentes coquetéis enzimáticos utilizados.

**Figura 3.5:** Formação de glicose e conversão da celulose do BH para Celluclast 1.5 L e Cellic CTec 2. a) Cinética da hidrólise enzimática e b) conversão da celulose.





A Figura 3.5 (a e b) mostra a concentração de glicose durante a hidrólise enzimática e a conversão de celulose em glicose para os dois coquetéis enzimáticos estudados, respectivamente. Observa-se que o desempenho dos coquetéis difere em relação ao perfil de liberação da glicose. Essa afirmação também pode ser confirmada com o gráfico da Figura 3.5 b, que mostra a conversão da celulose em glicose para as duas condições. A enzima Cellic CTec 2 apresentou melhor desempenho, onde a concentração máxima de glicose alcançada foi de  $85,13 \text{ g/L} \pm 0,96$  em comparação a  $53,49 \text{ g/L} \pm 0,87$  quando se usou a enzima Celluclast 1.5 L, mesmo quando a quantidade desta enzima foi a metade da quantidade de Celluclast 1.5L. As conversões foram de  $39,42 \pm 0,64\%$  e  $62,73 \pm 0,71\%$  para Celluclast e CTec 2, nessa ordem. Ramos et al. (2015), em seu trabalho usando bagaço pré-tratado com explosão a vapor, mostrou que a concentração máxima de glicose alcançada usando 20% m/v de sólidos ao final de 96 h de hidrólise enzimática (24 horas a mais em comparação com este estudo) com a enzima Cellic CTec 2 foi de  $76,8 \text{ g/L}$ .

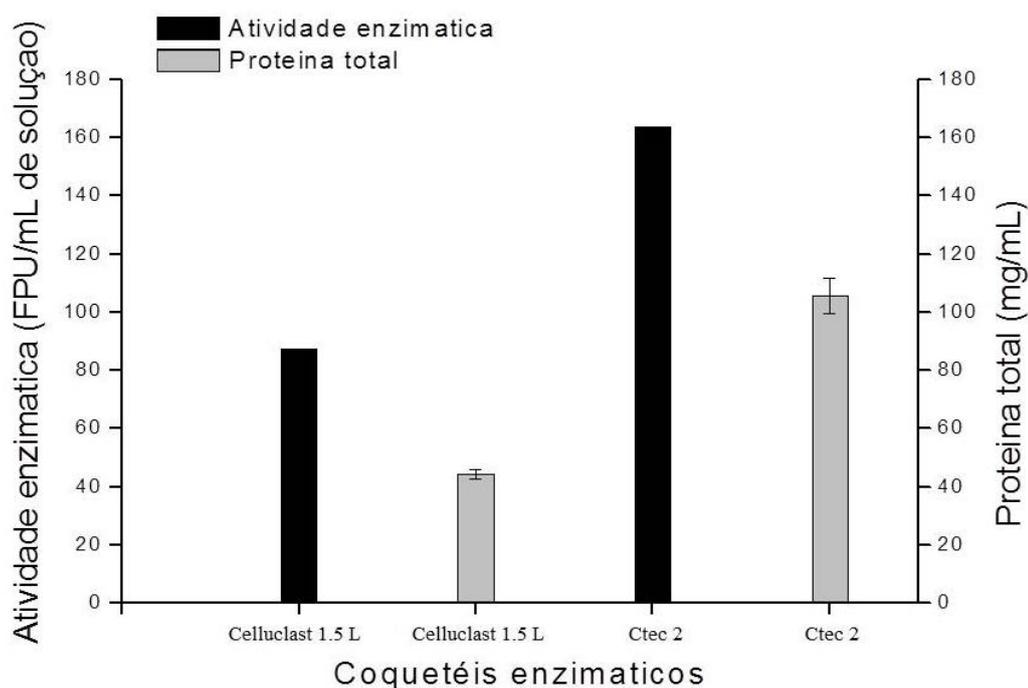
de Oliveira Moutta et al. (2013) estudaram a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmico a 5% (m/v) com as enzimas Celluclast 1.5 L e  $\beta$ -glicosidase nas concentrações de 10 FPU/g de biomassa e 30 CBU/g de biomassa, respectivamente. O resultado encontrado em g/L de glicose após 72 horas de reação foi de 17,2 com 68,2% de conversão de celulose em glicose.

Nesse trabalho, o resultado indicou que a preparação de celulase mais antiga, Celluclast 1.5 L, tem uma eficácia hidrolítica menor do que os novos produtos como a Cellic CTec 2. Mesmo dobrando a concentração de FPU para a Celluclast 1.5 L, pois não houve

suplementação da enzima  $\beta$ -glicosidase, a quantidade de glicose obtida foi relativamente baixa, ocasionando menor conversão da celulose em glicose (39 %). Isso pode ter ocorrido devido à falta de suplementação extra da enzima  $\beta$ -glicosidase, principal responsável pela hidrólise da celobiose em glicose e também pela consequente inibição das enzimas pelo produto.

A Figura 3.6 evidencia que, como esperado, essas preparações enzimáticas apresentaram diferenças consideráveis no teor de FPU e na concentração de proteína total. A atividade da Cellic CTec 2 foi de 163 FPU por mL de enzima, que é quase duas vezes o valor encontrado para a Celluclast (87,17 FPU/mL). Enquanto isso, o teor de proteína para a Cellic CTec 2 e para Celluclast foi de  $105 \pm 6,08$  mg/mL e  $44,25 \pm 1,70$  mg/mL, como segue.

**Figura 3.6:** Comparação da atividade enzimática e do teor de proteína para os diferentes coquetéis enzimáticos.



### 3.4 Conclusões

Após a análise dos dados obtidos dos experimentos preliminares, decidiu-se utilizar o coquetel enzimático Cellic CTec 2 nos demais experimentos, levando em consideração, quando necessário, o tempo de equilíbrio da adsorção de ambos os coquetéis nos bagaços estudados. As cinéticas de adsorção para a Cellic CTec 2 nos bagaços a 25 °C foram bastante distintas, para o BH o equilíbrio da adsorção se deu em 2 horas após o início da reação com 68% de adsorção das enzimas na biomassa, enquanto que para o BAD o tempo de equilíbrio

da adsorção se deu em 4 horas com aproximadamente 73% de adsorção do total mássico enzimático adicionado no início da reação.

Esse Capítulo, como principal objetivo, mostrou as diferenças das composições químicas entre os bagaços após os pré-tratamentos aplicados, destacando também, as divergências dos coquetéis comerciais durante a hidrólise enzimática e a adsorção.

O pré-tratamento ácido seguido de deslignificação mostrou os melhores resultados em termos de concentração de celulose e solubilização de lignina.

Em relação aos coquetéis enzimáticos estudados, o coquetel Cellic CTec 2 mostrou-se melhor em termos de atividade enzimática e eficiência hidrolítica quando comparado com a Celluclast 1.5 L.

## 4 CAPÍTULO 4

# VARIAÇÃO NA CARGA DE SÓLIDOS - EFEITOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

### 4.1 Introdução

Para desenvolver um processo economicamente viável é de suma importância que a hidrólise enzimática seja realizada com elevadas concentrações de sólidos. Entretanto, com o aumento da viscosidade no meio reacional surgem problemas relacionados à mistura deficiente do material, tal como uma má distribuição das enzimas e até mesmo dificuldade em controlar a temperatura e o pH da reação, o que resulta em uma redução da conversão dos carboidratos (GENG et al., 2015).

Logo, no Capítulo 4, as condições da hidrólise enzimática em função da carga de sólidos considerando dois tipos de pré-tratamentos (um que deslignifica e um que não deslignifica) foram avaliadas, com os objetivos de se observar os efeitos do aumento da carga de sólidos durante a hidrólise enzimática em dois diferentes tipos de biomassa e ter uma base de comparação com os demais resultados que serão apresentados posteriormente referentes às estratégias para altas concentrações de sólidos. Também serão obtidos dados de hidrólise por longos períodos de tempo (144 horas) para avaliar se é possível aumentar a conversão em tempos muito altos.

### 4.2 Metodologia experimental

A partir desse capítulo a maioria dos ensaios de hidrólise enzimática para os bagaços pré-tratados foram realizados utilizando o complexo enzimático Cellic CTec 2 (Novozymes), que, como demonstrado anteriormente (item 3.3.5), foi a melhor celulase comercial em termos de liberação de glicose (g/L) e em conversão de celulose (%) para o BH. Quando o complexo Celluclast for usado o mesmo será descrito previamente.

#### 4.2.1 Hidrólise enzimática em batelada

Os ensaios para hidrólise enzimática foram realizados em modo batelada. A hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados foi realizada em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 150 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa. A carga de sólidos para as hidrólises em batelada variou entre 1% a 20 % (m/v) de bagaço hidrotérmico (BH) ou de bagaço ácido diluído seguido de deslignificação com

NaOH (BAD). A carga enzimática de celulase foi de 15 FPU/g de BH ou BAD. Os frascos foram incubados em agitador orbital, mantidos a 150 rpm e 50 °C. As enzimas foram adicionadas após 30 minutos de incubação. Amostras foram coletadas do meio reacional em tempos pré-determinados por até 144 horas para a determinação do perfil de hidrólise, e os açúcares liberados foram quantificados por HPLC. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 4.3 Resultados e discussão

### 4.3.1 Hidrólise enzimática em batelada

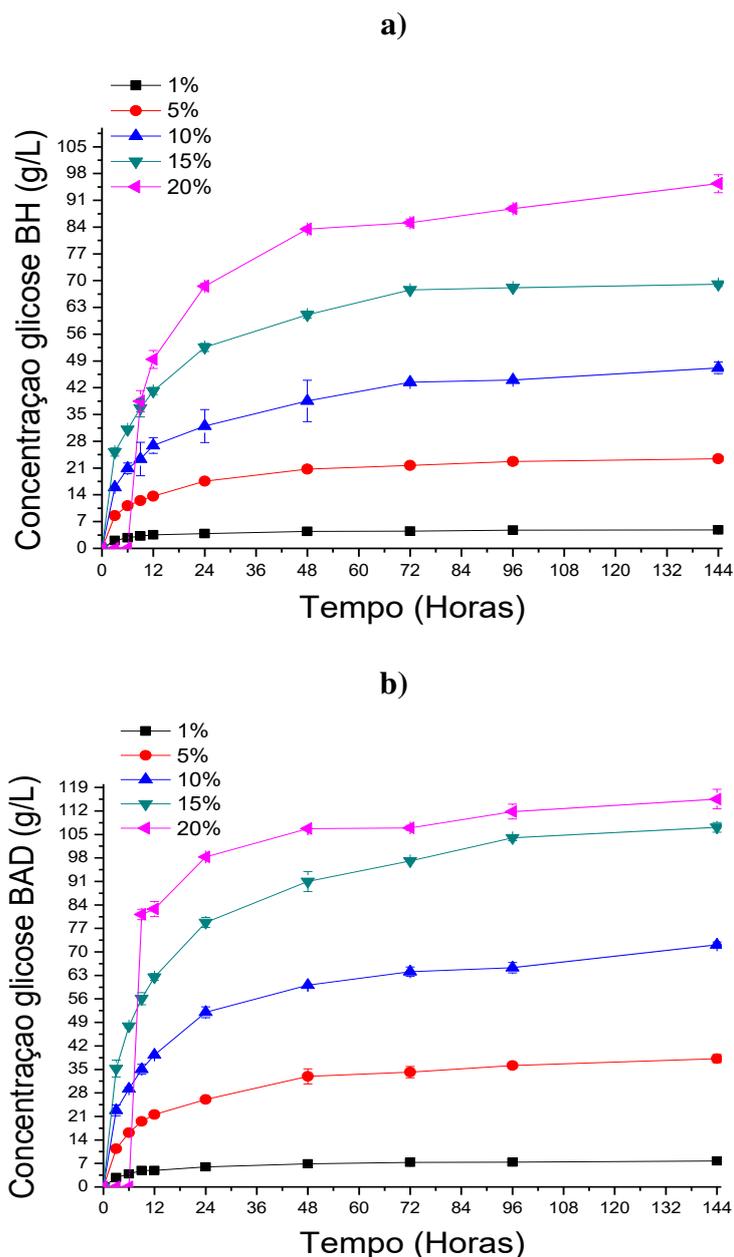
As hidrólises enzimáticas em batelada foram realizadas conforme descrito no item 4.2.1 para cinco concentrações de sólidos, 1, 5, 10, 15 e 20 % (m/v). Essas concentrações foram escolhidas para avaliar o perfil da liberação de glicose no meio reacional, bem como a conversão dos açúcares, a fim de se analisar o efeito do conteúdo de sólidos iniciais na sacarificação. Os bagaços pré-tratados BH e BAD foram hidrolisados nas mesmas condições reacionais por até 144 horas.

A Figura 4.1 (a e b) exibe os perfis de hidrólise enzimática para os bagaços pré-tratados BH e BAD, nessa ordem. E como esperado, o BH (Figura 4.1a) em comparação com o bagaço BAD (Figura 4.1 b) resultou na menor digestibilidade da celulose e, conseqüentemente, na menor concentração de glicose liberada, tanto para a menor concentração de sólidos (1%) quanto para a maior (20%) (m/v). Isso acontece não só devido ao menor teor de celulose disponível no bagaço BH, mas também devido à maior quantidade de lignina, que adsorve improdutivamente as enzimas, além de dificultar o acesso destas à celulose. Em um estudo realizado, Driemeieer et al. (2016), relatou-se que biomassas submetidas a pré-tratamentos que promovem a deslignificação (alcalinos) apresentam poros maiores em sua superfície (> 10nm), além de não ocorrer problemas como a co-cristalização da celulose e agregação de lignina. Já os pré-tratamentos conhecidos por não remover a lignina (ácido diluído, hidrotérmico e explosão a vapor) provocam agregação da lignina e da celulose, além da co-cristalização, o que provoca uma coesão nonoescalar dos poros tornando-os menores (< 4nm) em comparação aos observados em biomassas deslignificadas. Esses dados corroboram com a menor digestibilidade enzimática mostrada pelo bagaço BH.

Após 24 horas de reação o teor de glicose para os bagaços BH e BAD na menor concentração de sólidos (1% m/v) foi de  $3,88 \pm 0,12$  g/L e de  $5,99 \pm 0,41$  g/L, respectivamente. Para 5% de sólidos (m/v), a máxima concentração de glicose liberada foi de

$17,56 \pm 0,13$  g/L para BH e de  $26,02 \pm 0,18$  g/L para BAD. Nota-se que o BAD sempre apresenta a maior concentração em glicose, onde a diferença para 5% de sólidos é de aproximadamente 8,5 g/L de glicose a mais. No Apêndice V, Tabela 10.5 e 10.6 encontram-se valores para celobiose (g/L), respectivamente.

**Figura 4.1:** Perfis de glicose durante a hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados a) BH e b) BAD. Concentração de sólidos: 1, 5, 10, 15 e 20 % (m/v).



Quando a hidrólise foi realizada com concentração elevada de sólidos (20% de sólidos (m/v)), o teor de glicose aumentou significativamente quando comparado a uma hidrólise enzimática a 5 % m/v, passando de  $17,56 \pm 0,13$  g/L para  $68,52 \pm 0,87$  g/L para BH. Já para BAD, esta passou de  $26,02 \pm 0,18$  g/L para  $98,33 \pm 0,20$  g/L. Logo, os perfis de hidrólise

(Figura 4.1 a e b) evidenciam que quando se aumenta o conteúdo inicial de sólidos na reação, consequentemente a concentração de açúcares, como a glicose, também aumentam na solução.

Martins et al. (2015) também reportaram essa diferença na concentração de glicose obtida quando utilizaram bagaços lignificados e deslignificados na hidrólise enzimática.

de Oliveira Moutta et al. (2013) ao usarem bagaço pré-tratado pelo método hidrotérmico na hidrólise enzimática a 5 % de sólidos (m/v) com outro coquetel enzimático (Celluclast 1.5 L e Novozyme 188  $\beta$ -glicosidase) alcançaram uma quantidade de glicose de 13,5 g/L após 24 h, sendo, portanto 76,78 % da alcançada nesse trabalho ( $17,56 \pm 0,13$  g/L).

Quando analisamos os resultados obtidos para maiores tempos reacionais, como 72 horas e 144 horas, observam-se (Figura 4.1 a e b) quantidades relativamente altas de glicose para ambos os bagaços (BH e BAD), onde, por exemplo, em 144 horas, a glicose chegou em  $95,36 \pm 2,33$  g/L para o BH e  $115,53 \pm 2,92$  g/L para o BAD, evidenciando mais uma vez o efeito do tempo sob a concentração de açúcares produzidos durante o curso da reação hidrolítica. Entretanto, para ambos os bagaços pode-se observar que as taxas da hidrólise são maiores no início (até 24 horas), e então, gradualmente, elas se tornam mais lentas e menores conforme o passar do tempo reacional. Para ambas as biomassas (BH e BAD) aproximadamente 70% do total de glicose foi produzido nas primeiras 24 horas. Yang et al. (2010) relataram em seu estudo o mesmo perfil, onde no início da sacarificação a taxa de hidrólise era bem maior e durante as primeiras 12 horas cerca de 70 % do total de açúcares redutores já haviam sido produzidos. Os autores ainda explicam que isso deve ocorrer porque, no início da hidrólise enzimática, os locais acessíveis à enzima do substrato são suficientes e enquanto a hidrólise prossegue, os locais acessíveis diminuem significativamente e a taxa de hidrólise diminui nas demais 48 h.

Wang et al. (2012) pré-trataram hidrotérmicamente bagaço de sorgo doce e realizaram a hidrólise enzimática da biomassa para 20% de sólidos (m/v) com carga enzimática de celulase a 20 FPU/g de celulose e obtiveram como resultado aproximadamente 50 g/L de glicose após 96 horas de reação.

Wang et al. (2016) apresentaram em seu estudo um valor, também, inferior de glicose liberada na hidrólise enzimática e nesse caso com a mesma biomassa, o bagaço de cana-de-açúcar hidrotérmico, a 20 % de sólidos (m/v). Os autores reportaram uma concentração em glicose de aproximadamente 63 g/L em 96 horas reacionais, enquanto que para esse estudo a concentração obtida no mesmo tempo reacional foi de aproximadamente 87 g/L de glicose. Essa diferença encontrada nos resultados da literatura com os obtidos aqui pode estar

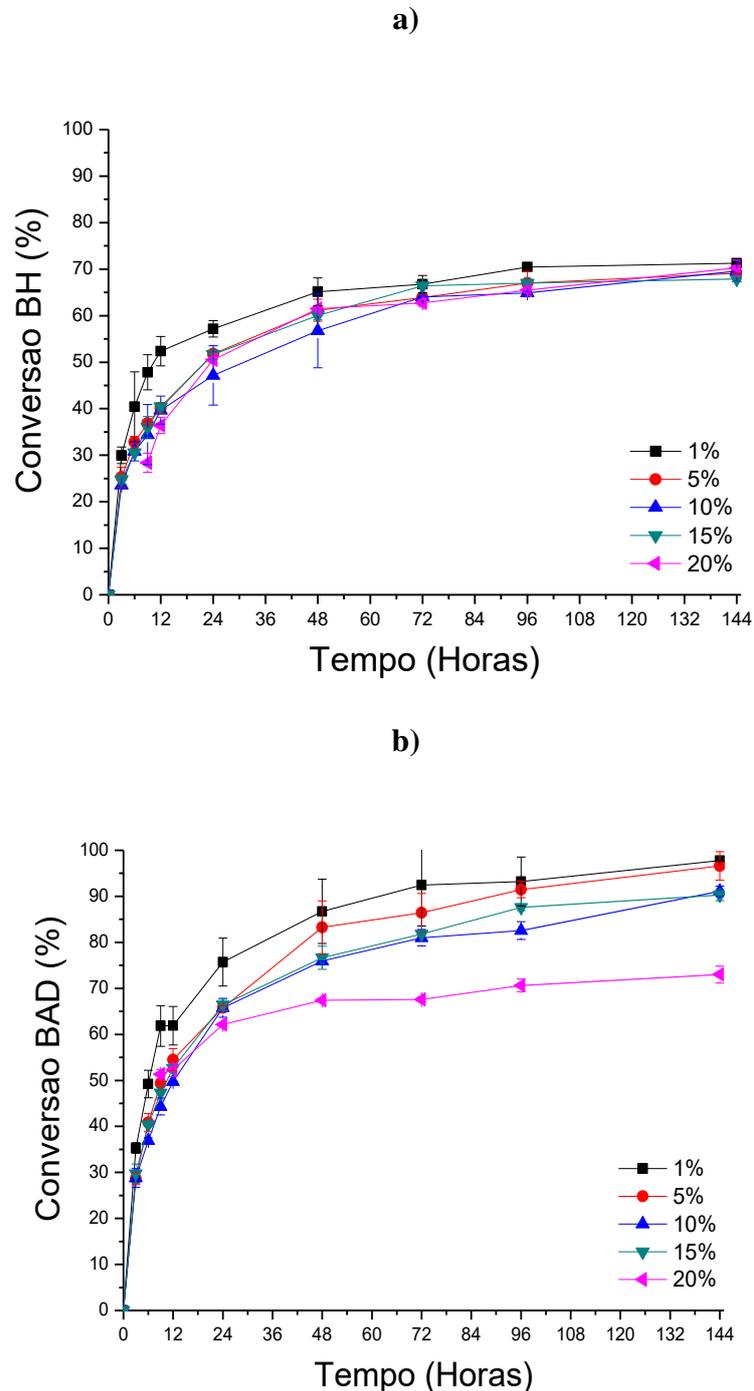
relacionada às condições do pré-tratamento empregado no material lignocelulósico, à própria composição do material *in natura* e também em relação ao coquetel enzimático utilizado.

Liu et al. (2017), ao hidrolisarem bagaço de cana alcalino (NaOH 0,5 M) a 24% de sólidos (m/v), alcançaram, ao final de 168 horas, aproximadamente 91,90 g/L de glicose. Esse valor encontrado na literatura está abaixo do valor para o BAD desse trabalho, onde a hidrólise desse bagaço a 20% (m/v) resultou em  $115,53 \pm 2,92$  g/L de glicose. No trabalho de Lui et al. (2017) é também notado o efeito do tempo sob a concentração de açúcares produzidos durante o curso da reação hidrolítica.

Embora o aumento da concentração de sólidos melhore a concentração de glicose na hidrólise enzimática, ele também influencia no rendimento de açúcares. Ao se aumentar a fração sólida, o conteúdo de água disponível se reduz e, conseqüentemente, observa-se uma diminuição na conversão de celulose (Figura 4.2 a e b), principalmente, para as primeiras 24 horas reacionais. Entretanto, também pode ser notado que, para o BH (Figura 4.2 a), o efeito do conteúdo de sólidos diminui até quase desaparecer em um tempo prolongado de hidrólise (144 horas), em que a conversão para todas as concentrações de sólidos se aproximam e praticamente se equiparam.

Baseando-se na concentração de glucana inicial dos bagaços pré-tratados, a conversão de glicose foi calculada para BH e BAD. Em 12 horas de reação, observa-se que a conversão para BH diminuiu em aproximadamente 12% quando a concentração de sólidos passou de 1 para 5 % ( $52,36\% \pm 3,17$  para  $40,12\% \pm 1,12$ ) e em 15% quando a concentração de sólidos passou para 20 % ( $36,42\% \pm 1,30$ ). Como dito anteriormente, com o passar o tempo reacional a diminuição da conversão em relação à concentração de sólidos é menos pronunciada e em 48 horas a diferença na conversão de 1% para 20 % de sólidos foi de apenas 3,59 %, enquanto que para 144 horas essa diferença foi de 0,99 %. Essa relação também é claramente observada na literatura para outros tipos de biomassa que passaram por tratamentos como hidrotérmico e ácido diluído (ácido sulfúrico) (GENG et al., 2015; WANG et al., 2016).

**Figura 4.2:** Conversão de celulose em relação à concentração de sólidos para hidrólise em até 144 horas a) conversão celulose para BH e b) conversão celulose para BAD

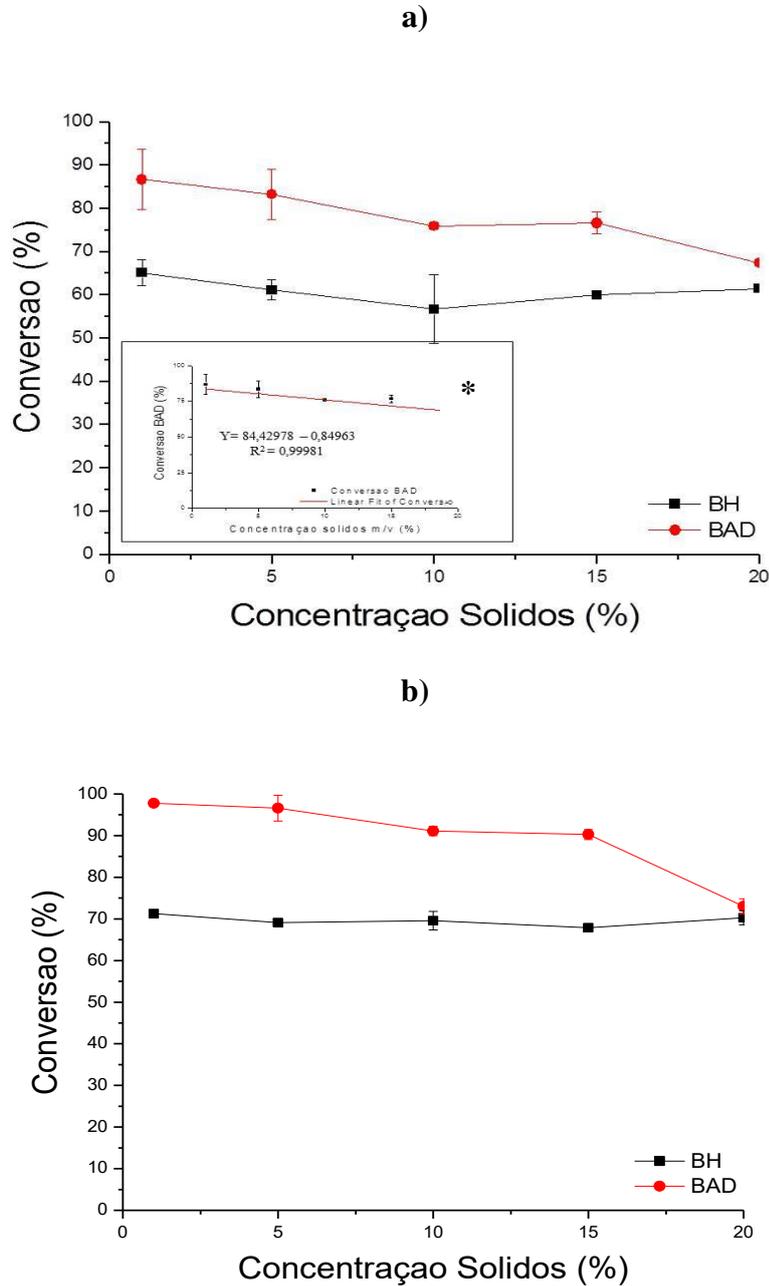


Já para o BAD, aumentando-se a carga de sólidos de 1 para 20% (m/v), a conversão de glicose caiu 9,59% ( $62,88\% \pm 4,18$  para  $52,29\% \pm 1,49$ ) em 12 horas, sendo que em 48 e 144 horas a diferença na conversão aumentou consideravelmente, com 19,29 % e 24,75 %, respectivamente. Aqui ocorreu o contrário, com o passar do tempo reacional a diferença na conversão em relação à concentração de sólidos não diminuiu. Neste caso, o aumento na

concentração de sólidos mostrou que os problemas relacionados a transferência de massa e calor e o aumento da viscosidade somados com a inibição por produto (maiores quantidades de açúcares fermentescíveis liberados no meio reacional) interferem na conversão final da sacarificação.

Para melhor visualização do efeito do aumento na carga de sólidos sobre a conversão de celulose para cada uma das biomassas (BH e BAD), em 48h e 144h de hidrólise, têm-se os gráficos na Figura 4.3 (a e b). A correlação entre a concentração de sólidos e a conversão de celulose foi linear em toda a gama de 1 a 20% (m/v) para o BAD em 48h, enquanto que para o BH a conversão apenas apresenta uma pequena mudança entre 1 e 20% de sólidos. Quando o tempo reacional aumenta para 144 horas nota-se que o efeito do teor de sólidos desaparece para o BH e somente é percebido para a concentração de 20% para o BAD. Este resultado indica que provavelmente seria possível obter uma concentração ainda maior de glicose na hidrólise de BAD a 20% de sólidos se o tempo de hidrólise fosse maior, mostrando que o aumento da concentração de sólidos torna a reação mais lenta, provavelmente devido à maior inibição por produto, mas parece não alterar a conversão final obtida se a reação ocorrer por tempo suficiente.

**Figura 4.3:** Gráficos do efeito do aumento da concentração de sólidos na conversão de celulose para os tempos de a) 48 horas reacionais e b) 144 horas reacionais. \* corresponde ao gráfico de linearidade da conversão em relação à concentração de sólidos.



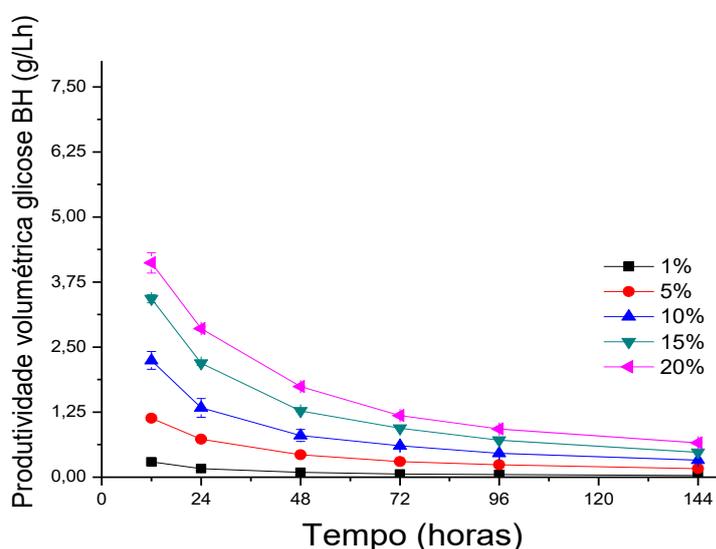
Um fator bastante crítico nos projetos de processo é a produtividade volumétrica, que pode definir o tamanho necessário do reator e também serve como instrumento de análise para os experimentos em escala laboratorial, já que oferece dados importantes para discussão (ANDRIC et al., 2010 b). Com base nesse relato, os resultados abaixo mostram a diferença de produtividade volumétrica de glicose entre as hidrólises (Figura 4.4 a e b).

A produtividade volumétrica do BH (Figura 4.4 a) sofre influência do aumento da carga de sólidos iniciais e também do tempo reacional. Observa-se uma queda na

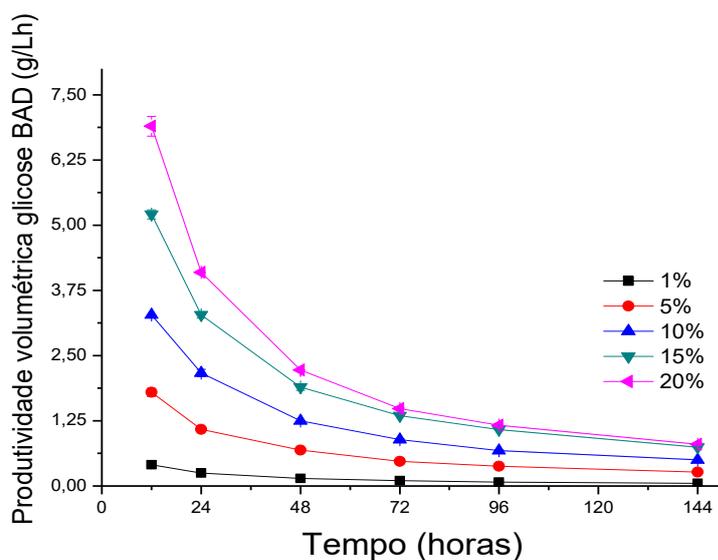
produtividade bastante significativa nas primeiras 48 horas reacionais para as maiores concentrações de sólidos (10, 15 e 20% m/v). A produtividade em 12 horas para 10% de sólidos foi de  $2,24 \pm 0,17$  g/Lh, em 48 horas, a produtividade foi de  $0,80 \pm 0,1$ , e em 72 horas de hidrólise enzimática a produtividade caiu para  $0,60 \pm 0,01$  g/Lh, aqui se observa uma queda de 73,22 % na produtividade volumétrica de glicose para 10% m/v ao longo do tempo reacional. No final da reação de sacarificação, 144 horas, a produtividade caiu em aproximadamente 85% ( $0,33 \pm 0,01$  g/Lh). Para a maior concentração de sólidos (20% m/v) as produtividades ao longo do tempo reacional foram relativamente maiores em comparação com as demais cargas de sólidos. Nota-se que em 12 horas a produção de glicose foi quase duas vezes mais rápida, na taxa média de  $4,12 \pm 0,19$  g/Lh, e em 48 horas essa velocidade caiu para  $1,47 \pm 0,01$  g/Lh. No final da reação (144 horas) a produtividade volumétrica foi  $0,66 \pm 0,02$  g/Lh, aproximadamente 2 vezes maior em comparação a hidrólise enzimática realizada a 10% de sólidos (m/v).

**Figura 4.4:** Produtividade volumétrica de glicose na hidrólise enzimática em batelada para todas as concentrações de sólidos a) BH, b) BAD

a)



b)



Quando BAD foi utilizado como substrato na hidrólise enzimática (Figura 4.4 b), as taxas de produtividade volumétrica alcançadas foram significativamente maiores em relação ao substrato lignificado (BH), indicando que os substratos com menos teor de lignina têm potencial para reduzir os volumes requeridos de reatores, pois se trabalha com redução da massa através da remoção de lignina, e aumento da conversão devido à maior acessibilidade do material pelas enzimas.

A maior produtividade volumétrica de glicose foi de  $6,90 \pm 0,19$  g/Lh para BAD em 20% m/v no tempo de 12 horas. Em 48 horas observa-se que a produtividade fica menor e cai em aproximadamente 68% ( $2,22 \pm 1,48$  g/Lh). No final da reação de sacarificação a velocidade de produção para a glicose foi de  $0,80 \pm 0,02$  g/Lh. Ao examinar os dois gráficos (Figura 4.4 a e b) nota-se a diferença entre as produtividades volumétricas para os bagaços BH e BAD. Durante as primeiras 48 horas a diferença na produtividade para a maior carga de sólidos é bem evidente, e em 12 horas de reação essa diferença é de quase 3 vezes do valor de BH para BAD (BH =  $4,12 \pm 0,19$  e BAD =  $6,90 \pm 0,19$  g/Lh). Quando a carga de sólidos é menor, 5% m/v, a diferença entre as produtividades dos bagaços não foi tão pronunciada. Provavelmente a menor diferença nas produtividades está relacionada ao fato de que em menores concentrações de sólidos a hidrólise enzimática não é influenciada negativamente pelo combo “efeito de sólidos”, e sim pelas características do substrato. Nesse caso, a diferença pode estar mais ligada à proporção de lignina nos bagaços.

Na literatura, Andric et al. (2010 a) referiram-se ao experimento de Jørgensen et al. (2007) e estimaram uma produtividade volumétrica inferior a 0,3 g/Lh para uma hidrólise a 40% (m/m) de consistência em batelada da palha de milho pré-tratada por 96 horas.

Sabe-se que a carga de sólidos é um dos fatores que mais afeta a conversão dos açúcares na hidrólise enzimática da celulose, e que a alta concentração de açúcares na etapa de hidrólise é essencial para obtenção de altas concentrações de etanol após a fermentação. Um dos caminhos para tentar minimizar os problemas é realizar a hidrólise em modo batelada alimentada (MARTINS et al., 2015).

#### **4.4 Conclusões**

Com o estudo da hidrólise enzimática para duas biomassas distintas, BH e BAD, foi possível verificar e confirmar que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar determina a eficiência na digestibilidade da celulose. Observou-se que o bagaço lignificado (BH) apresentou menor digestibilidade da celulose para todas as concentrações de sólidos estudadas (1 a 20% m/v) em comparação com o bagaço que passou por uma etapa de deslignificação com NaOH (BAD). Provavelmente isso está relacionado às mudanças químicas e estruturais causadas pelo tipo de pré-tratamento aplicado na biomassa, como por exemplo, a quantidade de lignina.

Os resultados referentes à variação na carga de sólidos mostraram que a concentração de glicose aumentou em relação à concentração de sólidos e também com o tempo reacional, onde foi possível alcançar altas concentrações de glicose para os bagaços (BH e BAD) em 144 horas.

Contudo, o aumento na concentração de sólidos influenciou na conversão de celulose, principalmente nos tempos reacionais mais curtos, onde a quantidade de água disponível era menor, ocasionando uma série de problemas como os relacionados à transferência de massa que dificultam, por exemplo, a mistura eficiente dos produtos e outros inibidores que se concentram perto do sítio catalítico enzimático inibindo as enzimas.

A conversão de celulose também foi afetada pelo tempo reacional e pelo tipo de pré-tratamento. O efeito do conteúdo de sólidos para o BH diminuiu até quase desaparecer em um tempo prolongado de hidrólise (144 horas) em que a conversão para todas as concentrações de sólidos (1 a 20%) se aproximam e praticamente se equiparam. Essa mesma tendência não foi tão evidente para o outro tipo de pré-tratamento (BAD), onde a conversão de celulose diminuiu com o aumento da carga de sólidos. Possivelmente o efeito da inibição por produto foi maior para o BAD, e em alta concentração de sólidos esse efeito combinado com outros ligados a altas concentrações de sólidos ocasionou a queda na conversão de celulose.

Ainda sim, o BAD apresentou melhores resultados em comparação ao BH. A produtividade volumétrica de glicose para o BAD foi muito maior em relação ao BH,

indicando que a deslignificação tem o potencial de reduzir os volumes requeridos de reatores, já que a quantidade de massa necessária é menor para alcançar quantidades maiores de glicose. A produtividade volumétrica também mostrou a influência do aumento na carga de sólidos iniciais e do tempo. Para concentrações de sólidos elevadas, a produtividade volumétrica de glicose em 12 h foi de até 6,90 g/Lh para o BAD, enquanto que para o BH a produtividade foi de 4,12 g/Lh de glicose.

No presente trabalho foi possível aumentar a carga de sólidos e obter altas concentrações e produtividades de glicose. Entretanto, a carga de sólidos afetou a conversão dos açúcares na hidrólise enzimática da celulose. Sendo assim, novas estratégias e estudos seriam necessários para minimizar os problemas relacionados à hidrólise enzimática com altas cargas de sólidos.

## 5 CAPÍTULO 5

### HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM BATELADA ALIMENTADA

#### 5.1 Introdução

Várias estratégias para viabilizar a hidrólise enzimática com altas cargas de sólidos têm sido propostas em trabalhos recentes, entre elas a operação em batelada alimentada (CUI et al., 2014; DU et al., 2017; HODGE et al., 2009; JUNG et al., 2017; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2012), que pode ajudar com as dificuldades difusionais no sistema. No entanto, resultados de diferentes trabalhos são conflitantes, alguns mostrando aumento na conversão e outros até mesmo uma diminuição (CHANDRA et al., 2011). Nos trabalhos que mostram diminuição da conversão existe a possibilidade de que os autores não tenham considerado a adição de água ao sistema ao alimentar a biomassa, que em geral tem uma porcentagem de umidade. Além disso, para manter altas conversões a determinação do perfil de vazão ótimo de adição de substrato é muito importante (MODENBACH; NOKES, 2013) e a maioria dos trabalhos faz a adição de substrato por tentativa e erro. Ainda que a conversão permaneça constante na operação em batelada alimentada, este modo de operação diminui a energia gasta para agitação, uma vez que é possível aguardar a liquefação do *slurry* antes de adicionar mais sólidos, mantendo sempre concentrações mais baixas de sólidos insolúveis no reator.

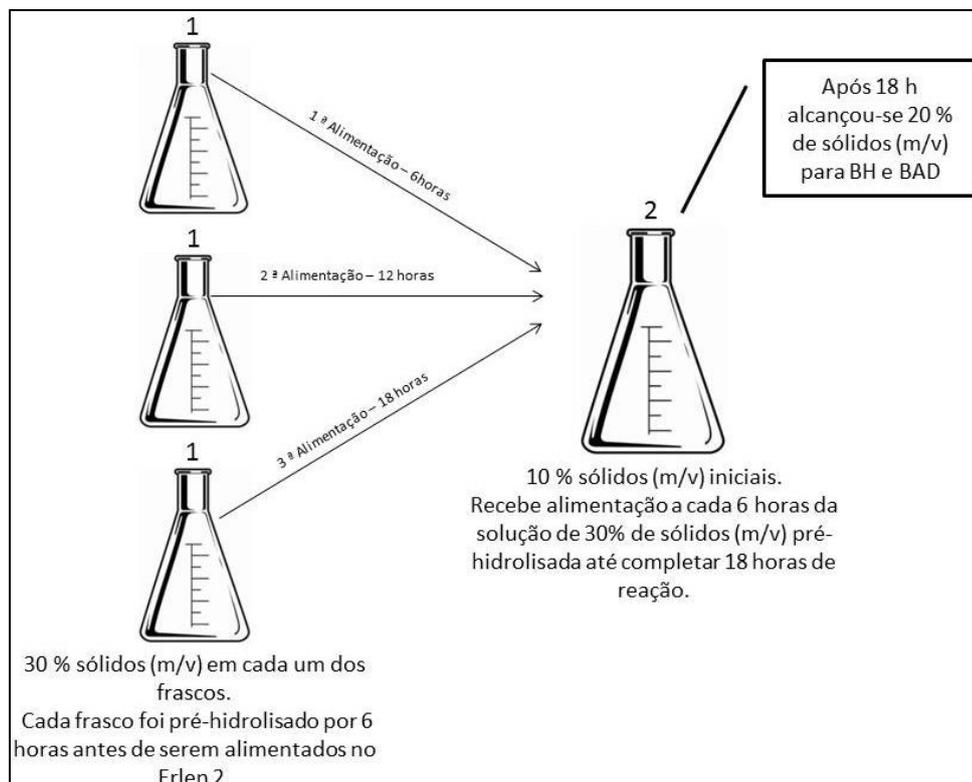
Portanto, o Capítulo 5 visou avaliar o modo de operação batelada alimentada como forma de aumentar a concentração de glicose (g/L) sem diminuir a conversão dos açúcares durante o processo da hidrólise enzimática para altas concentrações de sólidos. Para isso duas configurações foram propostas e implementadas: C1 e C2, que estão descritas nos itens 5.2.1 e 5.2.2, a seguir. A diferença principal entre as duas configurações é uma etapa de pré-hidrólise do bagaço a ser alimentado na configuração C1, que foi feita com o intuito de avaliar se a alimentação de material parcialmente liquefeito diminuiria as limitações de transferência de massa associadas com a operação da hidrólise em altas cargas de sólidos.

## 5.2 Metodologia experimental

### 5.2.1 Hidrólise enzimática em batelada alimentada com adsorção prévia da celulase – Configuração C1

As hidrólises em batelada alimentada C1 foram realizadas para os dois bagaços pré-tratados, BH e BAD. A Figura 5.1 exemplifica as etapas para a realização da HE em batelada alimentada C1. Nessa estratégia, a reação de sacarificação iniciou-se com 10% de sólidos (m/v) e, a cada 6 horas, adicionou-se solução com 30% de sólidos (m/v) até completar 18 horas. O bagaço alimentado foi pré-hidrolisado por 6 horas antes de cada alimentação, e então, o conteúdo pré-hidrolisado era alimentado no Erlenmeyer. No final das 18 horas, alcançou-se 20% de sólidos (m/v) para cada uma das hidrólises com os bagaços pré-tratados (BH e BAD). Nesses experimentos foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL contendo tampão citrato 0,05 M (pH 4,8) complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa. A cada alimentação de bagaço (BH ou BAD) foi adicionada a quantidade de enzima equivalente para manter a carga enzimática do meio reacional no nível de 15 FPU de celulase/g de bagaço. Os frascos foram incubados em agitador orbital, mantidos a 150 rpm e 50 °C por até 144 horas. As enzimas foram adicionadas após 30 minutos de incubação. Amostras foram coletadas do meio reacional em tempos pré-determinados para quantificação dos açúcares liberados.

**Figura 5.1:** Fluxograma da HE em batelada alimentada – C1.



### 5.2.2 Hidrólise enzimática em batelada alimentada - Configuração C2

A segunda configuração (C2), em batelada alimentada, foi iniciada com 10% de sólidos (m/v), e a cada 6 horas, foram adicionados 5% (m/v) de bagaço descontando a umidade inicial (aproximadamente 7%) até completar 18 horas. A cada alimentação de bagaço foi adicionada a quantidade de enzima equivalente para manter a carga enzimática do meio reacional no nível de 15 FPU de celulase/g de bagaço. As condições reacionais (temperatura, tempo, agitação, pH) foram as mesmas descritas no item 5.2.1. No final das 18 horas, alcançaram-se 24,77% de sólidos (m/v) para a hidrólise com BH e 24,72% de sólidos para o BAD.

As amostras coletadas durante as reações de HE foram posteriormente filtradas, e injetadas em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) para quantificação dos açúcares.

### 5.2.3 Influência da alta concentração de açúcar na cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD

A fim de avaliar a influência de concentrações elevadas de açúcar no processo de adsorção do complexo celulolítico Cellic Ctec 2 no BAD, experimentos de cinética de adsorção foram realizados. Com isso foi possível verificar o quanto a adsorção é prejudicada ao longo de uma HE com alta concentração de sólidos que gera, consecutivamente, uma

liberação maior de açúcares no meio reacional, e como esses açúcares interferem posteriormente na adsorção dessas enzimas.

Foram adicionados aos Erlenmeyers tampão citrato 0,05 M pH 4,8 complementado com 0,02% de azida sódica por grama de biomassa juntamente com a biomassa (BAD) na concentração de 10% de sólidos (m/v) (concentração máxima de sólidos onde se conseguiu desenvolver a metodologia de adsorção, em concentrações maiores não havia água livre para realizar o ensaio). A enzima (Cellic CTec 2) foi adicionada no meio reacional na carga de 15 FPU/g BAD após 30 minutos de incubação do meio nas condições reacionais de temperatura e agitação estudadas. A agitação foi de 150 rpm e a temperatura da reação foi de 25°C, temperatura ambiente, que evita uma possível hidrólise do material. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e para cada ponto analisado foi utilizado um frasco. Para uma melhor visualização os experimentos e as condições experimentais estão listados na

Tabela 5.1. Cabe destacar que as concentrações de glicose adicionadas foram estabelecidas de acordo com os valores de glicose liberados durante a hidrólise enzimática dos bagaços estudados.

Durante o experimento, amostras do sobrenadante foram recolhidas, centrifugadas em centrífuga NT 810 (Novatecnica, Brasil) e filtradas. Para a filtragem, utilizaram-se filtros MILLEX - HV com membrana de PVDF, 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro (Milipore). As amostras, então, foram analisadas para a quantificação do teor de proteínas pelo método de Bradford descrito no item 3.2.4.

**Tabela 5.1:** Arranjo experimental para as cinéticas de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD na presença de diferentes concentrações de glicose.

<b>Cinética de adsorção</b>			
<b>Arranjo experimental</b>	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de sólidos (m/v)	Concentração Cellic Ctec 2 (mg de proteína/g BAD)
1	0	10	7,40
2	70	10	7,40
3	100	10	7,40
4	140	10	7,40

## 5.3 Resultados e discussão

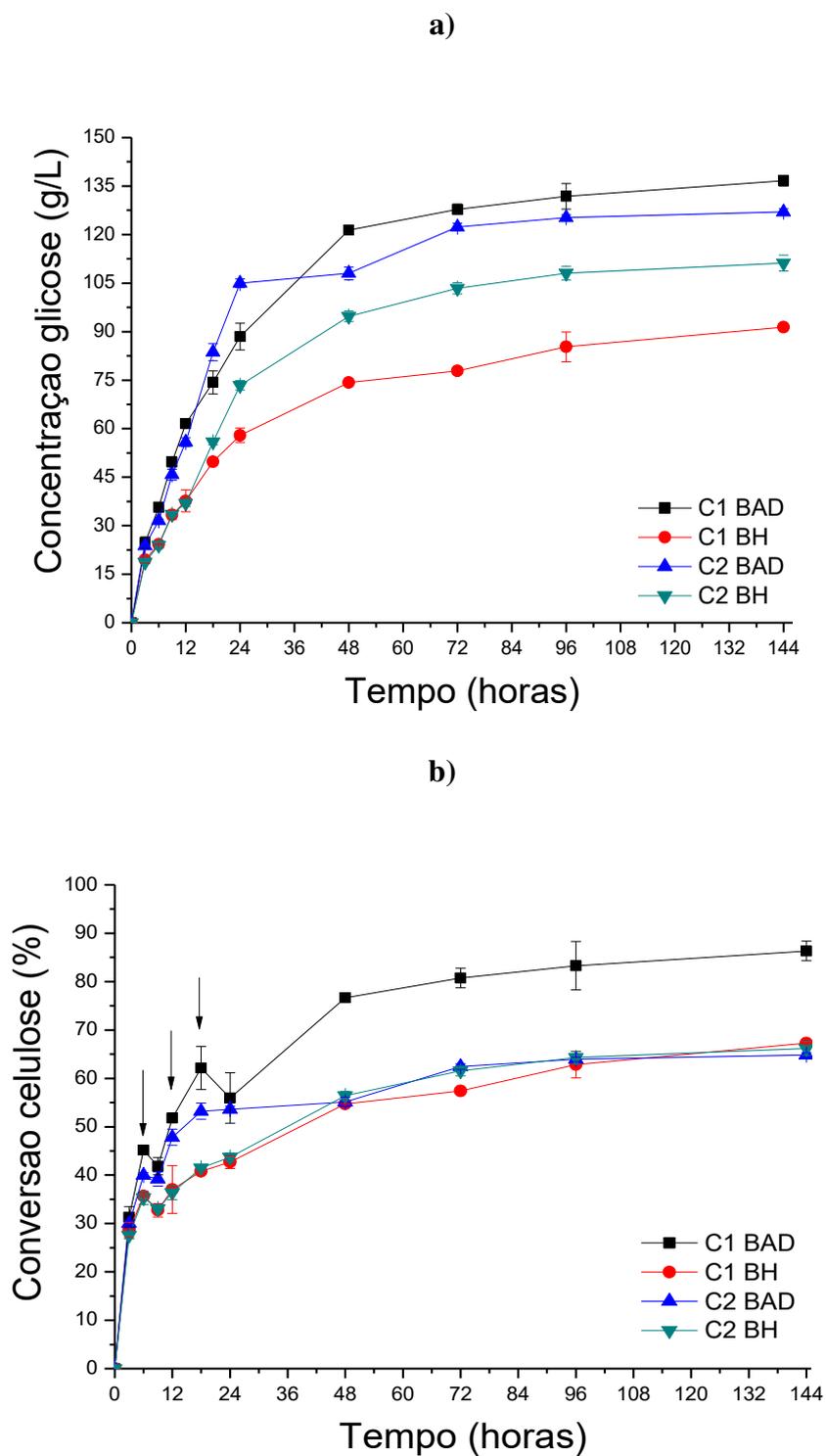
### 5.3.1 Hidrólise enzimática em batelada alimentada - Configurações C1 e C2

Para cada um dos esquemas de alimentação (C1, seção 5.2.1; C2, seção 5.2.2), as alimentações foram realizadas nos tempos de hidrólise de 6, 12 e 18 horas para alcançar a quantidade total de sólidos de 20% (m/v) para C1, e de aproximadamente 24% (m/v) para C2. A diferença na concentração de sólidos alcançada no final das três alimentações para as configurações C1 e C2 deve-se ao fato de que na primeira configuração (C1) a alimentação de bagaço foi realizada em solução (bagaço pré-hidrolisado) e o teor de umidade foi maior em relação às alimentações feitas na configuração 2, onde o bagaço era adicionado praticamente seco (7% de umidade).

A Figura 5.2 (a e b) exibe os perfis de liberação da glicose para os diferentes esquemas propostos, e compara o efeito da batelada alimentada na conversão de celulose da hidrólise enzimática para os bagaços (BH e BAD). Para comparar a concentração de celobiose (g/L) liberada ao longo das estratégias, verificar Apêndice V, Tabela 10.7 e 10.8.

O substrato com menor quantidade de lignina na composição (BAD) apresentou melhor desempenho, com produção de até  $136,63 \pm 1,59$  g/L de glicose em 144 horas na configuração C1. O pré-tratamento ácido seguido de deslignificação permitiu a produção de concentrações elevadas de glicose com cargas de sólidos menores na hidrólise quando comparado ao pré-tratamento hidrotérmico (Tabela 5.2), o que minimiza o consumo de energia para agitação, bem como problemas de transferência de massa e calor em maiores escalas.

**Figura 5.2:** Influência do tipo de pré-tratamento e das configurações de BA empregadas na HE. a) Concentração de glicose, b) Conversão de celulose em glicose.



**Tabela 5.2:** Concentração de glicose e conversão da hidrólise para as diferentes estratégias de HE para 144 horas de hidrólise.

Concentração de sólidos	Hidrotérmico (BH)		Ácido-NaOH (BAD)	
	Glicose (g/L)	Conversão (%)	Glicose (g/L)	Conversão (%)
<b>20 % (batelada)</b>	95,37 ± 2,34 <b>a</b>	70,27 ± 1,72 <b>a</b>	115,54 ± 2,92 <b>a</b>	73,00 ± 1,85 <b>a</b>
<b>20 % (batelada alimentada C1)</b>	91,35 ± 0,37 <b>a</b>	67,31 ± 0,22 <b>a</b>	136,63 ± 1,59 <b>b</b>	86,33 ± 2,02 <b>b</b>
<b>24 % (batelada alimentada C2)</b>	111,19 ± 2,43 <b>b</b>	66,18 ± 1,45 <b>a</b>	126,99 ± 0,95 <b>c</b>	64,82 ± 0,49 <b>c</b>

Médias com letras diferentes em uma linha diferem significativamente entre si no nível  $p < 0,10\%$  na análise de Tukey.

A concentração de glicose mais alta já era esperada para o bagaço BAD devido à maior porcentagem de celulose em sua composição (Tabela 3.2), mas pode-se notar na Figura 5.2 b que a conversão também é mais rápida para este bagaço, mostrando a maior acessibilidade da enzima à celulose. Embora mais rápida no início, a conversão ao final de 144 h para o BAD na configuração C2 foi a mesma que para o BH nas duas configurações.

Na configuração C1, no entanto, nota-se uma conversão muito alta em 144 h, de  $86,33 \pm 2,02\%$ . Uma hipótese é que a menor conversão na configuração C2 pode ter sido devida à dificuldade de acesso das enzimas ao substrato alimentado, evitada com a alimentação do bagaço pré-hidrolisado, embora a mesma tendência não aconteça para o bagaço BH. Uma hipótese para estes diferentes comportamentos pode ser a diferença no valor de retenção de água (VRA) para os dois materiais. Martins et al. (2015) mostraram que materiais submetidos a pré-tratamentos que deslignificam tendem a ter valores maiores de VRA. Por outro lado, Modenbach & Nokes. (2013) afirmaram que VRAs elevados levam ao aumento da viscosidade aparente da mistura, o que dificulta o acesso das enzimas ao substrato. Assim, o bagaço BAD, tendo um maior valor de VRA, teve a hidrólise favorecida quando a adsorção das enzimas foi feita em estágio separado.

No caso do bagaço BH, os resultados similares nas configurações C1 e C2 podem ser também atribuídos à estrutura do material, com mais lignina, que pode ter limitado a hidrólise mesmo quando as enzimas acessam o substrato mais facilmente na configuração C1. Driemeier et al. (2015) relataram que biomassas submetidas à pré-tratamentos conhecidos por não remover a lignina (ácido diluído, hidrotérmico e explosão a vapor) ocasionam agregação

da lignina e da celulose, além da co-cristalização, o que provoca uma coesão nanoescalar dos poros tornando-os menores ( $< 4\text{nm}$ ) em comparação aos observados em biomassas deslignificadas ( $>10\text{nm}$ ).

Outra hipótese para as diferenças entre a conversão nas configurações C1 e C2 para o BAD é a inibição da adsorção pela glicose produzida durante a hidrólise. Resultados anteriores (MACHADO, 2013) mostraram que a glicose pode causar um efeito de inibição na adsorção. Como na hidrólise do bagaço BAD há liberação de maiores concentrações de glicose do que na hidrólise do bagaço BH, a adsorção pode ter sido inibida na configuração C2, o que não aconteceria na configuração C1, em que a adsorção no bagaço a ser alimentado é feita em etapa separada. Para tentar comprovar essa hipótese, cinéticas de adsorção na presença de concentrações elevadas de glicose foram realizadas, e os resultados estão dispostos na seção seguinte (5.3.2).

Deve-se ressaltar que a configuração C1 pode ter vantagens em um processo industrial, onde a alimentação de uma solução é mais fácil do que a alimentação de bagaço sólido.

Comparando os resultados da hidrólise enzimática em batelada alimentada com adsorção prévia (configuração C1) ao controle (hidrólise a 20% sólidos (m/v), em batelada) (Tabela 5.2), observa-se que a concentração de glicose no meio reacional aumentou para o bagaço BAD, mas não para o BH. No caso do BH, o modo de operação batelada alimentada não melhorou a conversão, indicando que provavelmente a estrutura do material tenha limitado mais o processo de hidrólise do que as próprias limitações de transferência de massa. Já para o BAD a conversão na batelada alimentada (C1) aumentou muito em relação à obtida em batelada para a mesma carga de sólidos.

Na configuração C2, batelada alimentada, a carga de sólidos é um pouco maior e a concentração de glicose foi maior do que a batelada a 20% de sólidos para os dois bagaços, como já era esperado. No entanto, nota-se que as conversões são mais baixas e iguais estatisticamente.

Modenbach & Nokes (2013) compararam muitos trabalhos que realizaram a hidrólise de diferentes biomassas no modo batelada alimentada. As cargas de sólidos variaram de 10% a 30% (m/v) e foram utilizadas diferentes estratégias de alimentação em tempos de hidrólise de 72 a 288 h. Ma et al. (2011) relataram uma conversão de 74% para o bagaço de mandioca pré-tratado com ácido sulfúrico diluído, após 72 h de hidrólise, com 25% de sólidos. Os autores fizeram somente duas alimentações, em 6 e 12 horas reacionais, onde a enzima foi adicionada integralmente no início da reação. Um estudo conduzido por Jung et al. (2017) demonstrou que após aperfeiçoarem os perfis de alimentação da biomassa e da enzima, alcançaram 132,6

g/L de glicose e 76,0% de conversão teórica com 60 horas de sacarificação da palha de arroz pré-tratada com ácido málico a 30 % de sólidos (m/v). Essa concentração elevada de glicose juntamente com a conversão foram descritas pelos autores como fruto de uma otimização adequada nos perfis de alimentação da hidrólise em batelada alimentada.

Gao et al. (2014) trabalharam com o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH e descreveram uma conversão de celulose de 60,7%, com concentração máxima de glicose de 129,50 g/L em 120 horas de hidrólise enzimática em modo batelada alimentada. Os autores iniciaram o sistema de hidrólise com 12% (m/v) de sólidos, onde 7% (m/v) de sólidos frescos foram alimentados consecutivamente às 6 h, 12 h e 24 h para obter uma concentração final de 33% (m/v). Toda celulase usada (10 FPU/g de substrato) foi adicionada por completo no início da reação de hidrólise.

Outro estudo de hidrólise enzimática em batelada alimentada foi realizado por Wang et al. (2016) que utilizaram como substrato o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método hidrotérmico. Esses autores obtiveram ao final das alimentações, 20% de sólidos insolúveis totais, e após 120 horas a concentração de glicose foi de 91,6 g/L com conversão de 68,3%. Nesse esquema de batelada alimentada, as enzimas foram adicionadas integralmente no início, juntamente com uma concentração otimizada de Tween80, um surfactante não iônico, que melhorou o desempenho das reações de hidrólise da biomassa pré-tratada em estudos anteriores dos mesmos autores.

Zhang et al. (2012) estudaram outro método de batelada alimentada para a conversão do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH. A biomassa foi alimentada no reator com 9%, 8%, 7% e 6% de sólidos ao longo de 48 h para obter uma carga de sólidos final de 30% (m/v). Todas as enzimas foram adicionadas juntamente com a primeira adição de biomassa. A conversão final de glicose para o bagaço de cana foi de 55%.

Notam-se, pelas referências acima, que os valores de glicose e conversão de celulose encontrados neste trabalho estão dentro dos valores encontrados na literatura, tanto para o BH quanto para o BAD, quando os mesmos foram hidrolisados em modo batelada alimentada na configuração C2, onde bagaço fresco era adicionado em tempos reacionais pré-determinados. Já os resultados apresentados nesse capítulo para a configuração C1 podem ser considerados inéditos, uma vez que não foi encontrada nenhuma estratégia parecida como a proposta nesse trabalho.

Podem-se destacar algumas vantagens ao se trabalhar modo batelada alimentada, como por exemplo, da viscosidade inicial ser mais baixa, de modo que a difusão e as limitações da mistura podem ser minimizadas ou completamente evitadas, pois a manutenção da carga de

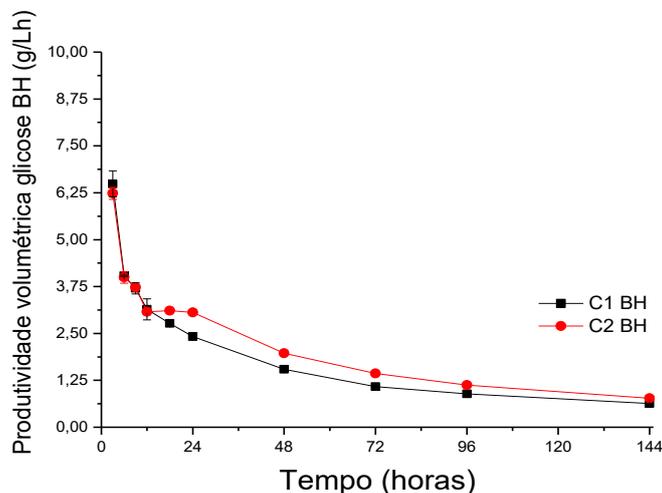
sólidos é baixa. Além disso, o regime de alimentação permite que o substrato se liquefaça parcialmente antes da adição de sólidos adicionais, o que mantém um nível de água livre disponível para o processo de reação e difusão de produtos potencialmente inibidores que resultam da reação de hidrólise (HOYER et al., 2010).

A Figura 5.3 (a, b) e a Figura 5.4 (a, b) mostram as diferenças nas produtividades volumétricas de glicose entre as configurações C1 e C2 da batelada alimentada e também a comparação destas entre os bagaços BH e BAD, nessa ordem. Para ambas as configurações C1 e C2 seja a comparação entre elas (Figura 5.3 a, b) ou entre as diferentes biomassas (Figura 5.4 a, b), nota-se que as taxas das hidrólises foram relativamente altas no início de cada uma das reações (12 horas), e então, gradualmente se tornaram menores com o aumento do tempo reacional. As produtividades volumétricas de glicose para o BH nas configurações C1 e C2 foram basicamente iguais durante as primeiras 12 horas, onde se alcançou  $3,14 \pm 0,28$  g/Lh de glicose na C1 e  $3,07 \pm 0,08$  g/Lh na C2.

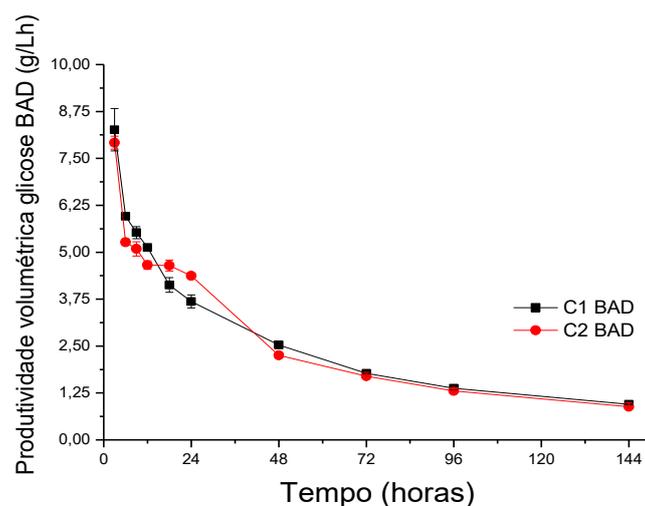
Observa-se (Figura 5.3 a) que a partir de 18 horas reacionais a produtividade volumétrica fica maior para a C2 e se mantém até o final da reação (144 horas), mesmo em menor proporção. Essa diferença na velocidade pode ser referente à maior concentração de sólidos alcançada na C2, uma vez que a última alimentação para ambas as configurações foi realizada em 18 horas.

**Figura 5.3:** Produtividade volumétrica de glicose nas configurações de BA. a) comparação entre C1 e C2 para BH e b) comparação entre C1 e C2 para BAD.

a)



b)

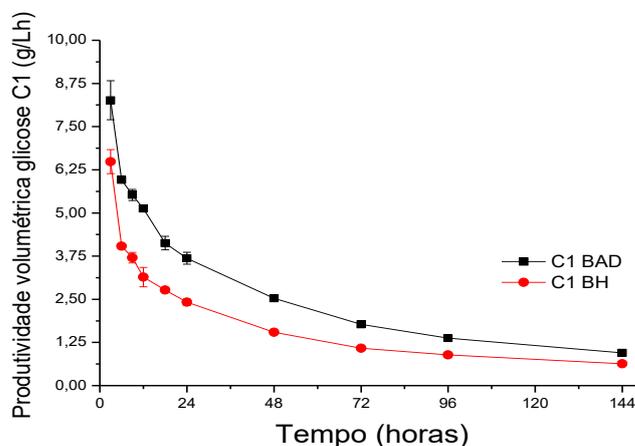


Em relação ao BAD (Figura 5.3 b) nota-se também um perfil bastante próximo ao encontrado para o BH. A produtividade volumétrica de glicose foi maior para as primeiras 12 horas e então, diminuiu de acordo com o tempo. Entretanto, os valores encontrados para essa biomassa foram aproximadamente 2 vezes maiores em comparação ao BH, como exemplo, em 12 horas a produtividade foi de  $5,12 \pm 0,01$  g/Lh de glicose para C1 e de  $4,65 \pm 0,11$  g/Lh para C2.

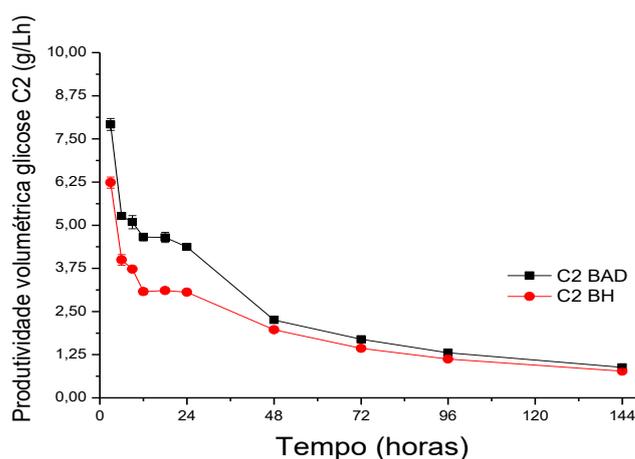
Essa diferença pode ser analisada através da Figura 5.4 (a, b) que exhibe os gráficos comparativos entre os bagaços BH e BAD nas configurações de batelada alimentada C1 e C2.

**Figura 5.4:** Produtividade volumétrica de glicose para as configurações de BA. a) referente à configuração C1 para BH e BAD e b) referente à configuração C2 para BH e BAD.

a)



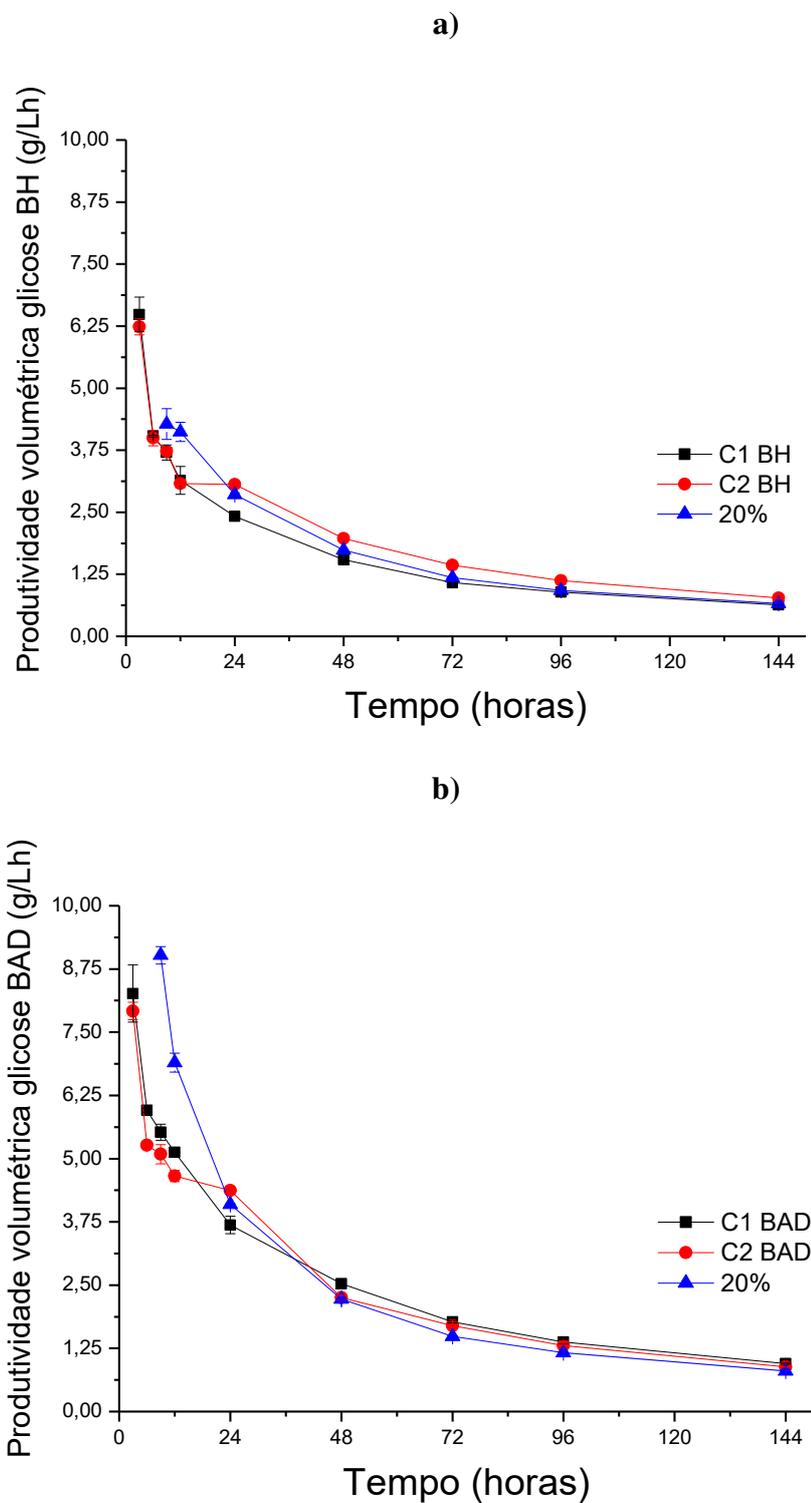
b)



Com relação à configuração C1 verifica-se que a diferença entre as produtividades de glicose para BH e BAD é mais pronunciada do que a observada pela configuração C2. A velocidade na produção de glicose em 12 horas foi de  $5,12 \pm 0,01$  g/Lh para BAD e de  $3,14 \pm 0,28$  g/Lh para BH. Para C2, observa-se que a diferença entre as produtividades foi maior somente no início da reação, já, a partir de 48 horas a relação entre as velocidades são basicamente iguais, onde se alcançou em 144 horas  $0,88 \pm 0,01$  g/Lh de glicose para BAD e  $0,77 \pm 0,01$  g/Lh de glicose para BH.

Ao avaliar a Figura 5.5 (a e b) percebe-se que a produtividade de glicose difere entre as hidrólises em batelada (20 % m/v) e batelada alimentada, principalmente nas primeiras 24 horas reacionais.

**Figura 5.5:** Comparação da produtividade volumétrica de glicose entre configurações de batelada alimentada e batelada na hidrólise enzimática. a) bagaço hidrotérmico – BH e b) bagaço ácido seguido de deslignificação com NaOH – BAD.



A produtividade volumétrica de glicose para ambos os bagaços na hidrólise em batelada foi maior, destacando o valor para o BAD. Em 12 horas o valor alcançado para BH na

hidrólise enzimática em batelada (Figura 5.5 a) foi de  $4,12 \pm 0,19$  g/Lh de glicose, enquanto que para as configurações de batelada alimentada C1 e C2 os valores foram de  $3,14 \pm 0,28$  g/Lh e de  $3,07 \pm 0,08$  g/Lh de glicose, respectivamente. Após a última alimentação de bagaço para as configurações C1 e C2, em 18 horas, observa-se que as velocidades na produção de glicose entre as configurações de hidrólise ficaram bem próximas, praticamente iguais. Somente a C2 proporcionou um leve aumento em relação às demais, mas porque nessa configuração a concentração de sólidos foi ligeiramente maior em comparação com C1 (20% m/v) e em comparação a hidrólise enzimática em batelada a 20% de sólidos (m/v).

Para o bagaço BAD as produtividades volumétricas de glicose (Figura 5.5 b) também exibiram o mesmo perfil, mostrado através da Figura 5.5 a, no início, a reação de hidrólise a 20% de sólidos (m/v) obteve os maiores valores para produtividade volumétrica. Como exemplo, em 12 horas, o valor da produtividade para a hidrólise foi de  $6,89 \pm 0,19$  g/Lh de glicose. As configurações C1 e C2 alcançaram, respectivamente,  $5,12 \pm 0,01$  g/Lh e  $4,65 \pm 0,11$  g/Lh de glicose. Entretanto, após as últimas alimentações de substrato houve uma pequena mudança e as produtividades para as configurações C1 e C2 se sobressaíram em relação à hidrólise enzimática em batelada. Em 72 horas, a produção de glicose foi de  $1,48 \pm 0,01$  g/Lh de glicose para hidrólise,  $1,77 \pm 0,02$  g/Lh para C1 e de  $1,70 \pm 0,01$  g/Lh de glicose para C2, mas sempre mantendo o perfil encontrado em todos os gráficos de produtividades volumétricas, conforme se aumenta o tempo reacional a taxa média da produtividade volumétrica diminui.

Na literatura alguns dados para a produtividade volumétrica de glicose foram calculados para hidrólise enzimática em modo batelada alimentada. Em geral, os valores encontrados não diferem muito dos valores deste trabalho. Wang et al. (2012b), por exemplo, obtiveram 0,74 g/Lh de glicose ao final de 120 horas de hidrólise enzimática modo batelada alimentada ao utilizarem 30% de bagaço de sorgo doce pré-tratado hidrotérmico. Outro estudo de hidrólise em batelada alimentada com 20% de sólidos totais, entretanto, com bagaço de cana pré-tratado hidrotérmico (WANG et al., 2016), mostrou que em 120 horas de sacarificação foram produzidos 91 g/L de glicose, que corresponde a uma produtividade volumétrica de aproximadamente 0,76 g/Lh de glicose. Neste trabalho, com o mesmo tipo de biomassa e pré-tratamento, nos tempos reacionais de 96 e 144 horas de hidrólise em batelada alimentada C1 foram produzidos 0,88 g/Lh e 0,77 g/Lh de glicose, nessa ordem.

Em relação a uma biomassa que passou por um tipo de pré-tratamento deslignificante, como o BAD deste trabalho, Zhang et al. (2012) ao estudarem a hidrólise em batelada alimentada do bagaço pré-tratado com NaOH, a 30% de sólidos, obtiveram após 144 horas de

sacarificação aproximadamente 125,97 g/L de glicose, que corresponde a uma produtividade volumétrica de glicose de 0,87 g/Lh. Já Gao et al. (2014) alcançaram aproximadamente 1,08 g/Lh de produtividade volumétrica de glicose ao utilizarem como biomassa o bagaço pré-tratado alcalino em uma concentração de sólidos de 33% na hidrólise enzimática em modo batelada alimentada por 120 horas. A configuração C1 de hidrólise em batelada alimentada proposta neste trabalho proporcionou até 0,95 g/Lh de glicose em 144 horas reacionais, enquanto que para 96 horas de hidrólise a produtividade volumétrica de glicose foi de 1,37 g/Lh.

### **5.3.2 Influência de concentrações elevadas de açúcares na cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD**

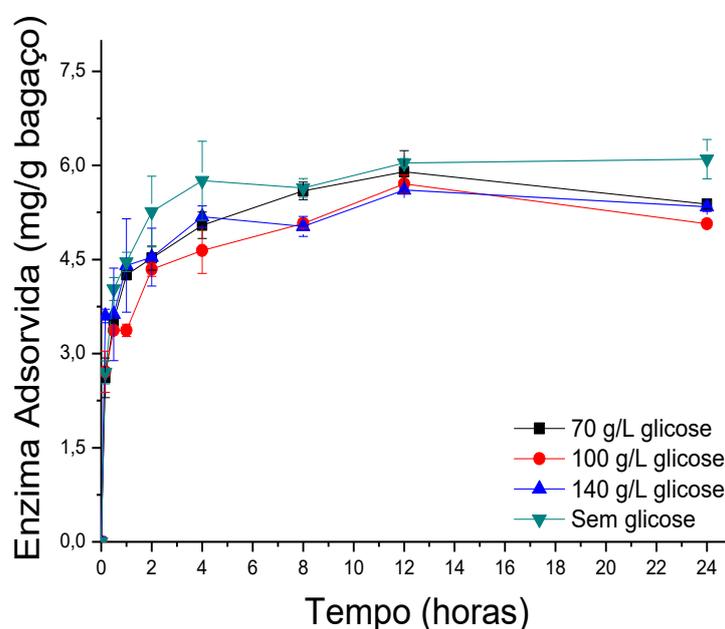
Os resultados aqui apresentados tiveram o propósito de avaliar se altas concentrações de açúcares inibem a adsorção das enzimas durante a hidrólise enzimática, uma vez que, mesmo trabalhando em modo batelada alimentada para diminuir os problemas relacionados à transferência de massa e calor, os valores de conversão de celulose foram difíceis de interpretar, principalmente entre as configurações C1 e C2 para o bagaço BAD. Os experimentos de cinéticas de adsorção foram realizados a 25°C, temperatura ambiente, na qual não ocorre reação de hidrólise enzimática. Isso foi estipulado para tentar avaliar somente o perfil de adsorção das enzimas no bagaço quando existe alta concentração de açúcares no meio reacional. Aos resultados de enzima adsorvida (mg/g de BAD) aplicou-se o Teste de Tukey.

A Figura 5.6 exibe os perfis de adsorção da Cellic Ctec2 sob o BAD na presença de três concentrações de glicose (70, 100 e 140 g/L), mais o perfil sem a interferência do açúcar. Nota-se que em 24 horas a quantidade de enzima adsorvida foi maior quando não houve nenhuma adição de glicose no meio reacional (6,01 mg/g BAD de celulase). Os valores das médias de concentração de enzima adsorvida no BAD para 70, 100 e 140 g/L de glicose no meio foram de 5,38, 5,06 e 5,76 mg/g de BAD de celulase, respectivamente. De acordo com o Teste de Tukey esses valores não são estatisticamente diferentes entre si, somente quando comparados com o teste branco (sem adição de glicose).

Aparentemente, pode-se dizer que a liberação de açúcares em determinada concentração no meio reacional de hidrólise enzimática pode interferir na adsorção das enzimas no bagaço e levar a uma menor digestibilidade do mesmo. Machado (2013), em um estudo de adsorção de celulases em bagaço deslignificado adicionando ou não glicose no meio, mostrou que valor de  $E_{max}$  (capacidade máxima de adsorção) foi ligeiramente maior sem adição de glicose, o que

pareceu indicar que, neste caso, o efeito da inibição da adsorção pela glicose foi maior do que o efeito causado pela dessorção devida à hidrólise (experimento realizado a 50°C). No entanto, a diferença entre os valores de enzima adsorvida sem glicose ou com adição de glicose (11 %) parece ser pequena demais para justificar as diferenças de conversão nas duas configurações, C1 e C2, da operação em batelada alimentada.

**Figura 5.6:** Cinética de adsorção da Cellic Ctec 2 no BAD com adição de 7,4 mg de proteína/g de bagaço na presença de altas concentrações de glicose. Condições reacionais: 25 °C, pH 4.8 e agitação 150 rpm, concentração inicial de bagaço 10 % m/v, carga enzimática correspondente de celulase de 15 FPU/g de bagaço.



## 5.4 Conclusões

As estratégias C1 e C2 de batelada alimentada proporcionaram, ao final das três alimentações, concentração distintas de sólidos para BH e BAD. Na Configuração C1, onde bagaço pré-hidrolisado (com enzimas já adsorvidas) foi alimentado, as concentrações de sólidos finais alcançadas foram de 20% (m/v) para BH e BAD, já na C2, onde bagaço seco foi adicionado, a concentração de sólidos ao final da terceira alimentação foi de aproximadamente 25% para os bagaços.

As concentrações de glicose obtidas ao final de 144 horas reacionais foram distintas entre as configurações, destacando o maior valor para o BAD na configuração C1 (136,63 ±1,59 g/L de glicose), entretanto, isso já era esperado devido a essa biomassa apresentar

menor quantidade de lignina e maior concentração de glucana inicial. Nessa configuração a conversão de celulose também ficou bem alta,  $86,33\% \pm 2,02\%$ . Contudo, na C2, onde se alcançou maior concentração de sólidos, a conversão, bem como a concentração de glicose ao final de 144 h, foram menores ( $64,82\% \pm 0,49$  e  $126,99 \text{ g/L} \pm 0,95$ , como segue).

No entanto, para o bagaço BH não houve diferença de conversão entre as configurações C1 e C2 ( $67,31\% \pm 0,22$  e  $66,18\% \pm 1,45$ ) em relação à batelada ( $70,27\% \pm 1,72$ ). Provavelmente a estrutura recalcitrante da biomassa, devido à agregação da lignina e da celulose, além da co-cristalização (Driemeier et al., 2015), fazem com que um limite de conversão seja atingido, de forma que mesmo com maior facilidade de acesso das enzimas ao substrato, não houve diferença na conversão.

Já as diferenças notadas para o BAD entre as configurações C1 e C2 provavelmente são explicadas pelas dificuldades de transferência de massa maior na configuração C2. Este material tem maior VRA do que o bagaço BH, o que aumenta a viscosidade aparente, fazendo com que a adsorção realizada antes da alimentação tenha efeito positivo (C1). Outro fator é a inibição da adsorção pela alta concentração de glicose produzida durante a hidrólise. Os dados exibidos referentes à adsorção da Cellic Ctec 2 no bagaço na presença de diferentes concentrações de glicose mostraram que a glicose pode causar um efeito de inibição na adsorção. Como na hidrólise do BAD há liberação de maiores concentrações de glicose do que na hidrólise do bagaço BH, a adsorção pode ter sido inibida na configuração C2, o que não aconteceria na configuração C1, em que a adsorção no bagaço a ser alimentado é feita em etapa separada. No entanto, os resultados mostraram que a influência da glicose na adsorção é baixa e este não deve ser o único fator responsável pelas diferenças entre as configurações C1 e C2.

Logo, no presente trabalho foi possível mostrar que altas concentrações de sólidos podem ser alcançadas em estratégias de hidrólise enzimática em modo batelada alimentada e que, ao se melhorar as condições de alimentações (tempo, quantidade e configuração do substrato a ser alimentado), é possível alcançar altas concentrações de glicose e também aumentar a conversão de celulose.

## 6 CAPÍTULO 6

# HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM DUAS ETAPAS – UMA ESTRATÉGIA DE HIDRÓLISE PARA ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS

### 6.1 Introdução

Neste contexto de hidrólise com alta concentração de substrato, observam-se estudos promissores, como o estudo de Xue et al. (2012) que utiliza uma técnica de hidrólise de lascas de madeira, sob pré-tratamento alcalino, em duas etapas distintas: um estágio de adsorção da celulase em baixa concentração de sólidos (5 % m/v) por um período de 10 minutos seguido de filtração até alcançar aproximadamente 20% de sólidos totais. Após a filtração, o segundo estágio tem início repondo a enzima perdida no sobrenadante e continuando a hidrólise enzimática em batelada. Por outro lado, o estudo de Xue et al. (2012) possui algumas limitações, como a etapa de adsorção enzimática realizada a 50°C (temperatura ótima da hidrólise) e por um tempo reduzido de operação. No entanto, um estudo que realizamos anteriormente (MACHADO et al., 2015) mostra que para o bagaço de cana-de açúcar pré-tratado (tanto por pré-tratamento que remove quanto por pré-tratamento que mantém a lignina) são necessárias cerca de 2 horas para que a adsorção das celulases atinja o equilíbrio, diferente do que ocorre com Avicel, celulose cristalina, na qual o equilíbrio de adsorção de celulases é atingido em 10 minutos. Fora isso, no Capítulo 3 deste trabalho, também é observado que o tipo de pré-tratamento empregado na biomassa e os complexos enzimáticos, Celluclast e Cellic Ctec 2, exibem perfis de adsorção diferentes, onde muda a capacidade de adsorção, bem como o tempo necessário para que o equilíbrio da adsorção seja atingido.

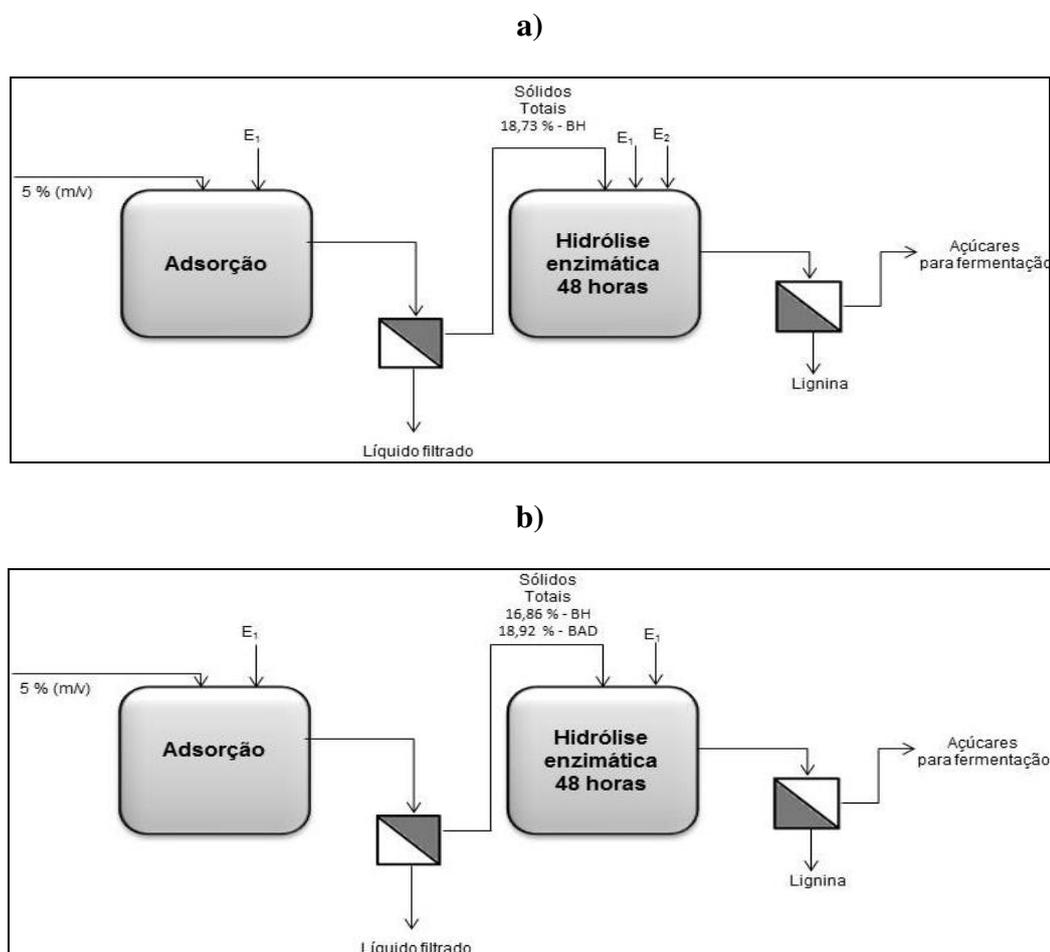
Assim, a etapa de filtração realizada por Xue et al. (2012) pode provocar uma perda significativa da enzima que ainda não foi adsorvida no substrato em 10 minutos. Dessa forma, um dos objetivos do presente capítulo foi realizar modificações no processo citado acima, de modo a obterem-se concentrações de glicose satisfatórias, bem como a conversão da celulose em glicose para a hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos para os bagaços BH e BAD, possibilitando comparar o processo quando dois tipos distintos de material (com maior teor de lignina e menor teor de lignina) são empregados na estratégia. Também foi um dos objetivos avaliar se a etapa de adsorção em baixa concentração de sólidos traz diferença significativa ao processo.

## 6.2 Metodologia experimental

### 6.2.1 Hidrólise enzimática em duas etapas – uma estratégia de hidrólise para altas concentrações de sólidos

A estratégia de hidrólise em duas etapas (adsorção/hidrólise) está esquematizada na Figura 6.1(a e b), abaixo. Essa estratégia foi desenvolvida e aplicada em dois blocos experimentais distintos. O primeiro bloco de experimentos (Figura 6.1 a) utilizou as enzimas Celluclast 1.5 L (Novozymes) e  $\beta$ -glicosidase 188 (Novozymes). Já o segundo bloco (Figura 6.1 b) visou o emprego do coquetel Cellic CTec 2 (Novozymes).

**Figura 6.1:** Esquema da hidrólise enzimática em duas etapas. E1: Celulase; E2:  $\beta$ -glicosidase, a) para Celluclast 1.5 L e b) para Cellic Ctec 2.



O primeiro bloco de ensaios fez-se da utilização de duas enzimas, então, a primeira etapa, adsorção, foi realizada com 5 % (m/v) de BH juntamente com 15 FPU/g de bagaço de celulase (E1) pelo tempo e temperatura determinados nos ensaios de adsorção da enzima celulase no bagaço (dados exibidos no capítulo 3, item 3.3.4). O bagaço foi então filtrado por

um sistema de filtração, onde se determinaram e fixaram as variáveis da filtração até a concentração de sólidos desejada. Em seguida, o sólido filtrado/espessado foi levado para a etapa de hidrólise, que ocorreu a 50 °C e pH 4,8. A quantidade de celulase (E1) adicionada foi a quantidade não adsorvida na primeira etapa e a quantidade de  $\beta$ -glicosidase (E2) adicionada foi de 25 CBU/g bagaço. Foram coletadas amostras em períodos determinados para posterior análise de açúcares liberados.

Igualmente, o segundo bloco de ensaios foi realizado para os bagaços BH e BAD com o coquetel enzimático Cellic Ctec 2. A quantidade de Cellic Ctec 2 (E1) adicionada na etapa de hidrólise foi de 3 FPU/g de bagaço (quantidade mínima de enzima encontrada através de planejamento experimental previamente realizado que proporcionou os mesmos resultados em termos de g/L de glicose e conversão de celulose (%) quando comparados com a quantidade de enzima em FPU/g de bagaço perdida no sobrenadante após a etapa de filtração – item 3.3.4) e não houve adição suplementar de  $\beta$ -glicosidase (E2), uma vez que esse coquetel já possui quantidade ótima dessa enzima. Os dados para a cinética de adsorção para essa enzima também estão dispostos no item 3.3.4 do Capítulo 3.

## **6.2.2 Cinética de adsorção**

As cinéticas de adsorção já foram realizadas e analisadas no Capítulo 3, logo, os resultados referente aos tempos de equilíbrio da adsorção da Celluclast 1.5 L e da Cellic Ctec 2, bem como as quantidades máximas de enzimas adsorvidas nos bagaços BH e BAD estão dispostos no item 3.3.4.

## **6.3 Resultados e discussão**

### **6.3.1 Hidrólise enzimática em duas etapas**

Para o primeiro bloco, onde somente o BH foi estudado, a primeira etapa, de adsorção, foi realizada a uma concentração de 5% (m/v) de bagaço (BH) na presença do tampão citrato de sódio pH 4,8 e celulase a 15 FPU/g de bagaço (10,59 mg de proteína/g de bagaço) no tempo de duas horas e temperatura de 25 °C, como determinados nos ensaios de adsorção enzimática prévios (seção 3.3.4).

Após o estágio de adsorção, o meio reacional passou por uma etapa de filtração, para separar o sólido do líquido. O meio operacional escolhido foi a centrifugação, onde a mistura foi centrifugada em frascos de 50 mL por 3 minutos sob rotação de 3290 rpm, a fim de aumentar a concentração de sólidos totais disponíveis e, assim, seguir para a posterior

hidrólise enzimática, que visava manter ou aumentar a conversão da celulose para a concentração de sólidos obtida após a etapa de centrifugação. Após esse processo (centrifugação), as amostras foram checadas em relação à umidade para saber a quantidade de sólidos totais finais, chegando a um valor médio de  $18,73\% \pm 3,10$  (m/v).

Em seguida, o sólido separado foi submetido à etapa de hidrólise, 50 °C no “Shaker” sob agitação de 150 rpm por 48 horas. A reposição de celulase (E1) na etapa de hidrólise foi 1,70 FPU/g de bagaço, quantidade de enzima perdida no sobrenadante após a etapa de filtração. Foram coletadas amostras em períodos determinados para posterior análise dos açúcares pelo HPLC. Para mostrar o diferencial desse processo foram feitas reações de hidrólise enzimática convencional em duplicata para as concentrações de 5% e 20% de sólidos (m/v) na presença das mesmas enzimas (Celluclast 1.5L Novozymes e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* Sigma-Aldrich). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1:** Conversão de glicose liberada na reação de hidrólise enzimática do BH e concentração de açúcar gerada para as diferentes concentrações de sólidos.

Esquema de hidrólise	Conversão celulose (%)	Desvio ( $\pm$ )	Concentração de glicose (g/L)	Desvio ( $\pm$ )
5% (m/v)*	45,65 a	1,34	15,49 a	3,79
20% (m/v)*	39,01 a	2,79	53,92 b	0,46
<b>Hidrólise em** duas etapas</b>	44,15 a	5,16	52,93 c, b	6,31

\*Representam hidrólises enzimáticas convencionais com concentração de sólidos de 5% e 20% (m/v) respectivamente.

\*\*Representa o esquema de hidrólise em duas etapas proposto nesse trabalho. Onde na primeira etapa ocorre o favorecimento da adsorção da enzima celulase na superfície do BH seguido de filtração, em que a concentração de sólidos passa de 5% para 18,73% (m/v); e na segunda etapa ocorre a hidrólise enzimática.

Médias com letras diferentes em uma coluna diferem significativamente entre si no nível  $p < 0,005\%$  na análise de Tukey.

Para esse bloco de experimento em duas etapas, Tabela 6.1, observa-se que o processo chega à uma conversão de 44,15% de celulose em glicose, enquanto que para a concentração de 5% (m/v), em uma reação de hidrólise enzimática convencional, a conversão de celulose em glicose foi de 45,65%. Esses dados mostram que mesmo em uma concentração de sólidos relativamente alta (18,73% m/v), foi possível manter a conversão de celulose em glicose em alta concentração de sólidos. Para a hidrólise enzimática convencional a 20% de sólidos (m/v), Tabela 6.1, observa-se que a quantidade de glicose produzida é a mesma em relação ao processo de hidrólise em duas etapas. Porém, uma queda na eficiência da conversão é notada

para o processo convencional. Em resumo, quando utiliza-se o BH na presença das enzimas Celluclast 1.5L (Novozymes) e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozymes-Sigma-Aldrich) esse esquema de hidrólise não apresentou melhores resultados em termos de concentrações de açúcares e eficiência da conversão da hidrólise enzimática ao realizar o processo para altas cargas de sólidos.

Ao estudar essa mesma estratégia de hidrólise enzimática com outro complexo enzimático, a Cellic Ctec 2, algumas mudanças são percebidas. No estágio de adsorção, por exemplo, o tempo necessário para atingir o equilíbrio da adsorção fica igual ao do complexo enzimático Celluclast (2 horas) quando o BH é usado, entretanto, quando o BAD foi analisado, o tempo para atingir o equilíbrio da adsorção aumentou para 4 horas reacionais. Além disso, a quantidade de enzima adsorvida foi diferente. Quando utiliza-se o complexo enzimático Cellic Ctec 2, observa-se que a adsorção da enzima é relativamente menor quando comparada com o complexo Celluclast 1.5 L (resultados detalhados no item 3.3.4). Após a etapa de filtração, realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, as concentrações de sólidos totais alcançadas para os bagaços foram de  $16,86 \pm 0,35 \%$  e  $18,92 \pm 0,12 \%$  para BH e BAD, respectivamente. Os resultados obtidos ao final do processo (tempo adsorção + tempo hidrólise enzimática de 48 horas) apresentam-se na Tabela 6.2, que exhibe os dados para a liberação de glicose e a conversão de celulose dos bagaços BH e BAD, bem como os resultados para as hidrólises convencionais (16,86% e 18,92% de sólidos m/v), as quais foram realizadas a fim de comparar com aos resultados da estratégia proposta desse capítulo.

**Tabela 6.2:** Conversão de celulose na reação de hidrólise enzimática do BH e do BAD e concentração de açúcares gerados para as diferentes concentrações de sólidos usando a Cellic Ctec2. Hidrólises convencionais realizadas por 48 horas.

<b>Esquema de hidrólise</b>	<b>Concentração de glicose (g/L)</b>	<b>Desvio (<math>\pm</math>)</b>	<b>Conversão celulose (%)</b>	<b>Desvio (<math>\pm</math>)</b>
<b>5% BH</b>	20,75	0,80	61,17	2,36
<b>16,86% BH</b>	54,19	0,17	47,37	0,15
<b>Hidrólise duas etapas BH</b>	49,68	1,75	43,43	2,65
<b>5% BAD</b>	32,94	2,26	83,26	5,72
<b>18,92% BAD</b>	69,41	2,48	46,36	1,66
<b>Hidrólise duas etapas BAD</b>	77,86	0,42	52,01	0,28

Apesar de apresentarem concentrações de glicose semelhantes no tempo de 48h (exceto a hidrólise convencional a 5% de sólidos m/v), percebe-se que todas as estratégias de hidrólises possuíram resultados diferenciados. A hidrólise enzimática em duas etapas apresentou resultados satisfatórios para o BAD em relação ao aumento da glicose no meio reacional bem como em relação à conversão da celulose em glicose quando comparada com a hidrólise convencional para a mesma concentração de sólidos (18,92% m/v). Essa estratégia também não foi capaz de manter a conversão elevada, assim como a observada para a hidrólise enzimática em baixa concentração de sólidos (5% m/v). Apesar disso, houve um aumento de conversão se comparar o ensaio em 18,92 % de BAD utilizando hidrólise comum e em duas etapas. Uma hipótese é que, quando a Cellic CTec 2 é usada, boa parte das enzimas acessórias importantes são perdidas na etapa de filtração, já que estas não são adsorvidas ao substrato. A perda destas enzimas, principalmente a de  $\beta$ -glicosidase, pode ter diminuído a eficiência do coquetel enzimático.

O ensaio em duas etapas para o BH apresentou conversão em glicose de  $43,43 \pm 2,65$  % em 48 horas, já o ensaio para hidrólise convencional a 16,86% de sólidos (m/v) apresentou conversão em glicose de  $47,37 \pm 0,15$  % em 48 horas de reação. Nota-se que os valores não são distantes, mas, ainda assim, a estratégia de hidrólise em duas etapas com o complexo

Cellic Ctec 2 não foi satisfatória. Além disso, esse método também não foi capaz de alcançar a mesma conversão de celulose em glicose que o ensaio em etapa única a 5% (m/v) de sólidos alcançou, como mostrado na Tabela 6.2 acima.

Em relação à conversão de celulose em glicose para ambos os bagaços, BH e BAD, os resultados estão de acordo com os resultados obtidos quando os complexos Celluclast 1.5L (Novozymes) e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozymes - Sigma-Aldrich) foram usados, onde utilizou-se bagaço de cana pré-tratado pelo método hidrotérmico (BH). Nessa ocasião, a conversão em glicose foi semelhante para ambas as hidrólises, em duas etapas e a 5% de sólidos (m/v), como disposto na Tabela 6.1.

A diferença quantificada para esse processo em duas etapas na presença de complexos enzimáticos distintos pode estar relacionada ao fato de que o complexo Cellic Ctec 2 é um coquetel multi enzima, e é provável que uma quantidade significativa de  $\beta$ -glicosidase tenha sido perdida durante o processo de filtração/separação. Trabalhos na literatura como de Machado et al. (2015) e Qi et al. (2011) relataram que as celulasas apresentam uma rápida adsorção inicial seguidas de adsorção crescente contínua e, em contrapartida, as enzimas  $\beta$ -glicosidasas apresentam uma adsorção mais baixa ou inexistente em substratos pré-tratados como os bagaços BH e BAD. Sendo assim, a conversão poderia ser melhorada pela adição de outras enzimas complementares como as xilanases e  $\beta$ -glicosidasas na unidade de hidrólise para minimizar a perda que ocorre no passo de filtração. Além disso, este processo pode ser otimizado ajustando a proporção da celulase adicionada (quantidade superior a 3FPU/g de bagaço), pois foi relatado que, após o líquido ser filtrado, 80% da atividade da celulase ainda permanece no substrato (XUE et al., 2012a).

## 6.4 Conclusões

A estratégia proposta por Xue et al. (2012) e devidamente modificada para as biomassas e complexos enzimáticos deste trabalho mostraram dois resultados próximos. Ao utilizar a enzima Celluclast 1.5 L juntamente com o BH foi observado não houve diferença significativa na concentração de glicose e na conversão de celulose ao se comparar a estratégia convencional a 20% (m/v) com a proposta neste capítulo. Em resumo, quando utiliza-se o BH na presença das enzimas Celluclast 1.5L (Novozymes) e  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozymes -Sigma-Aldrich) esse esquema de hidrólise não possibilita obter altas concentrações de açúcares sem diminuir a eficiência da conversão da hidrólise enzimática ao realizar o processo com altas cargas de sólidos, não barateando os custos com reagentes e em

operações de “downstream”, uma vez que as soluções não serão mais concentradas em álcool após a fermentação dos açúcares.

A mesma estratégia modificada de Xue et al. (2012) proposta neste Capítulo 6 também não se mostrou adequada quando a enzima Cellic Ctec2 foi utilizada, principalmente quando o bagaço foi o BH. Quando o bagaço foi o BAD houve uma pequena melhora no desempenho. Assim, sendo esta enzima muito mais provável de ser usada em um processo industrial, a etapa de adsorção inicial não se mostra uma estratégia promissora, ainda mais quando for levada em conta o custo adicional da operação de separação sólido/líquido necessária. Obviamente muitas variáveis devem ser levadas em consideração, principalmente o complexo enzimático e o tipo de pré-tratamento empregado no bagaço.

## 7 CAPÍTULO 7

# HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM TRÊS ETAPAS – UMA ESTRATÉGIA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA ALTA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS

### 7.1 Introdução

Na tentativa de melhorar a estratégia de hidrólise enzimática em duas etapas, um terceiro estágio foi implementado à estratégia (Capítulo 6) e então, uma nova proposta de hidrólise enzimática foi projetada: “hidrólise enzimática em três etapas”.

Os resultados dos capítulos anteriores já mostraram que as produtividades volumétricas caem muito rapidamente com o aumento do tempo reacional. Por isso, no presente capítulo, a ideia foi interromper a hidrólise realizada em duas etapas (Capítulo 6) em tempos mais curtos, fazendo uma separação sólido/líquido e permitindo que a fase sólida, que ocupa um volume reacional bem menor, continue sendo hidrolisada. Ao final, os açúcares obtidos na hidrólise da fase sólida podem ser misturados aos açúcares da fase líquida previamente separada. O esquema de hidrólise em três etapas foi realizado para os bagaços BH e BAD.

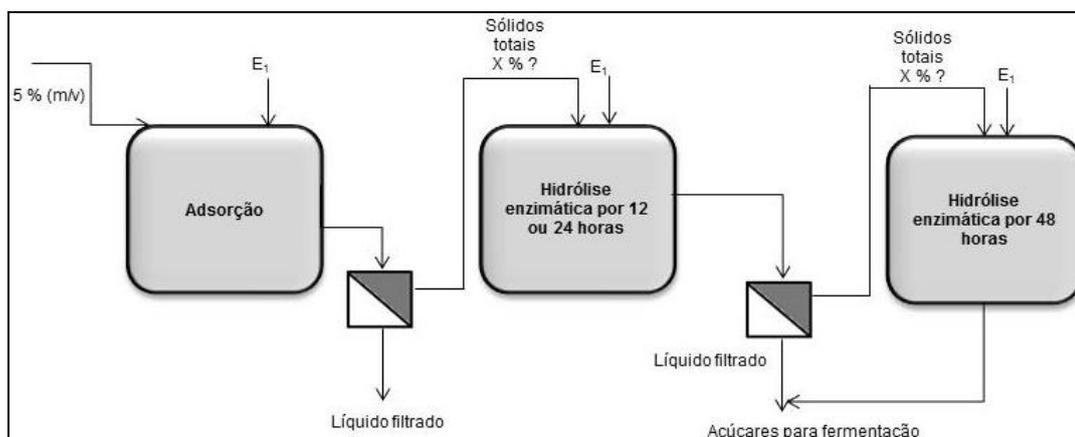
### 7.2 Metodologia experimental

#### 7.2.1 Hidrólise enzimática em três estágios

Este esquema de hidrólise é uma continuação do esquema anterior, Capítulo 6, onde os tempos reacionais de hidrólises (2º estágio) foram parados a cada 12 ou de 24 horas para uma nova separação sólido/líquido por centrifugação. Os sólidos separados foram submetidos a uma nova etapa de hidrólise, como mostrado na Figura 7.1. Nota-se que são totalizados três estágios distintos: 1) primeira etapa: adsorção, 2) segunda etapa: primeira hidrólise enzimática por 12 horas ou por 24 horas e 3) terceira etapa: segunda hidrólise enzimática por 48 horas.

No segundo estágio, primeira reação de hidrólise enzimática, a reação é parada a cada 12 ou 24 horas. Cada um dos sólidos separados recebeu carga enzimática adicional de celulase (3FPU/g de bagaço) e, então, foram incubados em Erlenmeyers no shaker a 50 °C e 150 rpm para a terceira etapa (segunda rodada de hidrólise). Foram retirados pontos amostrais de 12h, 24h e 48h, os quais tiveram a concentração de açúcares analisada pelo HPLC. Esses ensaios de hidrólise foram desenvolvidos somente com o coquetel enzimático Cellic Ctec 2 e com os bagaços BH e BAD.

**Figura 7.1:** Representação esquemática da hidrólise em três etapas<sup>1</sup>



## 7.2.2 Cinética de adsorção

As cinéticas de adsorção já foram realizadas e analisadas em capítulos anteriores, logo, os resultados referentes aos tempos de equilíbrio da adsorção da Cellic Ctec 2, bem como a quantidade máxima de enzima adsorvida nos bagaços BH e BAD estão dispostos no item 3.3.4.

## 7.3 Resultados e discussão

### 7.3.1 Hidrólise enzimática em três etapas

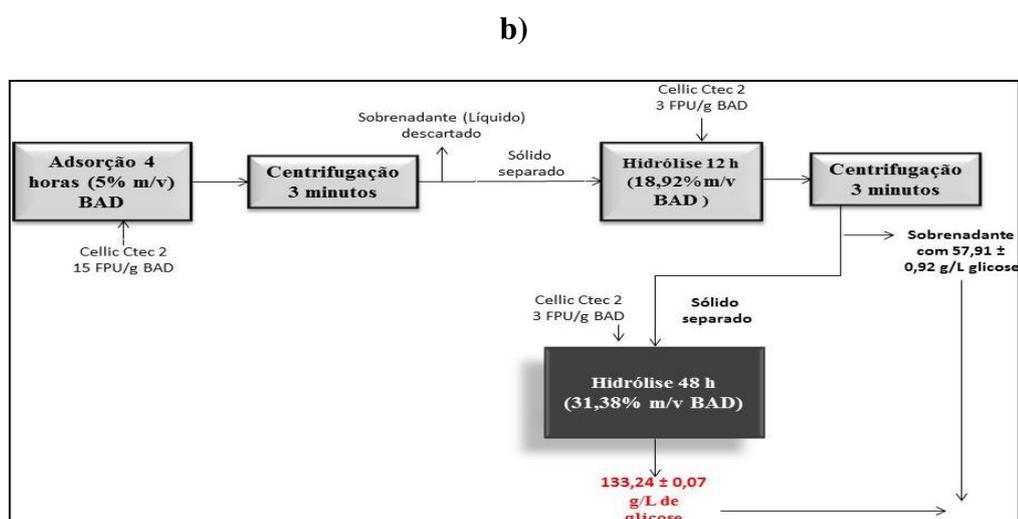
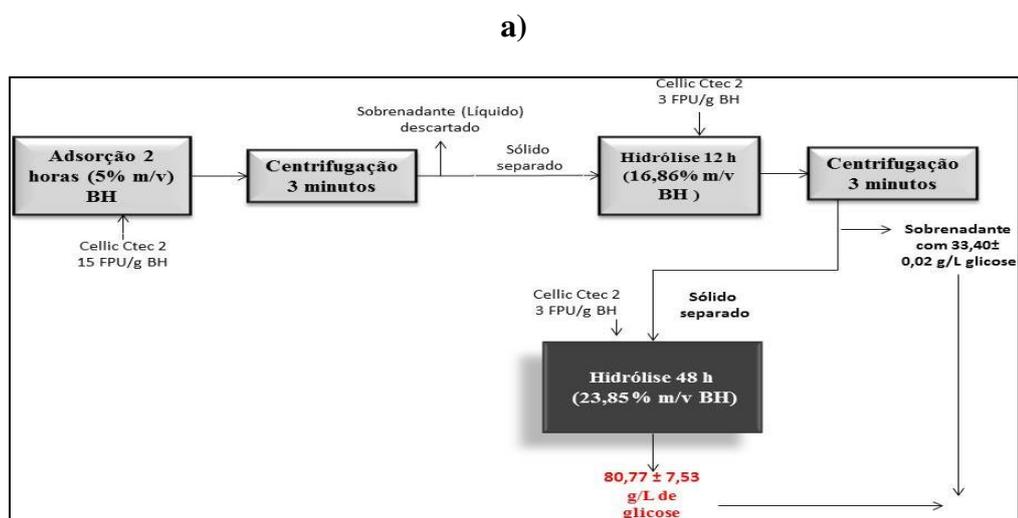
A hidrólise em três etapas foi realizada com o intuito de melhorar o processo da hidrólise enzimática em duas etapas para altas concentrações de sólidos. Para isso, o segundo estágio desse processo, a hidrólise enzimática, foi analisado em relação à quantidade de açúcares liberados em função do tempo, e então, derivadas da concentração de glicose em relação ao tempo ( $d[G]/dt$ ) foram estudadas a fim de se determinar a velocidade da hidrólise enzimática em cada tempo. Ao observar os gráficos dessas derivadas para cada hidrólise (dados não mostrados) foi possível perceber que há grande decaimento de sua velocidade no tempo reacional de 12 horas (cerca de metade do valor de  $d[G]/dt$  em relação ao tempo de 10 horas) e diminuição ainda maior no tempo de 24 horas. É claro que períodos maiores que estes apresentam valores mais reduzidos de  $d[G]/dt$ . No entanto, acredita-se que para processos em escalas ampliadas tempos reacionais reduzidos são os mais favoráveis

<sup>1</sup> A etapa adsorptiva indicada foi realizada a 25°C sob agitação de 150 rpm e na presença de tampão citrato de sódio 0,05M no pH 4,8. Todas as hidrólises ocorreram a 50°C e agitação de 150 rpm.

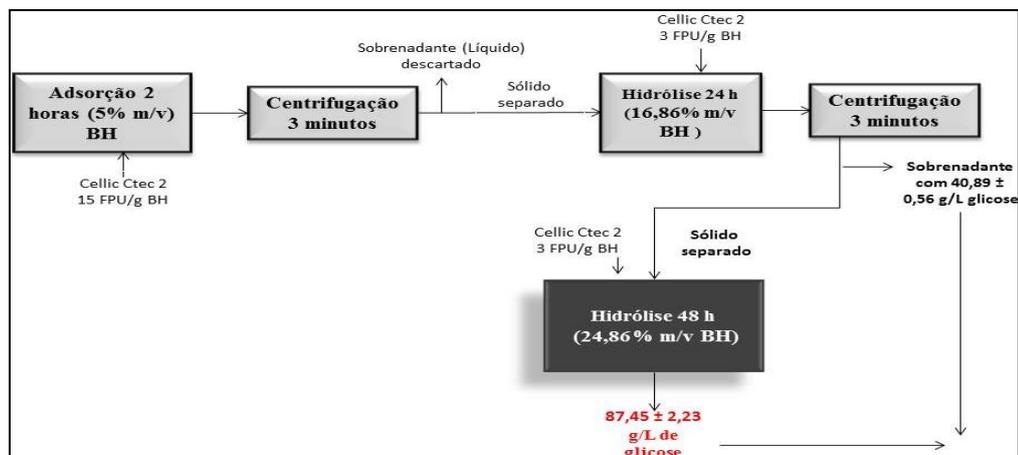
economicamente e, portanto, os tempos de 12 horas e 24 horas foram os escolhidos como os sujeitos à nova separação de sólidos e continuação da hidrólise em uma terceira etapa.

Diagramas foram criados a fim de ilustrar a metodologia geral do processo de hidrólise adotado neste Capítulo (Figura 7.2). Eles estão divididos em função do tempo reacional onde se parou a primeira hidrólise enzimática (segunda etapa do processo). Além disso, os estágios foram desenvolvidos de acordo com as necessidades estabelecidas para cada bagaço (tempo para adsorção onde se atingiu o equilíbrio da adsorção máxima da enzima). Nesses diagramas encontram-se todas as variáveis necessárias estudadas para o desenvolvimento da estratégia.

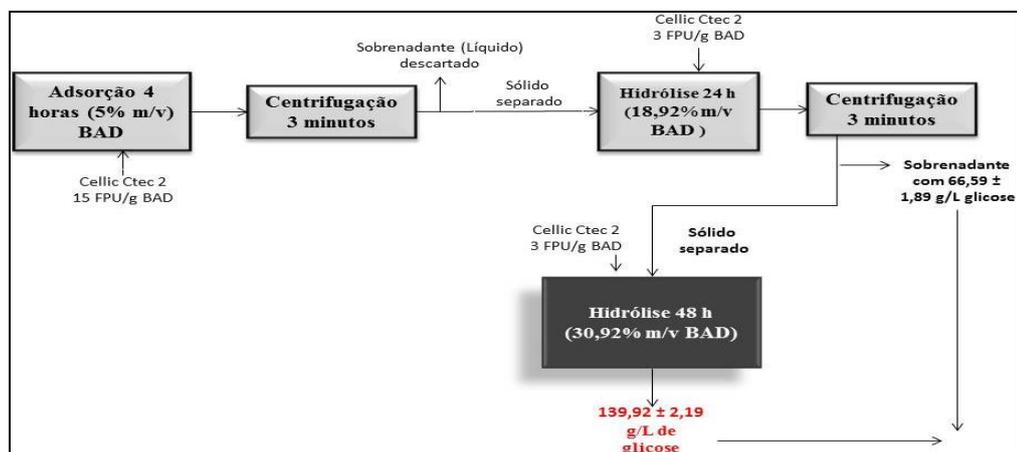
**Figura 7.2:** Representação esquemática da hidrólise em três etapas, a) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 12 horas , bagaço BH, b) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 12 horas , bagaço BAD, c) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 24 horas , bagaço BH, d) Primeira hidrólise (2ª etapa) com 24 horas , bagaço BAD.



c)



d)



A Tabela 7.1 mostra as concentrações de glicose obtidas na segunda hidrólise (3ª etapa) para as quatro configurações da Figura 7.2 para os tempos de 24 e 48h.

**Tabela 7.1:** Resultados da segunda hidrólise (3ª etapa) nas quatro configurações da Figura 7.2 nos tempos de 24 e 48h.

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)			
	Ensaio em que houve centrifugação após 12h de hidrólise anterior		Ensaio em que houve centrifugação após 24h de hidrólise anterior	
	BH (Fig. 7.2a)	BAD (Fig. 7.2b)	BH (Fig. 7.2c)	BAD (Fig. 7.2d)
24	70,10 ± 0,87	112,02 ± 0,85	76,10 ± 1,33	116,25 ± 0,31
48	80,77 ± 7,55 <b>a</b>	133,24 ± 0,07 <b>b</b>	87,45 ± 2,23 <b>a</b>	139,92 ± 2,19 <b>b</b>

Médias com letras diferentes em uma linha diferem significativamente entre si no nível  $p < 0,05\%$  na análise de Tukey.

Notam-se valores elevados de concentração de glicose ao final das reações em ambos os meios reacionais. Observa-se que ao final do processo (2ª hidrólise - terceira etapa (48h)) a concentração de glicose liberada foi de  $80,77 \pm 7,55$  g/L para BH e de  $133,24 \pm 0,07$  g/L para BAD quando a segunda etapa (1ª hidrólise) foi realizada por 12 h (Figuras 7.2 a e 7.2 b). Já para o processo onde a primeira hidrólise se deu por 24 horas (7.2 c e 7.2 d) a concentração de glicose alcançada foi um pouco maior com  $87,45 \pm 2,23$  g/L e  $139,92 \pm 2,19$  g/L para BH e BAD, respectivamente. Essa pequena diferença encontrada entre os processos foi analisada pelo Teste de Tukey a 95% de confiança, e as médias para a concentração de glicose não foram estatisticamente diferentes quando a hidrólise da segunda etapa foi realizada por 12 ou 24h. Possivelmente os sólidos separados após 12 horas de hidrólise enzimática (1ª hidrólise – 2ª etapa), por terem sido hidrolisados por menos tempo, continham uma quantidade maior de glucana para ser hidrolisada, já os sólidos recuperados do esquema onde a primeira hidrólise fora parada em 24 horas continham na lama mais açúcares, pois a lama obtida através do processo de separação não passou por nenhuma lavagem para remoção dos compostos liberados. Ou ainda, após o processo de separação, a concentração alcançada de sólidos totais para cada um dos bagaços não diferiu tanto como observado na Figura 7.2 (a, b, c e d).

Ao analisar os resultados de concentração de glicose na Figura 7.2 a, vemos que, quando a primeira hidrólise foi realizada por 12h para o bagaço BH, a concentração de glicose obtida no sobrenadante foi de  $33,40 \pm 0,02$  g/L. Esta concentração pode ser comparada com a obtida no Capítulo 6, no qual a mesma hidrólise foi realizada por 48h, de  $49,68 \pm 1,75$  g/L e

vemos que a produtividade volumétrica é muito maior ( $2,78 \pm 0,01$  g/Lh e  $1,04 \pm 0,04$  g/Lh, respectivamente). Por outro lado, o sólido submetido à segunda hidrólise por 48 h resultou em uma concentração de glicose de  $80,77 \pm 7,53$  g/L. Caso a segunda hidrólise fosse realizada por menos tempo (24h), a concentração obtida seria de  $70,17 \pm 0,87$  g/L. Estas duas correntes de glicose poderiam ser então misturadas e enviadas à fermentação.

Quando a primeira hidrólise foi realizada por 12h para o bagaço BAD (Figura 2.b), obteve-se  $57,91 \pm 0,92$  g/L de glicose, concentração que pode ser comparada com a obtida na mesma hidrólise por 48h realizada no capítulo 6, que foi de  $77,86 \pm 0,42$  g/L. A segunda hidrólise dos sólidos remanescentes vindos da primeira hidrólise levou a uma concentração de  $112,02 \pm 0,85$  g/L de glicose em 24h e  $133,24 \pm 0,07$  g/L em 48h.

Quando a primeira hidrólise foi realizada por 24h para o bagaço BH (Figura 7.2c), obteve-se  $40,89 \pm 0,56$  g/L de glicose, que, quando comparada com o resultado da mesma hidrólise realizada no Capítulo 6 por 48h, de  $49,68 \pm 1,75$  g/L, permite concluir que não se justifica dobrar o tempo de reação. A segunda hidrólise dos sólidos remanescentes levou a uma concentração de glicose de  $76,10 \pm 1,33$  g/L em 24h e  $87,45 \pm 2,23$  g/L em 48h.

Para o bagaço BAD, realizar a primeira hidrólise por 24h resultou em  $66,59 \pm 1,89$  g/L (no Capítulo 6 obteve-se  $77,86 \pm 0,42$  g/L em 48h). A segunda hidrólise resultou em  $116,25 \pm 0,31$  g/L de glicose em 24h e  $139,92 \pm 2,19$  g/L em 48h.

Pensando numa aplicação em escala de planta piloto ou até mesmo escala industrial a realização e desenvolvimento desses métodos propostos não parecem ser interessantes além da etapa de adsorção ter se mostrado indispensável para a estratégia. Caso as correntes de açúcares vindas da primeira e da segunda hidrólises tivessem o mesmo volume reacional, essa estratégia em três etapas possibilitaria para as configurações com hidrólise anterior de 12 horas (Figura 7.2 a e b) até  $57,08$  g/L de glicose para o BH e  $95,57$  g/L de glicose para o BAD num tempo total de 62 e 64 horas, respectivamente. Quando o tempo reacional aumentou em mais 12 horas (hidrólise anterior por 24 horas), Figura 7.2 (c e d), as concentrações de glicose em g/L aumentaram somente 7,09 para BH e 7,68 para o BAD. Portanto, conclui-se que parar a primeira hidrólise em 12 horas seria a melhor estratégia, já que o tempo total é menor.

## 7.4 Conclusões

Com a pesquisa para o desenvolvimento de uma hidrólise enzimática em três estágios foi possível obter altas concentrações de sólidos após as etapas de separação sólido-liquido e, conseqüentemente, altas concentrações de glicose, mesmo quando a primeira hidrólise enzimática se dava por apenas 12 horas de reação. Ao interromper a primeira hidrólise em

menos tempo, aumenta-se a produtividade volumétrica e a realização de uma nova hidrólise com os sólidos remanescentes permite a obtenção de uma corrente com alta concentração de açúcar que pode ser misturada à corrente líquida da primeira hidrólise antes desta ser encaminhada à fermentação.

Cabe ressaltar que, de acordo com resultados obtidos no Capítulo 6, é sabido que a etapa de adsorção realizada antes da primeira hidrólise enzimática não favoreceu a estratégia quando o complexo enzimático utilizado foi a Cellic CTec 2, especialmente quando o bagaço considerado foi o BH e, assim, a primeira etapa, de adsorção, poderia não ser realizada, diminuindo o tempo e custos do processo. Mesmo assim, foi possível notar que as diversas operações unitárias inseridas no processo e a diminuição consecutiva do volume reacional em cada estágio (devido às separações sólido/líquido) levam a descartar essa estratégia, principalmente devido ao aumento dos custos relacionados.

## 8 CAPÍTULO 8

### HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM RECICLOS

#### 8.1 Introdução

Ainda pensando nos gargalos existentes no processo de hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos, outras configurações que incluem alguma forma de reciclagem de sólidos ou a remoção de líquido durante a reação foram revistos por Andric et al. (2010 a, b) e Xue et al. (2012 b). No caso exposto por Xue et al. (2012 b), os autores propuseram um esquema de ciclo do hidrolisado como forma não só de facilitar o acesso das enzimas ao substrato, mas também reciclar a parte das enzimas que ficam livres no sobrenadante e ou que desorvem do substrato após a hidrólise. No esquema proposto, a hidrólise ocorre por 48h, seguida de uma separação sólido/líquido, com a corrente líquida sendo usada para diluir uma nova carga de biomassa.

No presente Capítulo o processo de hidrólise enzimática proposto é baseado na estratégia de Xue et al. (2012 b) que foi modificada e adaptada para as biomassas utilizadas, bem como para o coquetel enzimático empregado. Foram realizados três ciclos, totalizando quatro hidrólises consecutivas.

Sabe-se que entre as causas do efeito de sólidos estão a dificuldade de agitação devido à alta viscosidade da mistura, assim como a inibição por produto. Também é conhecido o fato de que a taxa de hidrólise diminuiu com o tempo de hidrólise devido à própria estrutura do substrato, já que a fração de celulose menos recalcitrante é hidrolisada nas primeiras horas, sobrando a fração de mais difícil hidrólise. Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar se é possível aumentar a concentração de açúcares com a adição de substrato fresco ao hidrolisado de estágios anteriores, cujos sólidos não hidrolisados foram previamente separados. A adição de substrato fresco ao longo do tempo já foi avaliada no processo em batelada alimentada, mas neste caso os sólidos não hidrolisados continuavam no reator, podendo dificultar o acesso das enzimas à biomassa e aumentando o gasto energético para agitação, o que se deseja evitar com o processo proposto neste capítulo, onde a concentração de sólidos final alcançada foi maior do que para as estratégias anteriores, de 30% (m/v).

#### 8.2 Metodologia experimental

##### 8.2.1 Materiais

As biomassas pré-tratadas utilizadas foram o BH e o BAD.

O coquetel enzimático usado nas estratégias de reciclo foi a Cellic CTec 2.

### 8.2.2 Descrição dos processos de hidrólise enzimática com reciclo

No presente estudo, a hidrólise enzimática foi realizada numa configuração de reciclagem. Foram realizados três processos alternativos, referidos como R 12, R 24 ou processo R 48 (Tabela 8.1). A denominação é de acordo com os tempos reacionais estabelecidos para cada ciclo de hidrólise enzimática.

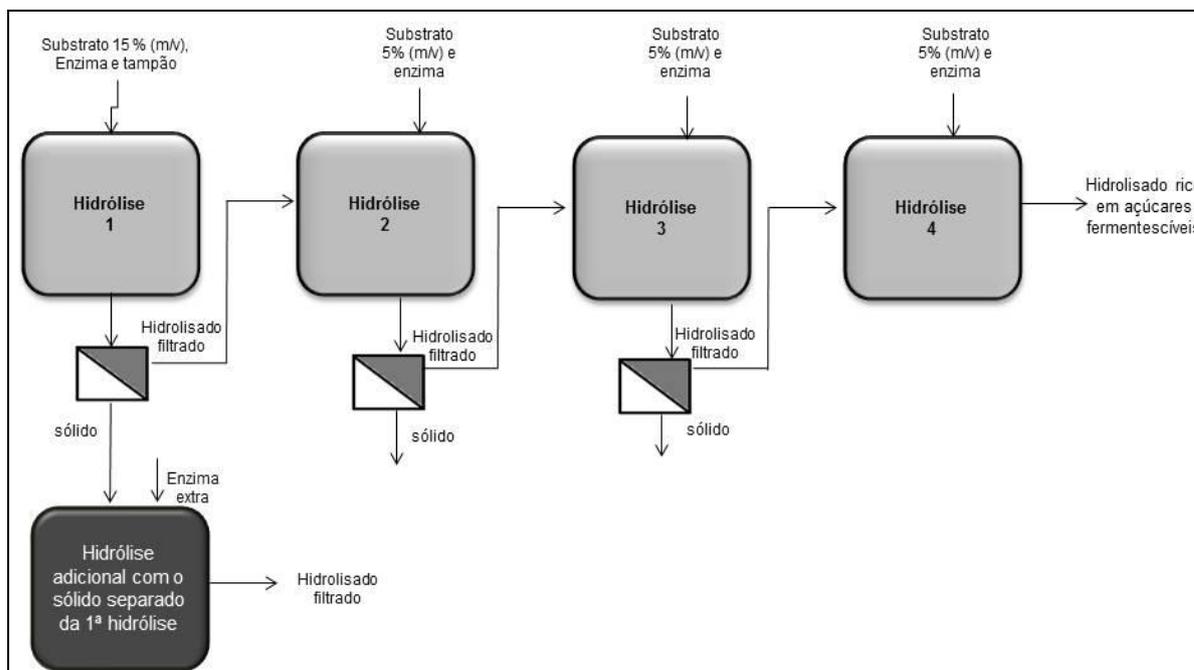
**Tabela 8.1:** Condições experimentais para realização dos processos de hidrólise com reciclo.

<b>Cenário experimental</b>	<b>Tempo reacional para cada ciclo de hidrólise enzimática (horas)</b>	<b>Tempo reacional total do processo de reciclo (horas)</b>
<b>R 12</b>	12	48
<b>R 24</b>	24	96
<b>R 48</b>	48	192

Os experimentos (Figura 8.1) foram iniciados pela hidrólise enzimática 1, hidrólise convencional, onde adicionou-se 15% de sólidos (m/v) juntamente com celulase na concentração de 15 FPU/g de bagaço seco e tampão citrato de sódio pH 4,8 com incubação por 12, 24 ou 48 h. Após o tempo reacional estabelecido uma separação sólido/líquido foi realizada, o sólido foi transferido para um novo vaso reacional com adição de somente uma quantidade pré-estabelecida de enzima celulase (3 FPU/g de bagaço), assim, esse sólido já contendo enzimas adsorvidas e umidade de aproximadamente 80% foi novamente hidrolisado por até 144 horas. Para simular a separação sólido/líquido no laboratório, uma centrífuga (NT 810 (Novatecnica, Brasil) foi usada nesse estudo. Consecutivamente com a hidrólise do sólido reciclado, o líquido separado após filtragem foi reciclado (hidrolisado rico em açúcares) para realizar um novo ciclo de hidrólise (hidrólise 2). Bagaço fresco foi adicionado na proporção de 5% (m/v) e enzima celulase na proporção de 15 FPU/g de bagaço. Esse ciclo, de separação sólido/líquido, se repete mais duas vezes (hidrólises 3 e 4), entretanto, somente a fase líquida foi reciclada para novas hidrólises, todas realizadas a 5% (m/v). Cabe lembrar que de acordo com o processo de hidrólise (R 12, R 24 ou R 48), os ciclos eram realizados por 12, 24 ou 48 horas reacionais.

O resultado de adsorção das enzimas Cellic Ctec 2 obtido no item 3.3.4, que mostra que 27% da massa total de enzima adicionada não é adsorvida indica que o reciclo de hidrolisado pode permitir o reaproveitamento das enzimas em solução, entretanto, os experimentos foram conduzidos adicionando carga extra de enzima em cada novo ciclo de hidrólise.

**Figura 8.1:** Esquema da hidrólise enzimática em reciclo.



\*Todas as hidrólises ocorreram a 50°C e agitação de 150 rpm e pH 4,8.

\* R 12 - Hidrólises 1, 2, 3 e 4 a cada 12 horas = tempo total reação 48 horas ou,

\* R 24 - Hidrólises 1, 2, 3 e 4 a cada 24 horas = tempo total de 96 horas de reação ou,

\* R 48 - Hidrólises 1, 2, 3 e 4 a cada 48 horas = tempo total de 192 horas de reação.

### 8.3 Resultados e discussão

Primeiro partiu-se de uma concentração de sólidos relativamente alta (15% m/v), sendo a hidrólise realizada em shaker por 12 horas, 24 horas ou 48 horas (hidrólise enzimática - estágio 1). Em seguida, todo o volume reacional foi centrifugado por 10 minutos em uma rotação de 3000 rpm. A fase líquida foi então separada da fase sólida. Duas reações de hidrólises ocorreram a partir dessa separação, uma com o sobrenadante já rico em açúcares (hidrólise 2) e outra com o sólido que já continha enzimas adsorvidas. Para a Hidrólise 2, hidrólise em que se usou o líquido reciclado, 5 % (m/v) de bagaço seco foi adicionado ao Erlenmeyer juntamente com todo o volume da fase líquida obtido da etapa anterior (centrifugação). Esse processo de separar as fases líquida e sólida foi repetido mais duas vezes (hidrólise 3 e hidrólise 4), onde as hidrólises foram paradas a cada 12 horas, 24 horas ou 48 horas.

O sólido separado a partir da hidrólise 1 foi hidrolisado somente com adição de 3 FPU/g bagaço de celulase, aqui, um reator de menor volume pode ser usado para a hidrólise da fase sólida.

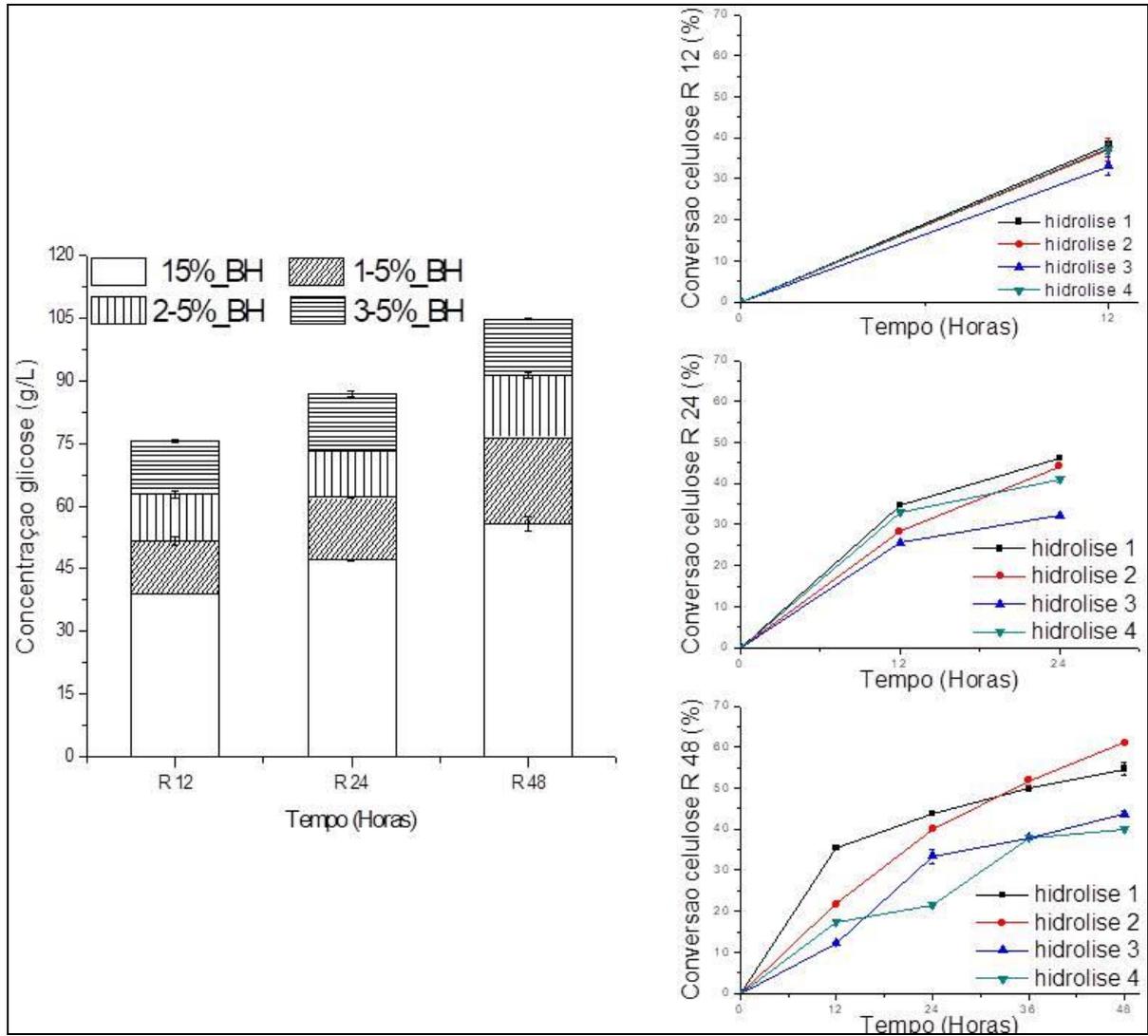
A Figura 8.2 (a e b) mostra o efeito dos processos de ciclos estudados (R 12, R 24 ou R 48) sob o perfil de liberação de glicose durante as hidrólises enzimáticas do BH e do BAD, nessa ordem. Observa-se que o tempo de reação dependendo do processo pode chegar até 192 horas (4 ciclos de 48 horas – R 48), um tempo bastante extenso se tratando de hidrólise enzimática. Além disso, a taxa de liberação de glicose diminui após a primeira hidrólise (realizada com 15% m/v sólidos) de cada processo, e após cada ciclo essa taxa cai mais ainda em proporção com o aumento do tempo reacional como o observado no R 48.

A concentração de sólidos total alcançada ao final dos 4 ciclos de hidrólise enzimática é de 30% (m/v) uma concentração maior do que as concentrações obtidas para os experimentos de hidrólise enzimática em batelada alimentada (20% m/v) e ainda assim, verifica-se que as concentrações de glicose obtidas não são maiores.

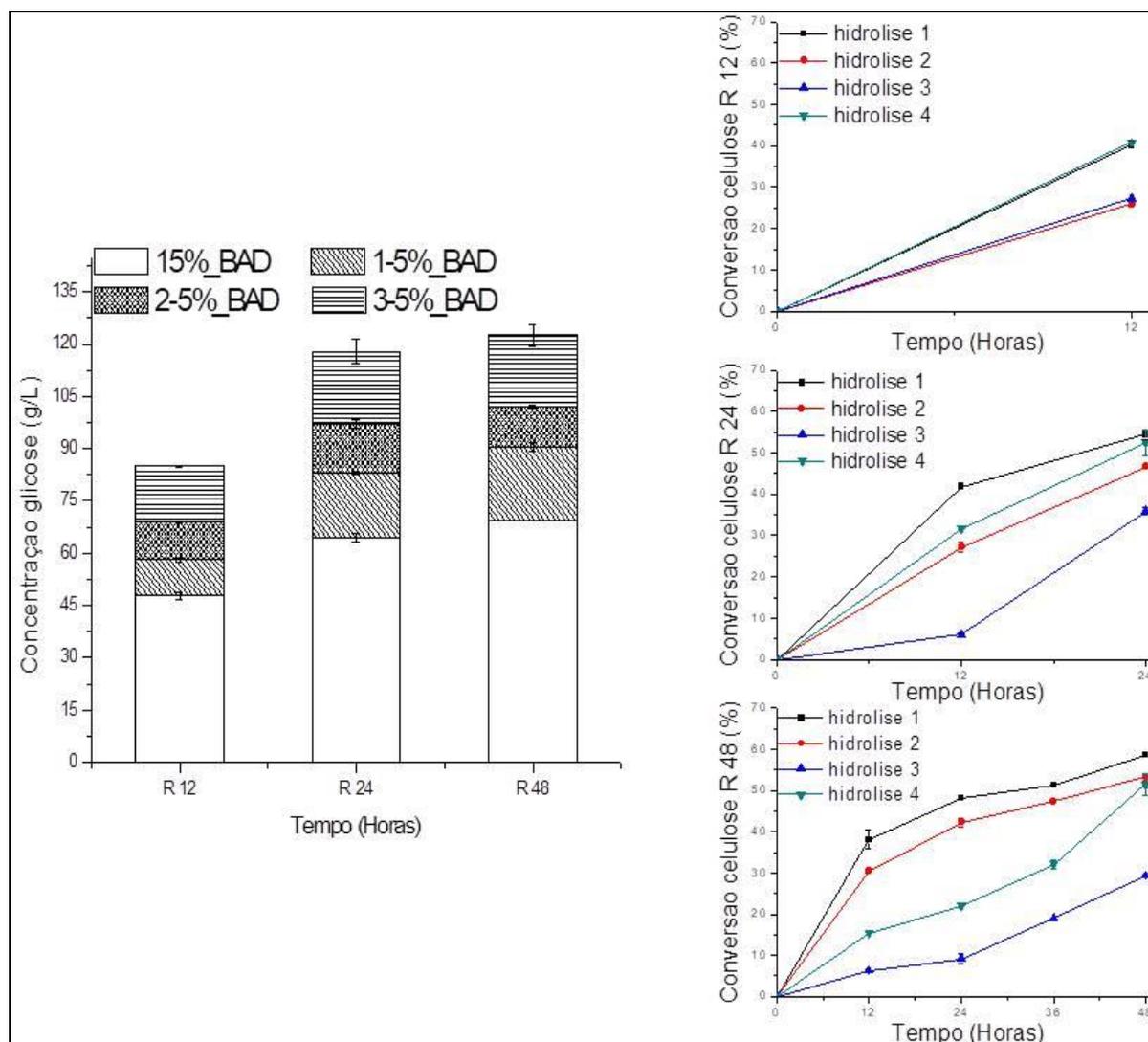
Na Figura 8.2 (a) é possível notar que quando realizamos o ciclo de hidrolisado, a inibição aparece apenas no último estágio. No caso em que cada hidrólise é realizada por 12h, a conversão permanece a mesma em todas as hidrólises, caindo apenas na quarta hidrólise, quando a concentração de glicose é mais alta. No capítulo 4, pode-se notar que a conversão em 12h de hidrólise em batelada é praticamente a mesma para 5 e 15% de sólidos, de  $40,13 \pm 1,12$  e  $40,43 \pm 0,90$  % respectivamente, então estes resultados são esperados.

**Figura 8.2:** Perfil da liberação de glicose e conversão celulose em cada ciclo dos processos R 12, R 24 e R 48, a) referente ao BH e b) referente ao BAD.

a)



b)



Quando cada etapa de hidrólise é realizada por 24h para o BH, o efeito da inibição é mais forte e a conversão da 2ª hidrólise (5% m/v) já é menor do que a da primeira hidrólise (15% m/v), como pode ser visto na Figura 8.2 (a). As conversões para a terceira e quarta hidrólise a 5% foram de  $32,25 \pm 0,04 \%$  e  $41,02 \pm 0,69 \%$ , respectivamente. Este maior valor de conversão na quarta hidrólise provavelmente foi devido à maior quantidade de enzimas, já que, além da carga enzimática adicionada a cada adição de substrato, as enzimas não adsorvidas no sólido da hidrólise anterior eram recicladas para a próxima etapa juntamente com a fração líquida. O maior tempo de hidrólise em cada estágio rendeu em maiores concentrações de glicose, aumentando a inibição por produto, de forma que na quarta hidrólise a conversão obtida foi basicamente a mesma de R12 ( $37,37 \pm 1,21\%$ ), embora a hidrólise tenha sido realizada pelo dobro do tempo.

Ainda analisando os dados para o BH (Figura 8.2 a) quando os ciclos foram realizados a cada 48h, observa-se também o efeito da inibição. Entretanto, como o processo R48 leva tempos bem maiores de hidrólises, as conversões ao final dos ciclos ficam maiores. Mas, ainda assim, a partir da segunda hidrólise são menores do que a conversão de uma hidrólise em batelada a 5% (m/v) de sólidos em 48h, que é de  $61,18 \pm 2,37$  %. Nota-se que a conversão da hidrólise 3 é levemente maior do que a hidrólise 4. Novamente a probabilidade é que a maior quantidade de enzima presente no hidrolisado devido ao reciclo da fração de enzima em solução dos estágios anteriores aumentou a conversão, mesmo na presença de maior concentração de produto.

Fazendo a mesma análise para a Figura 8.2 (b), BAD na configuração R12, nota-se que ao final da primeira hidrólise a concentração de glicose era de  $\sim 50$  g/L. Ainda assim há uma queda na conversão na segunda hidrólise (1ª rodada a 5%), ainda mais pronunciada do que a queda de conversão na quarta hidrólise na Figura 8.2 a. Isso mostra mais uma vez que a quantidade de glicose no meio reacional tem um forte papel como inibidor da reação. A maior conversão na quarta hidrólise provavelmente se deve à maior quantidade de enzima.

Comparando as estratégias de reciclo entre os diferentes bagaços (Figura 8.2 a e b), é sabido que pode ter ocorrido a liberação de outros inibidores além da glicose, como a celobiose (dados presentes no Apêndice V), e também a interferência físico-química do tipo de bagaço usado deve ser levada em consideração. O bagaço hidrotérmico tem baixa porcentagem de hemiceluloses e alta porcentagem de lignina em sua composição, que pode ter causado inibição. As menores conversões para o bagaço BH também são devidas à maior recalcitrância que a presença de lignina proporciona ao bagaço.

Ao se comparar os dados de concentração de glicose desta estratégia (Tabela 8.2) com os dados obtidos das estratégias de hidrólise enzimática em batelada e em batelada alimentada nas configurações C1 e C2 (Ver capítulo 5) nota-se que a estratégia proposta neste capítulo não obteve bons resultados.

No caso do bagaço BH, a estratégia R12, mesmo chegando a uma concentração de bagaço maior do que de todas as outras estratégias, levou a uma concentração de glicose final menor até mesmo do que a concentração obtida na batelada no mesmo tempo. Isso é provavelmente devido ao fato de que, ainda que a estratégia R12 tenha 48h de hidrólise, o bagaço é alimentado em cada estágio, o que corresponderia a alimentar bagaço em 0, 12, 24 e 36h. Com o aumento da concentração de glicose em cada estágio, a taxa de hidrólise foi ficando mais lenta e a concentração final de glicose obtida foi baixa. Nota-se na Tabela 8.2 que apenas na estratégia R48 a concentração de glicose é significativamente maior do que na

batelada, mas ainda assim, o valor é mais baixo do que para a batelada alimentada na configuração C2 em 144h ( $111,19 \pm 2,43$  g/L, Tabela 5.2). A batelada alimentada na configuração C2 teve alimentação de bagaço em 0, 6, 12 e 18h e a estratégia R48 em tempos equivalentes 0, 48, 96 e 144h.

No caso do BAD os resultados também não são bons, sendo que apenas a estratégia R48 levou a resultados similares à batelada alimentada, mas teve maior concentração de sólidos e precisou de mais tempo.

**Tabela 8.2:** Valores de glicose e conversão celulose para as diferentes estratégias de hidrólise enzimática.

Estratégia Hidrólise enzimática	Concentração Glicose (g/L)		Conversão celulose (%)	
	BH	BAD	BH	BAD
HE*_20% m/v (48h)	83,49±0,51	106,73±0,00	61,52±0,38	67,43±0,00
HE_BA**_24% m/v (48 h) (C2)	94,74±0,16	108,02±1,97	56,39±0,98	55,13±1,00
HE_BA**_20% m/v (48 h) (C1)	74,25±0,20 a	121,36±0,74 a	54,71±0,12 a	76,68±0,94 a
R 12_30% m/v (48 h)	75,47±0,41 a	84,99±0,30 b	37,37±1,21 a	40,79±0,25 b
R 24_30% m/v (96 h)	86,95±0,70 b	117,84±3,56 a	41,02±0,69 a	52,39±3,00 c,b
R 48_30% m/v (192 h)	104,78±0,18 c	122,47±2,98 a	39,98±0,18 a	51,50±2,51 d,b

Médias com letras diferentes em uma coluna diferem significativamente entre si no nível  $p < 0,05\%$  na análise de Tukey.

\*HE – Hidrólise enzimática;

\*\*HE\_BA – Hidrólise enzimática batelada alimentada.

Uma outra análise bastante interessante está disposta na Figura 8.3 (a e b), que compara a conversão de celulose de cada um dos ciclos de hidrólise enzimática entre R 12, R 24 e R 48. Mais uma vez, percebe-se que existe um fator bastante importante, a inibição por produto final, pois de um modo geral, a conversão de celulose diminui ao passo que o tempo reacional aumenta nas diferentes estratégias.

Para o BH (Figura 8.3 a) observa-se que na primeira hidrólise (15% m/v) as conversões em 12 horas foram praticamente iguais ( $38,31 \pm 0,13$ ,  $36,66 \pm 0,07$  e  $35,43 \pm 0,53$  % para R12, R24 e R48, respectivamente) o que era de se esperar, já que as concentrações de sólidos e as condições reacionais eram as mesmas. Conforme o tempo reacional aumentou as conversões também aumentaram, uma vez que a concentração de glicose também era maior no meio reacional.

Quando o primeiro ciclo foi realizado (1ª hidrólise a 5% m/v), notam-se que as conversões de celulose diminuíram conforme o tempo reacional aumentou entre os processos (R 12-12 horas cada ciclo; R 24-24 horas cada ciclo e R 48-48 horas cada ciclo). No tempo de 12 horas, por exemplo, as conversões foram de  $37,07 \pm 2,69$ ,  $28,33 \pm 0,26$  e de  $21,71 \pm 0,52$  % para R12, R24 e R48, nessa ordem. Essa tendência continua nos demais ciclos de hidrólise como pode ser visualizado na Figura 8.3 (a).

Além disso, existe certa tendência da conversão também diminuir após cada ciclo de um processo, como por exemplo, na primeira hidrólise (15%) a conversão para R 12 foi de  $38,31 \pm 0,13$ , já para os ciclos seguintes, as conversões foram de  $37,06 \pm 2,69$ ,  $33,06 \pm 2,24$  e de  $37,37 \pm 1,21$  (Figura 8.3 a). No caso do BH além da inibição por produto final, também podem estar relacionados outros fatores, como a inibição por produtos de decomposição da lignina e até mesmo devido a outros fatores como a adsorção improdutivo.

A Figura 8.3 (b) referente ao BAD exhibe a mesma tendência observada anteriormente para o BH (Figura 8.3 a), onde a conversão é maior para os processos com tempos reacionais menores, como o R12. Contudo, ocorre uma sobreposição das conversões para a segunda hidrólise dos processos R 12, 24 e 48, possivelmente outros inibidores que agiram em conjunto com a inibição por produto no caso do BH não estavam presentes no caso do BAD, e a intensidade da inibição não foi tão elevada para que as conversões fossem distintas da primeira hidrólise.

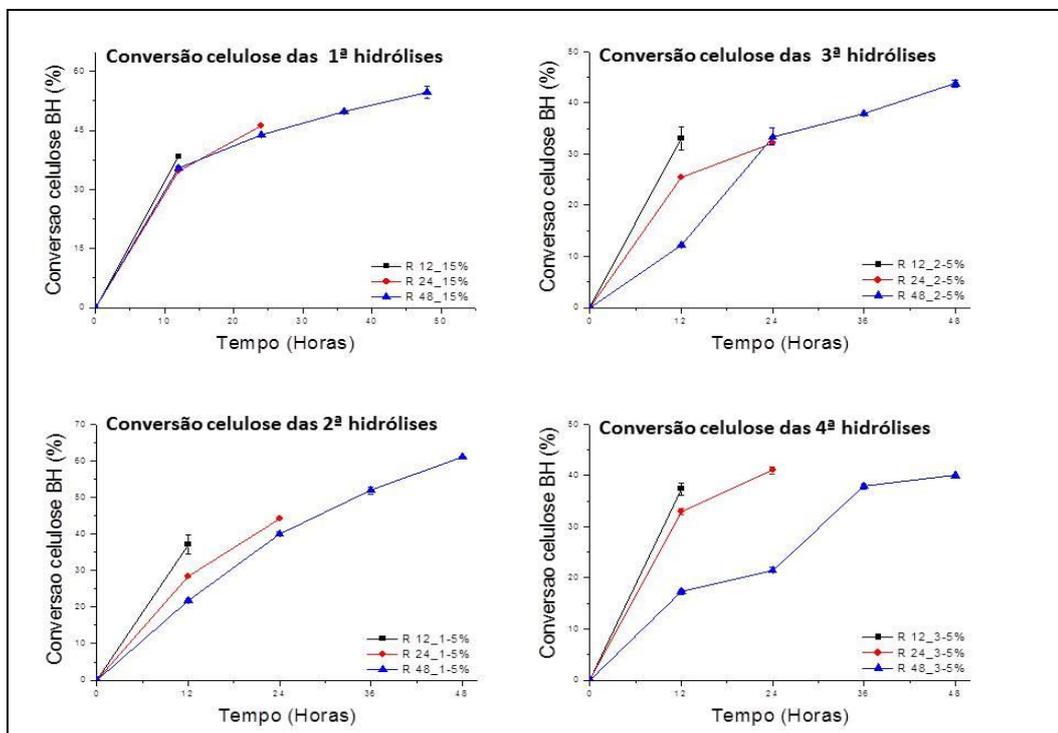
Quando a terceira hidrólise foi realizada e concentrações superiores a 80 g/L de glicose foram alcançadas, as conversões de celulose para os processos R12, R24 e R48 foram de  $27,22 \pm 0,27$ ,  $6,08 \pm 0,93$  e de  $6,28 \pm 0,19$  %, nessa ordem. No final da terceira hidrólise, para R24 e R48, as conversões alcançadas foram maiores do que a observada para o R12, já que os tempos reacionais também eram maiores.

Na quarta hidrólise a 5% (m/v) as conversões de celulose seguiram como as vistas anteriormente, onde em 12 horas R12 mostrou a maior conversão ( $40,79 \pm 0,25$  %) frente R24 ( $31,58 \pm 0,35$  %) e R48 ( $15,25 \pm 0,28$  %). No final dos processos R24 e R48 as conversões obtidas foram muito próximas,  $52,39 \pm 3,00$  e  $51,50 \pm 2,51$  %, mesmo quando o tempo

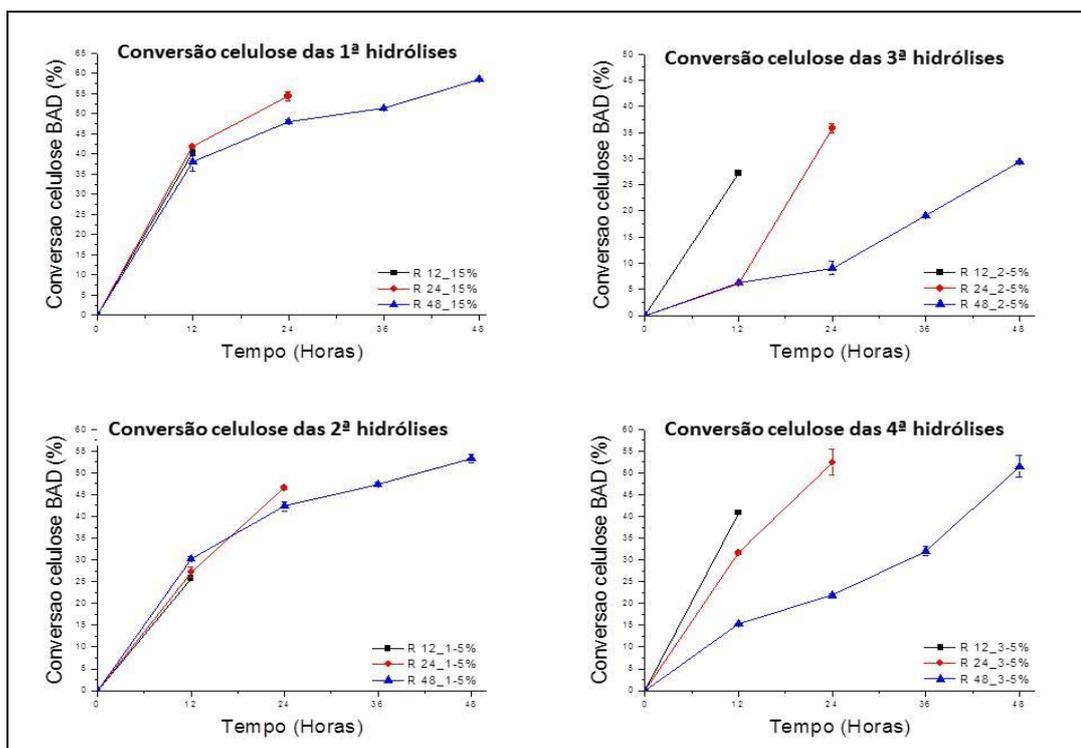
reacional foi até 24 horas menor para R24. Como as concentrações em glicose para esses processos foram superiores a 100 g/L, o tempo reacional já não foi o suficiente para que a conversão aumentasse no caso do processo R48.

**Figura 8.3:** Influência do tempo de cada reciclo nas conversões de celulose entre os processos R 12, 24 e 48 dos bagaços, a) BH e b) BAD.

a)

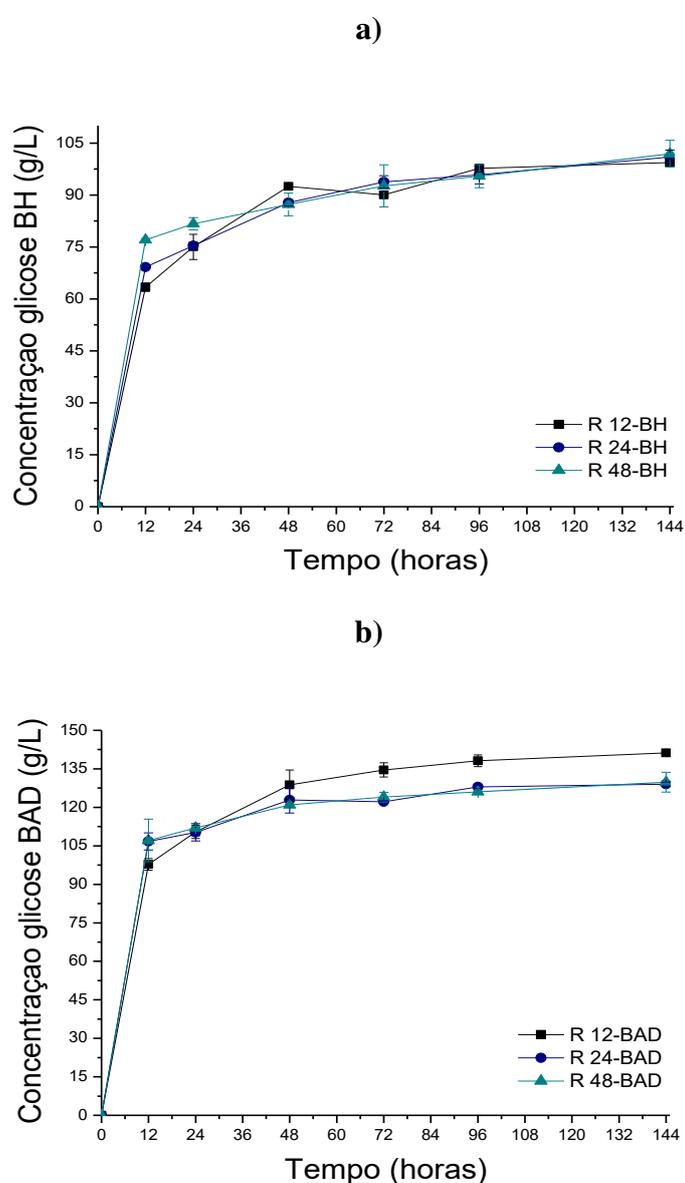


b)



Para que o processo proposto neste capítulo seja atrativo, dadas as baixas conversões, a hidrólise da fração sólida que sobra após a primeira hidrólise (15% m/v) deve ser considerada. Através da Figura 8.4 (a e b) percebe-se que dependendo do tipo de bagaço (BH ou BAD) a concentração de glicose formada após a hidrólise enzimática do sólido pode ou não diferir de acordo com o processo (R 12, R 24 ou R 48) do qual o mesmo foi reciclado. Para cada bagaço estudado (Figura 8.4 a, b), notam-se três perfis de concentração de glicose, os quais se referem aos sólidos reciclados dos processos R 12, R 24 e R 48.

**Figura 8.4:** Perfil de glicose para os reciclados sólidos sendo a) hidrólise do sólido reciclado BH e b) hidrólise do sólido reciclado BAD



A alta consistência de sólidos alcançada nessa etapa do processo resultou em quantidades altas de glicose em tempos reacionais relativamente curtos, tanto para o BH

quanto para o BAD. Quando o sólido reciclado do BH foi usado como substrato (Figura 8.4a) verifica-se que independente do processo de origem, R 12, 24 ou 48, a concentração de glicose foi mantida em torno de  $92,52 \pm 0,40$  g/L,  $93,78 \pm 1,77$  g/L e  $92,64 \pm 6,08$  g/L de glicose, respectivamente, até as primeiras 48 horas reacionais. Esse valor aumentou ao passar do tempo, e o teor de glicose em 144 horas chegou a  $99,41 \pm 0,61$  g/L,  $101,00 \pm 1,97$  g/L e  $101,91 \pm 3,92$  g/L para os processos R 12, 24 e 48, nessa ordem. Aqui, observa-se que em 48 horas reacionais, para o processo R 12, 93 % de toda glicose já havia sido produzida e esse comportamento, onde mais da metade do total de glicose é produzido nas primeiras 48 horas reacionais também é verificado nos outros processos, como exemplo, nos processos R 24 e R 48, aproximadamente 87 % do total de açúcar foi liberado no meio reacional.

Enquanto isso, ao analisar a Figura 8.4 (b) referente ao BAD, nota-se que no início das hidrólises enzimáticas, em 12 horas reacionais, as concentrações de glicose foram maiores para os processos R 24 e R 48 com  $106,73 \pm 3,33$  g/L e  $107,12 \pm 8,31$  g/L, respectivamente, em comparação com os  $97,79 \pm 2,28$  g/L do processo R 12. Esse perfil pode estar ligado ao fato de que nesses sólidos certa quantidade de glicose já estava presente, uma vez que os sólidos não foram lavados para começar a nova hidrólise do material. Contudo, a partir de 48 horas o teor de glicose aumentou para o processo R 12, alcançando  $128,72 \pm 5,82$  g/L e ao final da reação (144 horas),  $141,23 \pm 0,69$  g/L de glicose foi produzido. Já para os demais processos (R 24 e R 48) verificam-se em 48 horas,  $122,88 \pm 5,08$  g/L e  $120,94 \pm 0,28$  g/L de glicose, respectivamente. No final da reação, 144 horas, a concentração de glicose foi praticamente igual entre R 24 e R 48 ( $129,05$  g/L  $\pm 0,73$  e  $129,82 \pm 3,87$  g/L).

Logo, ao se comparar os processos R 24 e R 48 com o processo R 12 para BAD do reciclo de sólidos, a diferença na produção de glicose é de até  $12$  g/L  $\pm 1,61$  g/L em 144 horas para R 12. Ainda sim, é importante destacar que quase toda glicose foi produzida durante as primeiras 48 horas reacionais, como por exemplo, aproximadamente 91,14 %, 95,22 % e 93,16 % do total de glicose foram liberados nos meios reacionais para os processos R 12, R 24 e R 48, respectivamente. A diferença observada entre os processos pode estar relacionada com a digestão das biomassas, uma vez que os sólidos vindos dos processos R 24 e R 48 foram hidrolisados por 12 ou 24 horas a mais do que o sólido recuperado do processo R 12. Nesse caso, uma quantidade maior de celulose ainda estaria disponível para hidrólise nesse sólido.

Além disso, todos os resultados apontam que é imprescindível uma forma de lidar com a inibição por glicose, que parece ser um fator mais limitante do que a dificuldade de transferência de massa, já que mesmo eliminando esta dificuldade a conversão se manteve

bastante baixa como os valores observados na Figura 8.2 (a e b). Neste sentido, estudos de Sacarificação e Fermentação Simultâneas foram realizados no Capítulo 9.

## 8.4 Conclusões

Na tentativa de eliminar a interferência de altas concentrações de sólidos, o estudo da estratégia com ciclos de hidrolisado em diferentes tempos reacionais mostrou que o acúmulo de determinada quantidade de glicose no meio reacional é o principal fator da diminuição da conversão de celulose durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Pensando na estratégia de Xue et al. (2012b) no qual esse capítulo foi baseado, pode-se dizer que é possível reciclar as enzimas através do líquido filtrado e do sólido separado na primeira hidrólise, contudo, o líquido reutilizado para diluir uma nova hidrólise com a adição de sólidos frescos mostrou que o acúmulo de açúcares acaba interferindo negativamente o processo.

Além disso, mesmo as estratégias tendo proporcionado trabalhar com até 30% de sólidos (m/v) na hidrólise, as concentrações de glicose obtidas foram menores do que as concentrações obtidas para os experimentos de hidrólise enzimática em batelada alimentada (20% m/v).

A interferência do produto final na conversão de celulose também está relacionada com o tipo de pré-tratamento empregado no bagaço, pois as conversões foram ainda menores quando a biomassa tinha maior quantidade de lignina em sua composição (BH). Provavelmente os inibidores vindos da lignina sejam mais importantes, já que o bagaço hidrotérmico tem baixa porcentagem de hemiceluloses e alta porcentagem de lignina em sua composição e se mostrou como a biomassa com as menores conversões.

Logo, os resultados apontam que é imprescindível uma forma de lidar com a inibição por glicose, que parece ser um fator mais limitante do que a dificuldade de transferência de massa, já que mesmo eliminando esta dificuldade a conversão se manteve baixa.

## 9 CAPÍTULO 9

### SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS – SSF

#### 9.1 Introdução

A produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica requer hidrólise enzimática de celulose para liberar açúcares que podem ser, posteriormente, fermentados a etanol por leveduras. Para uma produção economicamente viável de etanol no nível industrial, o etanol produzido deve atingir pelo menos 4% (v/v) no caldo de fermentação (LIU et al., 2016). As altas concentrações de substrato resultam em altas concentrações de açúcares e consequentemente etanol, que exigem menos energia e equipamentos menores para um determinado processo. Devido à redução do volume, as cargas de aquecimento e arrefecimento também são diminuídas. A sacarificação e fermentação simultânea (SSF) para produção de etanol integram a hidrólise do substrato e a fermentação em um único vaso reacional, o que permite que os microrganismos fermentadores consumam os açúcares liberados da hidrólise, eliminando assim a inibição pelo produto final da hidrólise, reduzindo o custo de investimento. No entanto, a SSF é limitada pelas condições sub-ótimas para hidrólise e fermentação. Esses problemas podem ser reduzidos pela adição de um passo de pré-hidrólise na SSF, o que permite, por exemplo, que a hidrólise e a fermentação funcionem em suas respectivas temperaturas ideais. A sacarificação e fermentação simultâneas com alto teor de sólidos pode aumentar a produção do etanol e então, facilitar a separação posterior do mesmo. Em termos práticos, o alto teor de sólidos gera problemas reológicos que incluem baixa transferência de massa, inibidores de alta concentração e inibição severa pelo produto final. Logo, realizar a SSF em batelada alimentada também é uma estratégia que potencialmente reduz as dificuldades de liquefação com alto teor de sólidos.

Neste estudo, utilizou-se somente o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado BAD como substrato para SSF. Escolheu-se introduzir a etapa de pré-hidrólise em modo batelada alimentada de acordo com a configuração C 1 como apresentada no Capítulo 5, pois, de acordo com todos os resultados apresentados essa foi a melhor estratégia de hidrólise em termos de concentração de glicose e conversão de celulose. A inoculação de levedura foi realizada após a etapa de pré-hidrólise. Após um período de fermentação, a temperatura do meio foi elevada novamente para a temperatura ótima de hidrólise. Com isso, uma nova estratégia de SSF com oscilações na temperatura foi proposta nesse capítulo com o intuito de aumentar as concentrações de etanol liberadas no meio reacional.

## 9.2 Metodologia experimental

As etapas descritas no presente trabalho foram realizadas de acordo com as metodologias realizadas por Andrade (2012).

### 9.2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* cultivado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e obtido na Usina Santa Adélia S/A (Jaboticabal - SP).

Essa linhagem de *S. cerevisiae* foi anteriormente usada por Andrade (2012) e Martins (2015) para fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e demonstrou alto rendimento em etanol obtido, conversão total de glicose presente no meio, e certa resistência a inibidores, não necessitando de detoxificação ou diluição do caldo hidrolisado anteriormente à fermentação. A manutenção da mesma foi feita em refrigerador utilizando meio de ativação contendo ágar. A manipulação sempre se realizou em câmara de fluxo laminar, cujas superfícies foram desinfetadas através de solução de álcool etílico a 70 % e posterior exposição à radiação ultravioleta por 30 minutos. Anteriormente à SSF, propagações do microrganismo foram realizadas a cada 24 horas.

### 9.2.2 Meio de ativação do microrganismo

O meio de ativação para cultivo de *S. cerevisiae* utilizado na presente pesquisa foi composto pelos reagentes listados na Tabela 10.3 presente no Apêndice IV.

### 9.2.3 Meio semi-sólido para ativação da levedura

O meio semi-sólido para ativação da levedura foi preparado adicionando-se 20 g/L de ágar-ágar aos compostos listados no item 9.2.2 que estão presentes na Tabela 10.3 do Apêndice IV. O ágar-ágar foi solubilizado com o auxílio de aquecimento até fervura e agitação para facilitar a sua mistura com os outros reagentes.

### 9.2.4 Meio de crescimento do microrganismo

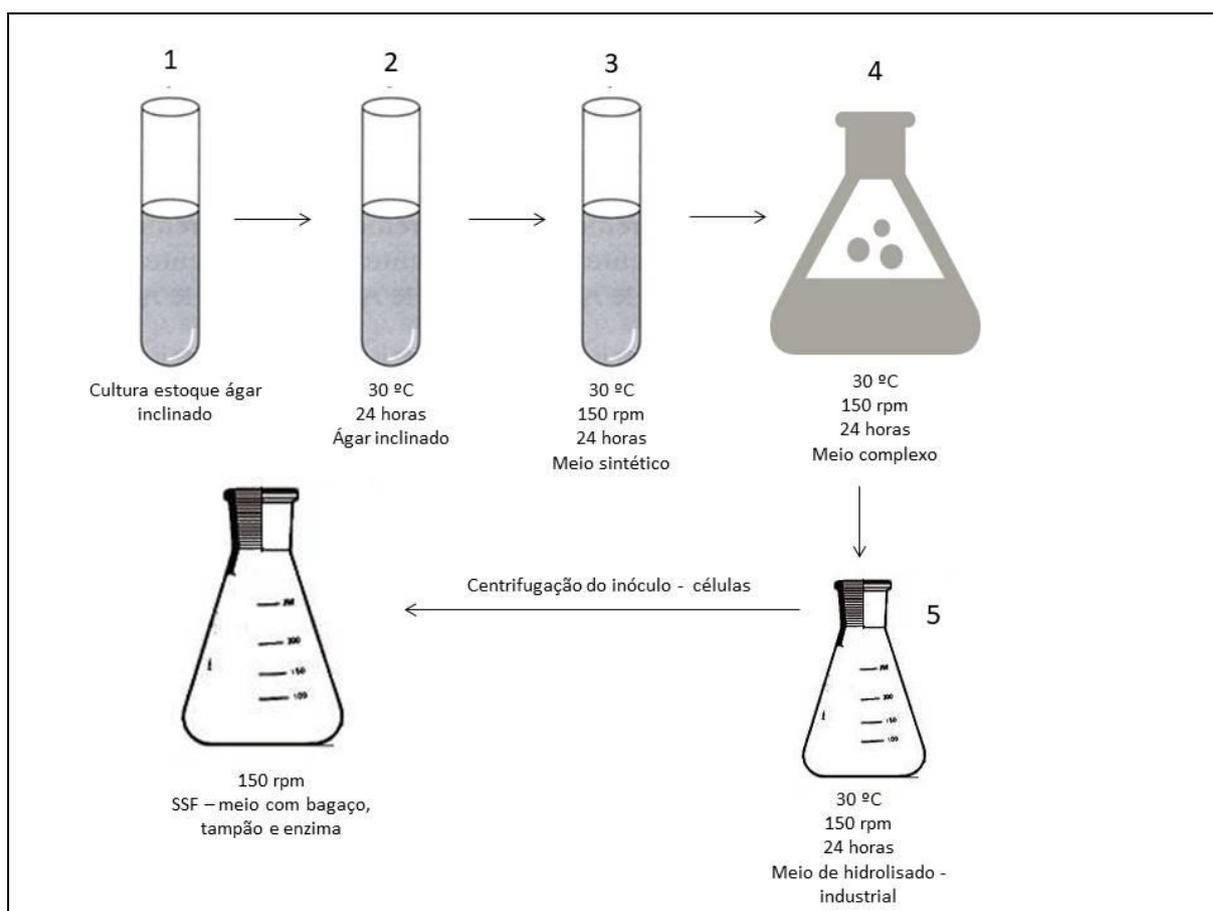
A composição e quantidades dos reagentes para preparar o meio de crescimento da *S. cerevisiae* está descrito no Apêndice IV.

Foi utilizado HCl concentrado para ajustar o pH do meio de crescimento para 6,8. Todos os meios (de ativação, semi-sólido e de crescimento) foram autoclavados em autoclave vertical (modelo AV 50 da marca Phoenix) na temperatura de 121 °C por 15 min antes de

serem utilizados. Os meios semi-sólidos foram mantidos inclinados até a solidificação do ágar, para que o mesmo ficasse de forma inclinada no tubo de ensaio. Foi utilizado álcool etílico 70 % para desinfetar as superfícies da câmara de fluxo laminar e o uso da radiação ultravioleta durante um período de 30 min, tudo isto realizado antes da manipulação de todas as etapas, a seguir, que podem ser visualizadas através da Figura 9.1.

A ativação da levedura foi feita a partir de uma solução de estoque, onde se transferiu as células do meio de estoque para o meio semi-sólido (ágar inclinado) com o auxílio de uma alça de platina devidamente flambada e resfriada. Este meio foi levado para uma incubadora por 30 °C por 24 h. Após o crescimento do microrganismo, os tubos foram levados para o fluxo laminar (devidamente esterilizado) e o conteúdo foi transferido para tubos de ensaio estéreis contendo 10 mL do meio de ativação. Estes novos tubos foram mantidos nas mesmas condições de temperatura anteriormente descritas.

**Figura 9.1:** Etapas para o preparo de inóculo e SSF (adaptação de Andrade (2012)).



Na última etapa - meio de ativação, os tubos foram também levados para o fluxo laminar para realização do repique do microrganismo, onde o conteúdo dos tubos foi transferido para Erlenmeyers (500 mL) que já continham o meio de crescimento (meio complexo). Esses frascos foram levados a um "shaker" por mais 24 h a 30 °C em agitação de

150 rpm na incubadora refrigerada (modelo MA-832 da marca Marconi). Após o período, verteu-se o conteúdo do inóculo para tubos de centrífuga previamente esterilizados, que foram submetidos à centrifugação por 3290 rpm por 10 min. Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas para o meio com hidrolisado (etapa 5), processo de adaptação da levedura, como descrito a seguir.

### **9.2.5 Meio de adaptação dos microrganismos – meio com hidrolisado**

Essa etapa de crescimento da levedura foi realizada utilizando como meio o hidrolisado do bagaço BAD. Para isso, realizou-se uma hidrólise enzimática com alta concentração de sólidos (20% m/v) nas mesmas condições reacionais descritas no *item* 4.2.1, sem adição de azida sódica, pois esse composto é inibidor de microrganismos como a *S. cerevisiae*. A hidrólise foi realizada por 144 horas e após esse período o meio reacional foi centrifugado e filtrado para separação do hidrolisado. O hidrolisado foi devidamente esterilizado em autoclave vertical (modelo AV 50 da marca Phoenix) na temperatura de 121 °C por 15min antes de ser utilizado.

Nesse estágio de crescimento, onde o inóculo crescido em meio sintético foi transferido para Erlenmeyer contendo meio de hidrolisado, o frasco contendo o inóculo foi então acondicionado em “shaker” com agitação de 150 rpm, 30 °C por mais 24 horas. Após o período, o conteúdo do Erlenmeyer foi transferido para tubos de centrífuga esterilizados, que foram submetidos à centrifugação por 3290 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então descartado e as células utilizadas na etapa de SSF que será descrita a seguir.

### **9.2.6 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)**

#### **9.2.6.1 Modo batelada**

Os experimentos de SSF em batelada foram realizados nas temperaturas de 34 e 38 °C, primeiramente, para verificar a influência da temperatura sob a fermentabilidade, e também a possível interação da mesma com o processo de hidrólise enzimática, já que durante a SSF a hidrólise ocorre simultaneamente à fermentação, e a temperatura ótima de ambas as etapas são distintas.

Para esses experimentos foram utilizados frascos Erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio reacional total, composto por 20 % (m/v) de sólidos em tampão citrato de sódio (pH 4,8). A enzima Cellic Ctec 2 foi adicionada assepticamente na proporção de 15 FPU/g de BAD. A SSF iniciou pela adição da enzima e com a etapa de pré-hidrólise por 12 h a 50 °C em um shaker com agitação de 150 rpm. A temperatura foi reduzida para 34 ou 38 °C, e a

levedura foi adicionada ao meio pré-hidrolisado na concentração celular inicial de 10 g/L, o que converteu para a SSF. O tempo de adição da levedura foi referido como o tempo zero. As amostras do caldo de fermentação foram coletadas e analisadas posteriormente para quantificação do teor de açúcares, etanol e glicerol. Esses experimentos não foram realizados em duplicata, apenas serviram para obtenção de dados preliminares na escolha da temperatura.

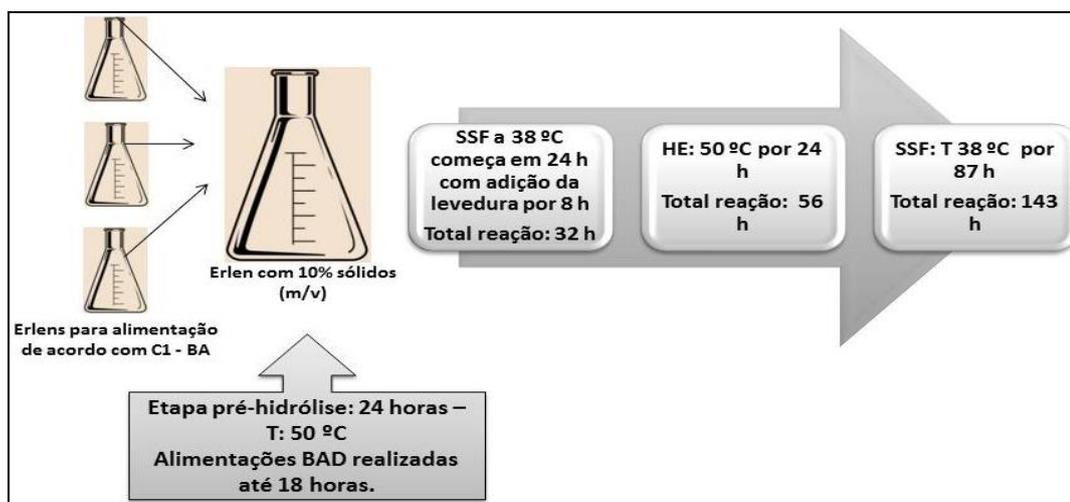
#### **9.2.6.2 Modo batelada alimentada**

Os experimentos de SSF em batelada alimentada foram iniciados com 10 % de sólidos (m/v) e 15 FPU/g BAD de celulase, com volume reacional total de 100 mL. Realizou-se pré-hidrólise de 24 horas a 50 °C e 150 rpm. Durante esse período as alimentações de bagaço foram realizadas de acordo com a configuração C1 da hidrólise enzimática em batelada alimentada apresentada nesse trabalho (*item 5.2.1*) até as primeiras 18 h reacionais da pré-hidrólise. Em 24 horas iniciaram-se as SSFs. Para isso, a temperatura foi diminuída para a temperatura escolhida a partir dos dados obtidos no *item 9.2.6.1*, acima. Após o instante, as células de leveduras previamente centrifugadas e aferidas foram transferidas assepticamente (dentro do fluxo laminar e usando chama do bico de Bussen) para obter concentração de 10g/L nos Erlenmeyers contendo volume reacional de 100 mL.

A SSF se deu de forma diferente das convencionais. Após a etapa de pré-hidrólise com a redução da temperatura (38 °C) a SSF ocorreu por 8 horas. Após, a temperatura dos frascos reacionais foi elevada para 50 °C com o intuito de se favorecer a hidrólise enzimática por mais 24 horas reacionais, a fim de verificar uma possível fermentação após a exposição das leveduras a uma temperatura agressiva (50 °C). Então, a temperatura desses frascos foi novamente diminuída para a adotada na SSF (38 °C) e assim permaneceu por mais 87 horas. Durante todo o ensaio, amostras (1 mL) foram coletadas do meio reacional para as análises em HPLC (quantificação de glicose, etanol, ácido acético e glicerol).

Para melhor entendimento a Figura 9.2 esquematiza o processo de SSF proposto.

**Figura 9.2:** Esquema da SSF proposta.



### 9.2.7 Parâmetros de desempenho da SSF

Calcularam-se dois parâmetros a partir dos resultados obtidos nesse Capítulo, o rendimento etanólico (%) e a produtividade (g/(L.h)). O cálculo do rendimento etanólico em porcentagem do rendimento teórico foi obtido pela Equação 9-1, obtida do protocolo NREL-LAP 008, 1995.

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{[E \text{ tan ol}]_f - [E \text{ tan ol}]_i}{0,568 [C]} \times 100$$

**Equação 9-1**

Onde:

[Etanol]<sub>f</sub> – Concentração final de etanol (g/L);

[Etanol]<sub>i</sub> – Concentração inicial de etanol (g/L);

[C] – Concentração de celulose presente na amostra;

0,568 – Fator de conversão de celulose em etanol.

A produtividade, a qual relaciona a concentração de etanol obtida com o respectivo tempo t de reação foi avaliada pela Equação 9-2:

$$\text{Produtividade} = \frac{[E \text{ tan ol}]}{t} \left( \frac{g}{L.h} \right)$$

**Equação 9-2**

Onde:

[Etanol] – Concentração de etanol (g/L);

t – Tempo reacional (h).

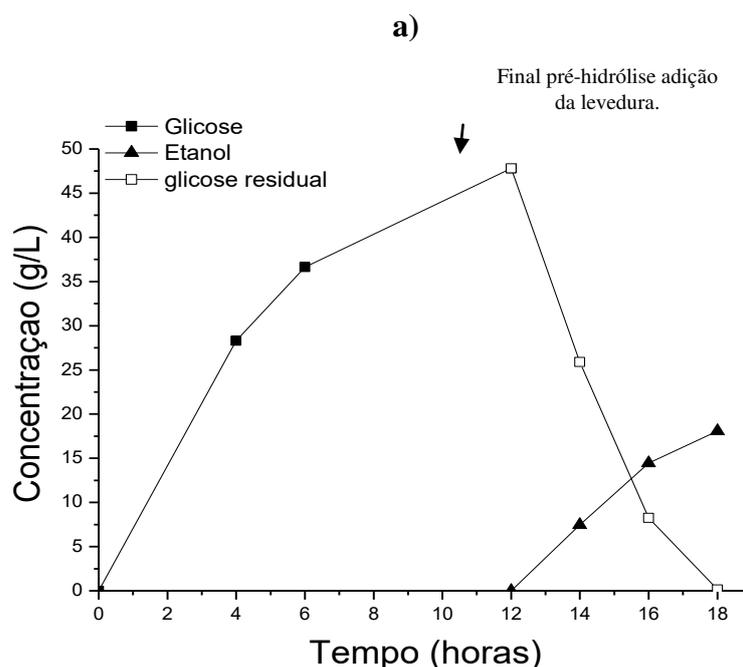
## 9.3 Resultados e discussão

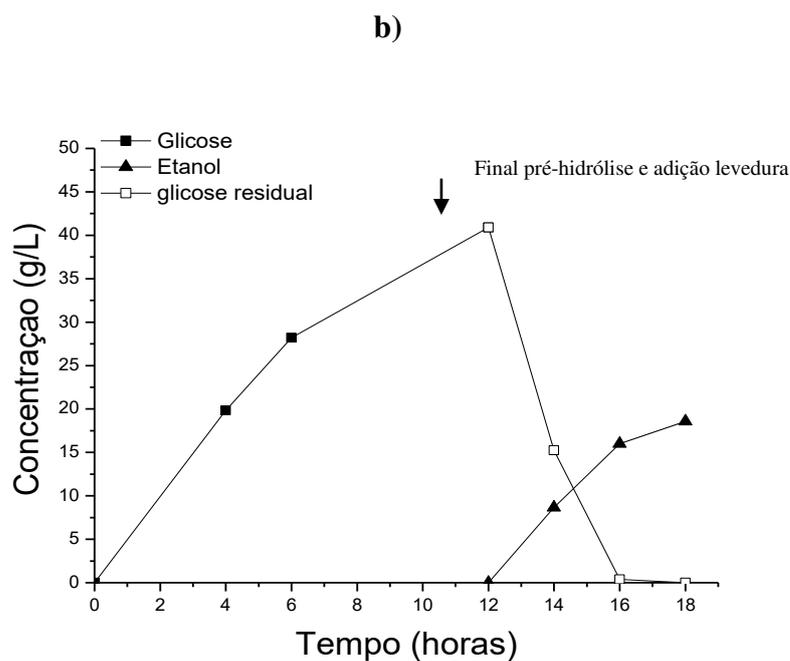
### 9.3.1 SSF preliminar em modo batelada

Com o intuito de promover a SSF em temperaturas mais altas para que a hidrólise enzimática não fosse tão prejudicada, as temperaturas de 34 e 38 °C foram avaliadas. Para isso, experimentos únicos de SSF adicionando uma etapa de pré-hidrólise de 12 horas com o bagaço BAD foram realizados. A Figura 9.3 (a e b) mostra que a produção de glicose e etanol variou para os ensaios a 34 e 38 °C, entretanto essa variação se deve principalmente à diferença na concentração de glicose alcançada ao final da pré-hidrólise. Para o experimento onde a SSF se deu a 34 °C (Figura 9.3 a) a concentração de glicose no final da pré-hidrólise foi de aproximadamente 47,80 g/L, já para o ensaio realizado a 38 °C a glicose liberada após 12 horas foi de aproximadamente 41 g/L. Como as condições de pré-hidrólise foram as mesmas, esta diferença é devida apenas ao erro experimental.

A concentração de glicose diminuiu rapidamente durante as 6 h de fermentação. Onde a produção de etanol foi rápida, com produção de aproximadamente 18,10 g/L e 18,60 g/L de etanol para os ensaios a 34 e 38 °C, respectivamente.

**Figura 9.3:** Perfil de SSF obtido para BAD nas temperaturas: a) 34 °C e b) 38 °C.



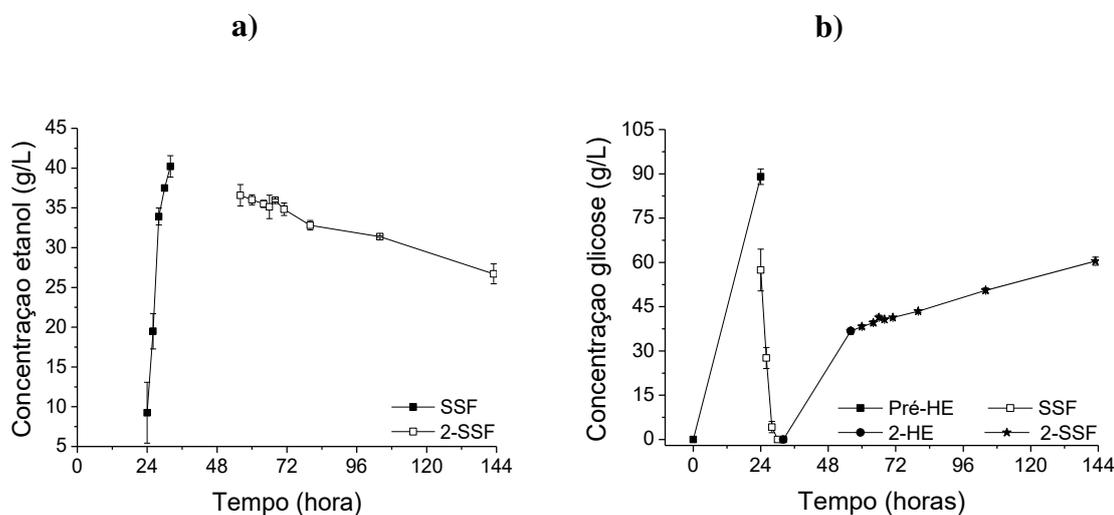


Nota-se que em 6 horas de SSF os rendimentos de etanol (%) para os experimentos foram de aproximadamente 44,70 e 45,90 para as temperaturas de 34 e 38 °C, nessa ordem. De acordo com trabalhos na literatura (GAO et al., 2014a; WANG et al., 2013), os resultados obtidos estão dentro da faixa de valores encontrados, lembrando que o tempo de SSF foi curto, apenas 6 horas de reação. Provavelmente ao se estender o tempo reacional dos processos, os rendimentos etanólicos seriam maiores. Logo, escolheu-se a temperatura de 38 °C para realizar as demais SSFs do trabalho.

### 9.3.2 SSF modo batelada alimentada

A Figura 9.4 (a) apresenta o perfil do etanol obtido em todo o processo de SSF estudado na temperatura de 38 °C e a Figura 9.4 (b) a formação e o consumo de glicose durante o processo.

**Figura 9.4:** (a) Perfil da produção de etanol (b) Perfil de glicose durante o processo de SSF do BAD a 38 °C.



Legenda: SSF= Sacarificação e fermentação Simultâneas; 2-SSF= 2ª Sacarificação e fermentação Simultâneas; 2-HE= 2ª Hidrólise Enzimática.

Nota-se que a configuração de hidrólise enzimática em batelada alimentada C1, escolhida como processo para iniciar a SSF, gerou quantidades altas de glicose na pré-hidrólise por 24 horas. Ao final das três alimentações realizadas até às 18 horas da pré-hidrólise, a concentração de sólidos alcançada foi de 20 % (m/v) e a glicose acumulada ao final da pré-hidrólise em 24 horas reacionais foi de  $89,04 \pm 2,60$  g/L, uma concentração de açúcar fermentescível desejável, já que para o processo ser considerado viável, o etanol precisa estar em aproximadamente 4% (v/v) no meio.

Quando a temperatura do processo baixou pela primeira vez para a temperatura de 38 °C, iniciou-se então, a SSF, e 10 g/L de levedura (correspondente a 20 mL) foram inoculadas aos Erlenmeyers com 100 mL reacionais. Conforme mostrado na Figura 9.4 (b), a concentração de glicose diminuiu rapidamente após a fermentação que se deu em apenas 8 horas reacionais, enquanto a concentração de etanol aumentou (Figura 9.4 a) nas 8 h e finalmente alcançou a concentração máxima de etanol em 32 horas de processo ( $40,21 \pm 1,34$  g/L, equivalente a 0,28 g de etanol/g de celulose ou 0,20 g de etanol/g de BAD), um valor considerado como mínimo para o processo ser economicamente viável. A produtividade em etanol também foi alta, alcançou até  $5,02 \pm 0,16$  g/Lh.

A concentração de etanol obtida nesse trabalho ( $40,21 \pm 1,34$  g/L), bem como o rendimento em etanol ( $49,85 \pm 1,65$  %) para uma SSF onde a fermentação se deu por apenas 8 horas se mostrou bastante eficiente e está de acordo com outros valores encontrados na

literatura. Wang et al. (2016), por exemplo, trabalharam com bagaço hidrotérmico em uma SSF com etapa anterior de pré-hidrólise em batelada alimentada por 120 horas para conseguirem 91,6 g/L de glicose, e somente após esse período a SSF foi iniciada e se manteve por mais 72 horas, onde alcançaram aproximadamente 54,4 g/L de etanol. Os autores ainda reportaram em seu estudo que os valores encontrados por eles foram superiores a qualquer outro resultado reportado para o mesmo tipo de bagaço pré-tratado.

Liu et al. (2015) propuseram em seu estudo um tipo diferente de SSF, com pré-hidrólise e alimentação em batelada alimentada de hidrolisados. A biomassa utilizada por esses autores também foi bagaço de cana pré-tratado alcalino (deslignificado). Com essa estratégia a SSF atingiu uma concentração de etanol de até 68,047 g/L (74,13% de rendimento teórico) a 30% sólidos (m/v) por 96 h reacionais. Lui *et al.* (2010) ao otimizarem o método de batelada alimentada para um outro tipo de biomassa, a palha de milho pré-tratada, alcançaram a concentração de etanol de 57,2 g/L em 141,5 h, que foi cerca de 100 h a menos do que para o método de batelada (53,2 g/L). Contudo o rendimento em etanol obtido foi de apenas 25%.

Após 8 horas de SSF a 38 °C, a temperatura do processo foi modificada para 50 °C, e então, a produção de glicose se deu por mais 24 horas alcançando até  $36,74 \pm 0,67$  g/L, nesse momento o processo estava com 56 horas totais. Na tentativa de que os microrganismos voltassem a fermentar a glicose liberada no meio após o aumento da temperatura, decidiu-se diminuir a mesma para 38 °C, e com isso o processo de SSF se deu por mais 87 horas. Entretanto, é constatado pela Figura 9.4 (b) que a temperatura anterior de 50 °C inviabilizou todas as células fermentativas, onde nenhuma produção de etanol foi percebida durante o processo. Na verdade, a concentração de etanol no meio acabou diminuindo conforme o tempo se passava, provavelmente houve evaporação do mesmo devido à temperatura. Andrade (2012) afirma que em altas temperaturas, o metabolismo microbiano é desviado da produção de etanol para realizar funções básicas das células. Assim, o rendimento em biomassa tende a cair com o aumento desta variável. Em altas temperaturas, a inibição do crescimento microbiano pelo etanol também é maior, o que resulta na menor concentração de biomassa formada.

A concentração de glicose aumentou durante esse período (2-SSF), chegando a  $60,41 \pm 1,36$  g/L. Ao somar todas as etapas (pré-hidrólise, 1-SSF, 2-HE e 2-SSF) o processo proposto foi realizado por 143 horas reacionais, onde foram produzidos aproximadamente 149,45 g/L de glicose e  $40,21 \pm 1,34$  g/L de etanol. O valor de glicose liberada em todo o processo, 149,45 g/L, é maior do que o valor de glicose alcançado quando o BAD foi hidrolisado por 144 horas na configuração C1 de batelada alimentada ( $136,63 \pm 1,59$  g/L). Este valor,

comparado ao valor teórico que pode ser obtido na hidrólise a 20% (m/v) de bagaço BAD (158.3 g/L) é muito alto, resultando em uma conversão de 94,4% na hidrólise, sem levar em conta a glicose que pode ter sido liberada durante a primeira etapa de fermentação e consumida pelo microrganismo, já que a segunda etapa de fermentação mostrou que a hidrólise continua acontecendo a 38°C, ainda que em taxa mais lenta.

Esses resultados mostraram que ao retirar a glicose do meio reacional, pelo metabolismo microbiano, a sacarificação enzimática melhora por diminuir o efeito inibitório da glicose sob as enzimas, onde mais açúcares fermentescíveis podem ser liberados e convertidos a etanol.

Hipoteticamente se um novo inóculo tivesse sido adicionado na segunda tentativa de fermentação (2-SSF), toda a glicose produzida teria sido consumida, e provavelmente o dobro de etanol seria liberado no meio reacional. Várias outras estratégias poderiam ser testadas. Por exemplo, quando a temperatura foi elevada para 50 °C após a primeira fermentação, o tempo reacional poderia ter sido maior, e neste caso uma maior liberação de glicose ocorreria e então, com a inoculação de microrganismos frescos para a segunda etapa de fermentação levada por mais um período de tempo, concentração maior de etanol seria liberada no meio. Outras opções seriam aumentar menos a temperatura na segunda hidrólise, ou usar microrganismos termotolerantes.

## 9.4 Conclusões

A SSF preliminar conduzida em duas diferentes temperaturas (34 e 38 °C) para o BAD a 20% de sólidos (m/v) demonstrou que o rendimento em etanol e sua produtividade não foram afetados quando a temperatura aumentou para 38 °C. Os perfis de consumo de glicose e formação de etanol foram similares para as duas situações distintas, indicando que na maior temperatura a reação de hidrólise enzimática pode ser beneficiada, já que essa ocorre em temperaturas maiores (50 °C).

A estratégia de SSF com etapa de pré-sacarificação em batelada alimentada com adsorção prévia das enzimas (melhor estratégia para altas concentrações de sólidos apresentada nesse trabalho) evidenciou que a produção de etanol pode ser realizada para altas concentrações de sólidos, onde foi possível alcançar até 149,0 g/L de glicose quando a temperatura do sistema oscilou mais de uma vez para 50 °C durante o processo de SSF. Além disso, esses dados mostraram que o consumo de glicose pelas leveduras (SSF 38 °C) após a etapa de pré-hidrólise proporcionaram menor inibição por produto final nas enzimas, o que aumentou o teor de glicose quando a hidrólise enzimática foi favorecida por mais 24 horas.

A concentração em etanol no meio reacional foi de  $40,21 \pm 1,34$  g/L, um valor bastante favorável para que a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar seja viável. Contudo, esse valor poderia ser melhorado se um novo inóculo de leveduras fosse realizado quando a 2ª SSF iniciou. Neste caso, aproximadamente 30 g/L a mais de etanol poderiam ter sido produzidos até o final do processo.

De um modo geral essa estratégia poderia ter proporcionado aproximadamente 70 g/L de etanol, correspondente a até 0,49 g de etanol/g de celulose com 86,78 % de rendimento em etanol teórico.

Porém, mais ensaios e testes aprofundados deveriam ser realizados até mesmo em fermentadores robustos, com melhor sistema de agitação, onde muito possivelmente concentrações elevadas de etanol seriam alcançadas com essa estratégia.

## 10 CAPÍTULO 10

### CONCLUSÕES FINAIS

O pré-tratamento ácido diluído seguido de deslignificação com NaOH no bagaço de cana-de-açúcar mostrou que o tipo de pré-tratamento empregado na biomassa interfere grandemente nos processos de hidrólise enzimática, bem como para a produção do etanol. O BAD se mostrou como a biomassa mais digestível enzimaticamente frente ao BH, que apresentava maior quantidade de lignina em sua composição. Além disso, para alcançar quantidades altas de açúcares fermentescíveis, mais que o dobro de massa (g) era requerido quando o BH foi utilizado.

O tipo de coquetel enzimático empregado no processo também teve grande importância como um fator para melhorar a reação de sacarificação enzimática dos bagaços BH e BAD, onde o coquetel comercial Celli Ctec 2, gentilmente doado pela empresa Novozymes, se mostrou como um complexo enzimático altamente eficiente na digestibilidade dessas biomassas. Aumentou a liberação de glicose para hidrólise do BH realizada a 20% de sólidos (m/v) com 15 FPU/g de bagaço de celulase em até 31,64 g/L em comparação com o complexo Celluclast 1.5 L (30 FPU/g bagaço de celulase), um coquetel mais antigo. As conversões alcançadas foram de  $62,73 \pm 0,71\%$  com Cellic Ctec 2 e  $39,42 \pm 0,64\%$  com a Celluclast 1.5 L.

Em relação à cinética de adsorção enzimática, a Cellic Ctec 2 demonstrou perfis diferentes de adsorção frente aos bagaços BH e BAD. Contudo, isso já era de se esperar, uma vez que os bagaços apresentam composições químicas diferentes. Para o BH o equilíbrio da adsorção foi atingido em 2 horas, enquanto que para o BAD o equilíbrio se deu em aproximadamente 4 horas reacionais. As concentrações máximas de enzima adsorvidas também foram distintas, 6,66 mg proteína/g BH  $\pm 0,24$  e 7,08 mg proteína/ g BAD  $\pm 0,15$ , quando a concentração de enzima adicionada foi de 9,68 mg proteína/g de bagaço. Pode-se dizer, que além das propriedades das enzimas, uma série de outras propriedades do substrato lignocelulósico, como por exemplo, cristalinidade, área superficial acessível, tamanho de partícula e conteúdos de lignina e hemiceluloses estão envolvidas na adsorção / dessorção da celulase.

A variação na carga de sólidos durante a hidrólise enzimática das biomassas mostrou que o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar determina a eficiência na digestibilidade da celulose. O bagaço lignificado (BH) apresentou menor digestibilidade da celulose para todas

as concentrações de sólidos estudadas (1 a 20% m/v) em comparação com o bagaço que passou por uma etapa de deslignificação com NaOH (BAD). A concentração de glicose aumentou em relação à concentração de sólidos e também com um tempo reacional estendido em até 144 horas. Porém, o aumento na concentração de sólidos influenciou na conversão de celulose, principalmente em tempos reacionais mais curtos, onde a quantidade de água disponível era menor, ocasionando uma série de problemas, como os relacionados à transferência de massa que dificultam, por exemplo, a mistura eficiente dos produtos e outros inibidores que se concentram perto do sítio catalítico enzimático inibindo as enzimas.

A conversão de celulose também foi afetada pelo tipo de pré-tratamento, onde o efeito do conteúdo de sólidos para o BH chegou a desaparecer com um tempo prolongado de hidrólise (144 horas). Para o BAD a conversão de celulose diminuiu com o aumento da carga de sólidos. Possivelmente o efeito da inibição por produto foi maior para o BAD e em alta concentração de sólidos esse efeito combinado com outros ligados a altas concentrações de sólidos ocasionou a queda na conversão de celulose.

As estratégias de batelada alimentada propostas forneceram altas concentrações de glicose e melhoram as conversões de celulose quando foram empregadas na configuração C1 para o BAD, que demonstrou a maior concentração de glicose liberada ( $136,63 \pm 1,59$  g/L). A conversão em celulose foi de  $86,33\% \pm 2,02\%$ , um valor muito alto se tratando de uma hidrólise a 20% de sólidos (m/v). Para o BH as estratégias de batelada alimentada não melhoram as conversões de celulose em relação a uma hidrólise normal na mesma concentração de sólidos (20% m/v). Essa diferença pode ser explicada por Driemeier et al. (2015), que relataram que biomassas submetidas à pré-tratamentos conhecidos por não remover a lignina ocasionam agregação da lignina e da celulose além da co-cristalização, o que provoca uma coesão nonoescalar dos poros tornando-os menores ( $< 4\text{nm}$ ) em comparação aos observados em biomassas deslignificadas ( $> 10\text{nm}$ ), o que acaba prejudicando a adsorção enzimática e conseqüentemente a eficiência da hidrólise mesmo em baixas concentrações de sólidos.

A diferença nas concentrações de glicose e na conversão de celulose entre as configurações C1 e C2 para o BAD provavelmente é devida em parte à inibição da adsorção pela alta concentração de glicose produzida durante a hidrólise, mas provavelmente também ao valor de retenção de água (VRA), que é maior para bagaços deslignificados, aumentando a viscosidade aparente da mistura e causando maior dificuldade de acesso das enzimas ao substrato. Como na hidrólise do BAD há liberação de maiores concentrações de glicose do que na hidrólise do bagaço BH, e como este deve ter maior VRA, a adsorção pode ter sido

prejudicada na configuração C2, o que não aconteceria na configuração C1, em que a adsorção no bagaço a ser alimentado foi feita em etapa separada.

As estratégias proposta por Xue et al. (2012) e devidamente modificadas para as biomassas e complexos enzimáticos deste trabalho mostraram que a hidrólise em duas etapas independe do complexo enzimático a ser utilizado. A Celluclast 1.5 L juntamente com o BH demonstrou que em uma concentração de sólidos alta (18,73% m/v), os resultados foram todos iguais estatisticamente para conversão de celulose em glicose. Ao utilizar a Cellic Ctec 2, nessa estratégia modificada de Xue et al. (2012), possivelmente muitas variáveis devem ser levadas em consideração, principalmente o complexo enzimático e o tipo de pré-tratamento empregado no bagaço.

A pesquisa para o desenvolvimento de uma hidrólise em três etapas também baseada em estudos como os de Xue et al. (2012) e Yang et al. (2011) proporcionaram altas concentrações de sólidos após as etapas de separação sólido-líquido e conseqüentemente altas concentrações de glicose, mesmo quando a primeira hidrólise enzimática se dava por apenas 12 horas de reação. Essa técnica se mostrou superior quando comparada com hidrólises enzimáticas convencionais para uma mesma carga de sólidos. Contudo, essa estratégia, por trabalhar com volumes reacionais menores e mais concentrados, ao juntar as correntes líquidas obtidas das etapas que constituem o sistema a concentração de glicose final acaba sendo até menor do que a concentração de glicose alcançada para hidrólise realizada em cargas de sólidos menores. Logo, essa estratégia, assim como a estratégia de hidrólise em duas etapas, não é adequada, pois requer muitas variáveis operacionais durante os processos, como a centrifugação para separação sólido-líquido.

O estudo da hidrólise enzimática em ciclos com diferentes tempos reacionais mesmo proporcionado trabalhar com 30% de sólidos (m/v) não alcançou o objetivo esperado de melhorar as conversões de celulose, ao contrário, evidenciou que o acúmulo de determinada quantidade de glicose no meio reacional é o principal fator da diminuição da conversão durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A interferência do produto final sob a conversão de celulose também está relacionada com o tipo de pré-tratamento empregado no bagaço, pois as conversões foram ainda menores para BH. Provavelmente os inibidores vindos da lignina sejam mais importantes, já que o bagaço hidrotérmico apresenta baixa porcentagem de hemiceluloses e alta porcentagem de lignina em sua composição e se mostrou como a biomassa com as menores conversões. Esse estudo demonstrou evidentemente que é imprescindível encontrar uma forma de lidar com a inibição por glicose, que parece ser o fator mais limitante do que a

dificuldade de transferência de massa, já que mesmo eliminando esta dificuldade a conversão se manteve baixa.

Para fins de visualização e melhor compreensão dos dados concluídos até aqui, a Tabela 10.1, abaixo, apresenta dados de conversão de celulose em glicose para as diferentes estratégias de hidrólise enzimáticas que foram discutidas e apresentadas nesse trabalho.

A SSF em batelada alimentada providenciou até 149,0 g/L de glicose quando a temperatura do sistema foi elevada mais de uma vez para 50 °C durante o processo. Além disso, esses dados mostraram que o consumo de glicose pelas leveduras (SSF 38 °C) após a etapa de pré-hidrólise proporcionaram menor inibição por produto final nas enzimas, o que aumentou o teor de glicose no meio reacional quando a hidrólise enzimática foi favorecida por mais 24 horas. Foram produzidos 40, 21 ± 1,34 g/L de etanol em apenas 32 horas de processo (24 horas de pré-hidrólise + 8 horas de SSF a 38 °C). Contudo, esse valor poderia ser melhorado se um novo inóculo de leveduras fosse realizado quando a 2ª SSF teve início. Neste caso, aproximadamente 30 g/L a mais de etanol poderiam ter sido produzidos até o final do processo e de um modo geral essa estratégia poderia ter proporcionado aproximadamente 70 g/L de etanol, correspondente a até 0,49 g de etanol/g de celulose com 86,78 % de rendimento em etanol.

De forma geral, foi possível observar que há sim, possibilidades de se desenvolver uma hidrólise enzimática para altas concentrações de sólidos onde a conversão de celulose não diminua, proporcionando altas concentrações de açúcares fermentescíveis e conseqüentemente um teor considerável de etanol para que o processo de segunda geração seja viável. Além disso, ao realizar uma SSF de modo alternado, a inibição por produto final, que é precisamente o fator mais impactante no “efeito de sólidos” pode ser minimizada e até mesmo evitada, pois a glicose gerada é consumida rapidamente pelas leveduras. Do ponto de vista técnico o BAD se mostrou como a melhor biomassa para o processo de produção do E2G, porém, sabe-se que o BH é o que se apresenta como o mais economicamente viável nessa corrida.

**Tabela 10.1:** Comparação entre as conversões obtidas das principais estratégias de hidrólise enzimáticas propostas nesse trabalho.

Estratégia de hidrólise enzimática	Tempo reacional total (horas)	Conversão celulose em glicose (%)	
		BH	BAD
HE 20 % (m/v)	144	70,27 ± 1,72	73,00 ± 1,85
HE BA com adsorção prévia das enzimas (C1)	144	63,31 ± 0,22	86,33 ± 2,02
HE BA normal (C2)	144	66,18 ± 1,45	64,82 ± 0,49
HE duas etapas	48	43,43 ± 2,65	52,01 ± 0,28
R 12	48	37,37 ± 1,21	40,79 ± 0,25
HE em reciclos R 24	96	41,02 ± 0,69	52,39 ± 3,00
R 48	192	39,98 ± 0,18	51,50 ± 2,51

## SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Como uma forma de melhorar e aprofundar este estudo algumas sugestões para trabalhos futuros ficam listadas abaixo:

- Desenvolver uma metodologia precisa para estudar a interferência do acúmulo dos açúcares, glicose e xilose, durante a adsorção das enzimas do complexo celulolítico;
- Desenvolver um planejamento experimental para hidrólise enzimática em batelada alimentada na configuração C1 estudada neste trabalho, a fim de aprimorar a quantidade e o tempo em que o substrato é alimentado, bem como a quantidade de enzimas, para aumentar e melhorar a concentração de glicose e a conversão de celulose;
- Aprimorar os melhores resultados obtidos a partir do planejamento reproduzindo-os em reatores, com agitação e temperatura ideais.
- Realizar o balanço mássico global para o processo de produção do E2G considerando a hidrólise enzimática em batelada alimentada C1;
- Aperfeiçoar a SSF desenvolvida nesse trabalho ao melhorar os tempos das etapas que compõem o processo, bem como determinar uma estratégia de alimentação de substrato e microrganismos fermentativos visando à melhora da produção de etanol final;
- Aprimorar o processo de SSF ao fazer uma modelagem matemática dos dados colhidos em todas as etapas da SSF, considerando a presença dos inibidores. Usar o modelo matemático para simular e encontrar condições ótimas de operação;

Produzir uma análise econômica do processo global de produção do E2G para um processo em SHF e outro em SSF, levando em consideração o tipo de pré-tratamento empregado (não deslignifica e um deslignificante), a hidrólise enzimática em batelada alimentada C1 e a etapa de fermentação, e ou a SSF em batelada alimentada que seria aperfeiçoada no tópico anterior.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.
- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure. **LAP-006**, 1996.
- AGBOGBO FK, C.-K. G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters.**, v. 30, n. 9, p. 1515–1524, 2008.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–61, jul. 2010.
- ANDERSEN. **Enzymatic Hydrolysis of Cellulose - Experimental and Modeling Studies.** [2007] TECHNICAL UNIVERSITY OF DENMARK, 2007.
- ANDRADE, R. R. DE. Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células. [Doutorado] Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP., 2012.
- ANDRIĆ, P., MEYER, ANNE S, JENSEN, PETER A, K. D.-J. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 308–324, 2010.
- BANERJEE S, MUDLIAR S, SEN R, GIRI B, SATPUTE D, CHAKRABARTI T, ET AL. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 4, n. 77, 2010.
- BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J. M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. (Ed.). . Enología: fundamentos científicos e tecnológicos. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000. p. 274–315.
- BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2016.
- BLOTKAMP, P. J., TAKAQL, M., PEMBERTON, M. S., EMERT, G. H. No Title. 1978.
- BOMMARIUS, A. S. et al. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic engineering**, v. 10, n. 6, p. 370–81, nov. 2008.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, 2015.

CARA C, MOYA M, BALLESTEROS I, NEGRO MJ, GONZALEZ A, R. E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1003., 2007.

CHANDRA, R. P. et al. The influence of pretreatment and enzyme loading on the effectiveness of batch and fed-batch hydrolysis of corn stover. **Biotechnology Progress**, 2011.

CHEN, J. C. P. & CHOU, C. A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. In: Cane Sugar Handbook. 12. ed. New York: John Wiley & Sons, 1993.

CHENG Y-S, ZHENG Y, Y. C. Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, p. 1768–1784., 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar - Safra 2016/2017, primeiro levantamento.**

CONVERSE, A.O., MATSUNO, R., TANAKA, M., TANIGUCHI, M. . A model for enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme. **Biotechnology and bioengineering**, v. 32, p. 38–45., 1988.

CUEVAS, M. et al. Enhanced ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated olive stones. *Renewable Energy*, 2015.

CUI, M. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by integrated decrystallization and fed-batch operation. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 44659–44665, 2014.

D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Sugar utilization by yeast during fermentation. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 4, p. 315–324, 1989.

DA SILVA MARTINS, L. H.; RABELO, S. C.; DA COSTA, A. C. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, 2015.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M. M.; CURVELO, A. A. S. Lignin contributions to the nanoscale porosity of raw and treated lignocelluloses as observed by calorimetric thermoporometry. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 114–117, 2016.

DOMÍNGUEZ, J. M. O. Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomassa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. [s.l.] Universidade Complutense, Madrid, 2003.

DU, J. et al. Bioresource Technology Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 88–95, 2017.

FAN LT, LEE Y-H, B. D. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects om major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 22, p. 177–199, 1980.

FAN LT, LEE Y-H, B. D. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and bioengineering**, v. 23, p. 419–424., 1981.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: 1989.

FERREIRA AD, MUSSATTO SI, CADETE RM, ROSA CA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. *Yeast*, v. 28, p. 547–554, 2011.

GAO, Y. et al. Ethanol Production from High Solids Loading of Alkali- Pretreated Sugarcane Bagasse with an SSF Process. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 3466–3479, 2014a.

GAO, Y. et al. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 41–45, 2014b.

GARROTE G, DOMINGUEZ H, P. J. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 571–578., 2001.

GAUSS, W.F., SUZUKI, S., TAKAGI, M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments., 1976.

GENG, W. et al. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 43–48, 2015.

GLADIS, A. et al. Influence of different SSF conditions on ethanol production from corn stover at high solids loadings. *Energy Science and Engineering*, v. 3, n. 5, p. 481–489, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure Appl. Chem**, v. 59, p. 257–268, 1987.

GRUNO, M., VALJAMAE, P., PETTERSEN G. AND JOHANSSON, G. Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. **Biotechnology and bioengineering**, v. 86, p. 503–511, 2004.

GUILHERME, A. A. et al. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2015.

GUSAKOV, A.V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v.29, n. 09, p. 419-425, 2011.

GUSAKOV, A.V. AND SINITSYN, A. P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and  $\beta$ -glucosidase activity on the inhibition pattern. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, p. 663–671, 1992.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, nov. 2013.

HEIDORNE, F. O.; MAGALHÃES, P. O.; FERRAZ, A. L.; MILAGRES, A. M. F. No Title. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 436, 2006.

HODGE, D. B. et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Bioresource technology**, v. 99, n. 18, p. 8940–8, dez. 2008.

HODGE, D. B. et al. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, n. 1, p. 88–107, jan. 2009.

HOGAN, C. M., MES-HARTREE, M., SADDLER, J. N. No Title. (V. Chemie, Ed.)Proceedings of Third European Congress on Biotechnology. **Anais Munich**: Weinheim, 1984

HOLTZAPPLE, M., COGNATA, M., SHU, Y. AN. H. C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and bioengineering**, v. 36, p. 275–287, 1990.

HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. Figure 1, p. 14, jan. 2010.

HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. **Process Biochemistry**, 2013.

HOU X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205–214., 2012.

INGRAM, T. et al. Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part I: conversion of rye straw to valuable products. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5221–8, abr. 2011.

IOELOVICH, M. Recent Findings and the Energetic Potential of Plant Biomass as a Renewable Source of Biofuels—A Review. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 1879–1914, 2015.

JUNG, Y. H. et al. Fed-Batch Enzymatic Saccharification of High Solids Pretreated Lignocellulose for Obtaining High Titrers and High Yields of Glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 3, p. 1108–1120, 2017.

KADIC, A. **The effects of mixing on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass**. Lund University, 2017.

KLINKE HB, THOMSEN A, A. B. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10–26., 2004.

KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

KRISTENSEN, J. B. **Enzymatic hydrolysis of lignocellulose Enzymatic hydrolysis of lignocellulose**, 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 5, p. 426–433, abr. 2008.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource technology**, v. 100, n. 18, p. 4203–13, set. 2009.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource technology**, v. 81, n. 1, p. 33–44, jan.

2002.

LEE, J. W. Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: sugar recovery efficiency and structural characterization. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 296–301., 2015.

LEE H, BIELY P, LATTA RK, BARBOSA MFS, S. H. Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 320–324, 1986.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007.

LIU, K. et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4952–4958, 2010.

LIU, Y. et al. Sequential bioethanol and biogas production from sugarcane bagasse based on high solids fed-batch SSF. **Energy**, v. 90, p. 1199–1205, 2015.

LIU, Y. et al. Improved Ethanol Production Based on High Solids Fed- Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation with Alkali-Pretreated Sugarcane Bagasse. **BioResources**, v. 11, n. 1, p. 2548–2556, 2016.

LIU, Y. et al. Evaluation of the solvent water effect on high solids saccharification of alkali-pretreated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 12–17, 2017.

LÓPEZ-LINARES, J-C., ROMERO, I., CARA, C., RUIZ, E., MOYA, M., CASTRO, E. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, v. 122, p. 112–118, 2014.

LU X, ZHANG Y, A. I. Optimization of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3048–3053, 2009.

LYND, L. R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MA XX, YUE GJ, YU JL, ZHANG X, T. T. Enzymatic hydrolysis of cassava bagasse with high solid loading. **Jounal Biobased Mater Bioenergy**, v. 5, p. 275., 2011.

MACHADO, D. L. Estudo da adsorção das enzimas do complexo celulolítico em bagaço de

cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e avicel. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MACHADO, D. L. et al. Adsorption characteristics of cellulase and ??-glucosidase on Avicel, pretreated sugarcane bagasse, and lignin. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 681–689, 2015.

MACRELLI S, MOGENSEN J, Z. G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, p. 22–39, 2012.

MANSFIELD, S. D, MOONEY, C AND J. N. S. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology progress**, v. 15, p. 804–816, 1999.

MARGEOT, A. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372–80, jun. 2009.

MARTINS. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar**. Universidade Estadual de Campinas, 2015.

MATSUOKA, S. et al. **Bioenergia de cana (book chapter)**, 2012.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, 2014.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, ago. 2012.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—a review. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1430–1442, 2012.

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

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 2015.

NAKANISHI, S. C. et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production

from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.

NAKASU, P.Y.S, IENCZAK, L.J., COSTA, A.C. Acid post-hydrolysis of xylooligosaccharides from hydrothermal pretreatment for pentose ethanol production. **Fuel**, v. 185, p. 73–84, 2016.

NASCIMENTO, V. M ; NAKANISHI, S. C ; ROCHA, G. J. M. ; RABELO, S; PIMENTA, M. T. B; ROSSELL, C. E. V. . Effect of anthraquinone on alkaline pre-treatment and enzymatic kinetics of sugarcane bagasse saccharification: Laboratory and Pilot Scale approach. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2016.

NGUYEN NH, SUH SO, MARSHALL CJ, B. M. Morphological and ecological similarities: Wood-boring beetles associated with novel xylose fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp nov and *Candida jeffriesii* sp nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232–1241., 2006.

NOGUEIRA, L. A. H. Energia para o desenvolvimento sustentável. In: **Bioetanol de cana-de-açúcar**. Rio de Janeiro: CGEE, BNDS e, 2008.

OLIVEIRA MOUTTA, R. DE et al. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 1, n. S12, 2013.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, jan. 2008.

OLSEN, S. N. et al. The role of product inhibition as a yield-determining factor in enzymatic high-solid hydrolysis of pretreated corn stover. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 146–155, 2014.

OOSHIMA H, BURNS DS, C. A. adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on 446-452, cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. **Biotechnology and bioengineering**, v. 36, p. 446–452, 1990.

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

PARK, I. et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 487–492, abr. 2010.

PAULOVÁ, L. et al. High solid fed-batch SSF with delayed inoculation for improved production of bioethanol from wheat straw. **Fuel**, v. 122, p. 294–300, 2014.

PENGILLY, C. **Study of Enzymatic Hydrolysis to Improve Sugar Production from Steam-Pretreated Sweet Sorghum Bagasse and Triticale Straw**. Stellenbosch University, 2013.

PEREIRA, S. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.

PEREZ JA, BALLESTEROS I, BALLESTEROS M, SAEZ F, NEGRO MJ, M. P. Optimization liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel–ethanol production. **Fuel**, v. 87, p. 3640–3647, 2008.

QI, B.; CHEN, X.; WAN, Y. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4875–83, jul. 2010.

QUIN, W. **High consistency enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. [s.l.] University Of British Columbia, Vancouver, 2010.

RABELO, S. C. et al. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010.

RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 87–100, 10 nov. 2007.

RAMOS, L. P et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195-202, 2105.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92–102, 2016.

REZENDE, C. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for*

- Biofuels, v. 4, n. 1, p. 54, 2011.
- ROBL, D. et al. Use of Ascomycete Extracts in Enzymatic Cocktail Formulations Increases Sugar Cane Bagasse Hydrolysis. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 2, p. 559–565, 2016.
- ROSGAARD, L. et al. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007.
- RUDOLF, A. et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, 2005.
- SAHA, B. C.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Comparison of Separate Hydrolysis and Fermentation versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Wheat Straw to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*; **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 7, n. 3, p. 409–414, 2013.
- SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–95, set. 2008.
- SANTORO, D. C. J.; ASSIS, T.; DIONISIO, S. R.; IENCZAK, J. L.; RABELO, S. C. Scaling up dilute sulfuric acid pretreatment for sugarcane bagasse bioethanol production. Anais.San Diego, CA.: 37th **Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, 2015
- SANTOS et al. Potencial da Palha de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol. **Química Nova**, v. XY, n. 0, p. 1–7, 2012.
- SEIDL, P. R.; GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 48–53, 2016.
- SUN, F. F. et al. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79–80, p. 42–48, 2015.
- SUN, J. X., SUN, X. F., SUN, R. C. and SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydr Polym.**, 56, 195-204, 2004.
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, 2016.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.

**Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, maio 2002.

SZCZODRAK, J.; TARQOPSSKI, Z. Effect of Ethanol and Cellnlases on Particular Stages. **Acta Biotechnol**, v. 9, n. 6, p. 555–564, 1989.

TAKAGI, M., ABE, S., SUZUKI, S., EMERT, G. H., Y. No Title. (Ghose TK, Ed.)**Bioconversion Symposium**. Anais.Delhi: 1977.

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

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

WANG, W. et al. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 252–257, 2012.

WANG, W. et al. Highly efficient conversion of sugarcane bagasse pretreated with liquid hot water into ethanol at high solid loading. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 3, p. 298–304, 2016.

WANG, Z. et al. Fed-batch mode optimization of SSF for cellulosic ethanol production from steam-exploded corn stover. **BioResources**, v. 8, n. 4, p. 5773–5782, 2013.

WANG ET AL. Investigation of the pellets produced from sugarcane bagasse during liquid hot water pretreatment and their impact on the enzymatic hydrolysis. *Bioresoure Technol.* 190, 7–12. Wang, W., Zhuang, X., Yuan, Z., Yu, Q., Qi, W., 2015. Investigation of the pellet. **Bioresoure Technol**, v. 190, p. 7–12., 2015.

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

XIAO, X., BIAN, J., LI, M.F., XU, H., XIAO, B., SUN, R. C. Enhanced enzymatic hydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm by hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 41–47, 2014.

XU J, CHENG J, SHAMA-SHIVAPPA R, B. J. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2900–2903, 2010.

XU F, D. H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. **Applied Catalysis A: General**, v. 317, p. 70, 2007.

XUE, Y. et al. Split addition of enzymes in enzymatic hydrolysis at high solids concentration to increase sugar concentration for bioethanol production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 707–714, 2012a.

XUE, Y. et al. Process evaluation of enzymatic hydrolysis with filtrate recycle for the production of high concentration sugars. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 839–55, fev. 2012b.

YANG, K.-M. et al. Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 6, p. 675–84, set. 2012.

YANG, M. et al. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4884–4888, 2010.

YANG, J. et al. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. **Bioresource technology**, v. 102, n. 7, p. 4905–8, abr. 2011.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. December 2016, p. 475–501, 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quimica Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZHANG, Y-H. P. & LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnol. Bioeng**, v. 88, p. 798–824, 2004.

ZHANG, X. et al. Ethanol production by high-solids simultaneous saccharification and fermentation of cellulose-enriched barley straw and hull residues obtained by alkaline hydrogen peroxide pretreatment. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 4, 2014.

ZHANG, Y. et al. High solid and low enzyme loading based saccharification of agricultural biomass. **BioResources**, v. 7, n. 1, p. 345–353, 2012.

ZHANG J, CHU DQ, HUANG J, YU ZC, DAI GC, B. J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. **Biotechnology and bioengineering**, v. 105, p. 718, 2010.

ZHENG ET AL. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2, n. 3, p. 51–68, 2009.

ZHUANG, X. et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresource Technology**, 2016.

ZHOU, Y. et al. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**, 2015.

## APÊNDICES

### Apêndice I

#### PREPARO DO TAMPÃO CITRATO E DO REAGENTE DNS

Para realizar a análise de atividade da enzima celulase dos coquetéis enzimáticos Celluclast e Cellic Ctec 2, uma solução tampão citrato de sódio a pH 4,8 e concentração de 0,05m/L foi preparada. Esse tampão também foi utilizado em todas as hidrólises enzimáticas realizadas nesse trabalho, entretanto azida sódica era adicionada na proporção de 0,07 g por g de bagaço. A metodologia da atividade da celulase leva o uso do reagente Ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS), necessário para realizar a quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação enzimática. Assim, é apresentada a metodologia destes reagentes utilizados no presente trabalho.

##### 1. Tampão citrato

Para o preparo do tampão citrato 0,05 mol/L com pH 4,8 foram pesados exatamente 10,5g de ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ), a qual foi dissolvida em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) de forma a alcançar um pH de 4,3, e então, completou-se o volume para 50mL, seguindo da medição do pH. Obteve-se, assim tampão citrato a pH 4,5 e concentração de 1 mol/L. Ao se transferir este conteúdo para um balão volumétrico de 1000mL e completar o volume do balão obteve-se a condição desejada de pH 4,8 na concentração de 0,05mol/L.

##### 2. Reagente DNS

O reagente DNS foi preparado de acordo com a metodologia BAZÁN (1993) onde foram dissolvidos 10,6 g de ácido dinitro-3,5-salicílico em 1,416 L de água. Adicionou-se, em seguida, 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de meta-bissulfito de sódio e 19,8g de NaOH. À Parte, foi preparada uma solução estabilizante da cor formada do DNS, adicionando 15,1 g/L de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, que foi guardada também em frasco âmbar. Ambos foram armazenados em frascos âmbar, para evitar possíveis degradações.

## Apêndice II

### ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA CELULASE

#### 1. Curva padrão de glicose

A solução de glicose foi feita utilizando-se a glicose anidra com pureza de 98% para preparar uma solução de concentração de 10mg/mL e a partir desta foram feitas outras dez diluições. Esta curva foi feita em triplicata. Ao invés de se utilizar água destilada para preparar a soluções padrão de glicose, foi utilizada a solução tampão de citrato a pH 4,8, de modo a manter todas as amostras sob os mesmos meios e nas mesmas condições. Assim, a curva foi preparada em uma faixa de 0 a 10mg/L e as amostras ficaram armazenadas em tubos de ensaio de 25mL para serem submetidas à análise de DNS (preparado conforme item 2 do Apêndice I) para a quantificação dos açúcares redutores. A análise dos açúcares redutores com o DNS é feita pela adição de 1,5 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Ao final, adicionou-se 10,5 mL da solução estabilizante e os tubos foram invertidos para a homogeneização da solução. Após todo o procedimento descrito, estas amostras foram analisadas em espectrofotômetro utilizando absorvância de 540nm.

#### 2. Atividade da enzima celulase presente nos coquetéis enzimáticos Celluclast e Cellic Ctec 2.

Para determinação da atividade da celulase seguiu-se a metodologia descrita por Rabelo (2010). Foi preparada uma solução de celulase 1:20 e a partir desta foram feitas novas 5 diluições em tampão citrato pH 4,8. 50 mg de papel de filtro Whatman No. 1 picado foram exatamente pesados em tubos de ensaio com tampa. A estes tubos adicionou-se 1mL de tampão citrato, de forma que o papel estivesse totalmente submerso neste meio. Em paralelo, realizou-se o preparo dos tubos controle da enzima, onde foi retirada uma alíquota de 0,5 mL de cada uma das diluições enzimáticas preparadas previamente, transferindo-as para tubos de ensaio de ensaio contendo 1mL de tampão citrato. Um tubo para controle do substrato também foi preparado adicionando-se a mesma quantidade de papel picado com 1,5 mL de tampão citrato. O tubo do branco reacional foi realizado adicionando somente 1,5mL do tampão citrato.

Todos os tubos foram levados a um banho termostático a temperatura de 50°C durante 10 min; sem retirar os tubos do banho, foram adicionados 0,5mL das enzimas previamente

diluídas somente nos tubos para atividade enzimática. Após esta etapa, esperou-se o tempo de 60min para a encubação das enzimas. E ao final desse tempo, todos os tubos foram removidos e a reação interrompida imediatamente com a adição de 3 mL do reagente DNS. Os tubos foram fervidos por 5 minutos a 95°C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Ao final, os tubos foram invertidos para a homogeneização da solução. Após assentamento do papel, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro utilizando absorvância de 540nm. Para isso pipetava-se diretamente nas cubetas 0,2 mL da solução de cada tubo juntamente com 2,5 mL de água destilada.

Com os resultados obtidos, foi traçada uma reta onde foi relacionado o logaritmo da concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada pela enzima diluída (no caso para cada 0,5 mL da respectiva enzima diluída), desde modo, determinou-se a atividade enzimática da celulase.

Uma unidade enzimática (FPU) pela teoria é definida como a quantidade de enzima que libera 2,0 mg de açúcar redutor como glicose a partir de 50 mg de papel de filtro nas condições do ensaio. Para o cálculo da atividade específica (AE) da celulase, expressa em termos de FPU por mililitro de proteína, foi utilizada a Equação 10-1:

$$FPU / mL = \frac{0,37}{[enzima\ diluída]}$$

Equação 10-1

Em que [enzima diluída] é a concentração de enzima (mg/mL) necessária para transformar 50 mg de substrato em 2 mg de glicose, o numerador 0,37 é derivado do fator de conversão de 2,0 mg de glicose gerados no ensaio por mmol de glicose, a partir do volume de enzima (0,5 mL) utilizado e do tempo requerido para geração dos açúcares redutores (Equação 10-2):

$$FPU / mL = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 \times [enzima\ diluída])} \mu mol. \min^{-1} . mL^{-1}$$

Equação 10-2

Apesar da constante 0,37 ter seu cálculo baseado nas unidades internacionais de atividade do Sistema Internacional de medidas (S.I.), a celulase não tem sua atividade determinada nestas unidades, pois são baseadas nas taxas iniciais de reação, portanto, esta enzima deve ter sua atividade expressa simplesmente como FPU.

### Apêndice III

## QUANTIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS E PRODUTOS DE DECOMPOSIÇÃO LIBERADOS DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA POR HPLC

### 1. Construção da curva padrão e método de análise

As concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético presentes nos filtrados das hidrólises enzimáticas realizadas, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência no cromatógrafo líquido modelo 1260 Infinity HPLC Agilent Technologies com o detector de índice de refração IR.

Os padrões para as soluções dos açúcares e do ácido acético foram realizados na faixa de concentração conforme a Tabela 10.2.

**Tabela 10.2:** Concentração dos padrões usados na construção das curvas de calibração.

<b>Padrões</b>	<b>Faixa de concentração (g/L)</b>
<b>Arabinose</b>	0,03-10,05
<b>Celobiose</b>	0,03-10,05
<b>Xilose</b>	0,05-10,05
<b>Glicose</b>	0,05-20,00
<b>Ácido acético</b>	0,01-5

Foi utilizada a coluna para ácidos Aminex HPX-87H em temperatura de 35 °C. A fase móvel foi preparada com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com pH de 2,6 utilizando-se água destilada e deionizada. Após o preparo a fase móvel foi filtrada a vácuo em Membrana HA em ésteres de celulose com 0,45 µm e 47 mm de diâmetro da marca Millipore, e em seguida levada para aparelho Ultrassom da marca Unique – UltrasonicCleaner computadorizada, para retirar qualquer ar da solução e assim, evitar danos à coluna e interferências nas análises. O fluxo de fase móvel utilizado foi de 0,6 mL/min. O volume de injeção das amostras utilizado foi de 15 µL. Os compostos foram separados na fase estacionária e monitorados com o detector de índice de refração (IR) a temperatura 35 °C por um tempo de execução de 20 min.

As concentrações de cada componente foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e as curvas padrões.

## Apêndice IV

### MEIO DE ATIVAÇÃO E MEIO DE CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO *S. cerevisiae*

1. A composição e quantidades dos reagentes utilizados para preparar o meio de ativação para cultivar a *S. cerevisiae* estão dispostas na Tabela 10.3 a seguir.

**Tabela 10.3:** Reagentes para meio de ativação do microrganismo.

Reagente	Composição (g/L)
Extrato de levedura	3
Extrato de Malte	3
Peptona	5
Glicose	10

**Tabela 10.4:** Meio de crescimento dos microrganismos: reagentes utilizados e a quantidade.

Reagentes	Composição (g/L)
Sacarose	20
Extrato de levedura	5
Fosfato de potássio dibásico anidro (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5
Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl)	1,5
Cloreto de potássio (KCl)	1,15
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O)	0,65

## Apêndice V

### DADOS DE CELOBIOSE

1. As Tabelas 10.5 e 10.6 exibem dados de celobiose (g/L) do BH e do BAD, respectivamente, para as hidrólises enzimáticas convencionais realizadas.

**Tabela 10.5:** Concentração de celobiose alcançada durante as hidrólises enzimáticas convencionais do BH com variação na carga de sólidos de 1 a 20 % (m/v).

Tempo (horas)	BH - 1%	desvio	BH - 5%	desvio	BH - 10%	desvio	BH - 15%	desvio	BH - 20%	desvio
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.13	0.00	0.80	0.03	1.64	0.18	2.90	0.36	-	-
6	0.38	0.31	0.84	0.03	1.87	0.52	3.21	0.10	-	-
9	0.35	0.31	0.78	0.07	2.33	0.12	3.42	0.15	4.29	0.13
12	0.57	0.02	0.67	0.24	2.54	0.10	3.66	0.21	4.50	0.08
24	0.14	0.01	0.60	0.74	2.79	0.24	4.47	0.05	5.49	0.07
48	0.30	0.26	1.23	0.05	2.27	0.94	4.81	0.52	7.23	0.01
72	0.12	0.01	1.13	0.04	3.17	0.24	4.68	0.60	6.86	0.11
96	0.21	0.07	1.08	0.05	2.77	0.17	4.63	0.36	6.81	0.10
144	0.24	0.01	1.04	0.02	2.95	0.00	4.67	0.42	6.75	0.09

**Tabela 10.6:** Concentração de celobiose alcançada durante as hidrólises enzimáticas convencionais do BAD com variação na carga de sólidos de 1 a 20 % (m/v).

Tempo (horas)	BAD - 1%	desvio	BAD - 5%	desvio	BAD - 10%	desvio	BAD - 15%	desvio	BAD - 20%	desvio
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.15	0.00	0.73	0.05	1.51	0.10	2.35	0.11	-	-
6	0.13	0.02	0.80	0.08	1.59	0.04	2.60	0.10	-	-
9	0.17	0.04	1.27	0.86	1.76	0.07	2.74	0.13	12.62	0.12
12	0.13	0.02	0.92	0.10	1.87	0.00	3.18	0.10	12.84	0.07
24	0.15	0.00	0.94	0.01	2.37	0.15	1.29	0.09	14.68	0.03
48	0.15	0.00	1.16	0.08	1.10	0.22	1.80	0.02	1.52	0.01
72	0.13	0.02	1.03	0.13	0.91	0.09	2.03	0.04	15.87	0.04
96	0.14	0.00	0.68	0.09	1.14	0.15	1.86	0.13	3.87	0.70
144	0.44	0.38	0.73	0.01	1.22	0.01	1.99	0.08	3.07	0.32

2. As Tabelas 10.7 e 10.8 abaixo exibem dados de celobiose em g/L para as hidrólises em batelada alimenta nas configurações com adsorção prévia das enzimas (C1) e alimentação convencional (C2) para os bagaços BH e BAD, respectivamente.

**Tabela 10.7:** Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em batelada alimentada para o BH nas configurações C1 (alimentação de bagaço com adsorção prévia das enzimas) e C2 (alimentação de bagaço em base seca).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>BH - C2</b>	<b>desvio</b>	<b>BH - C1</b>	<b>desvio</b>
0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	2.31	0.03	2.04	0.36
6	2.15	0.45	2.20	0.37
9	2.97	0.02	2.97	0.18
12	3.21	1.75	4.52	0.22
18	5.56	0.12	5.22	0.02
24	6.53	0.07	5.73	0.11
48	8.79	0.16	7.14	0.02
72	8.28	0.47	6.26	0.82
96	8.30	0.18	7.07	0.05
144	8.16	0.30	6.71	0.13

**Tabela 10.8:** Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em batelada alimentada para o BAD nas configurações C1 (alimentação de bagaço com adsorção prévia das enzimas) e C2 (alimentação de bagaço em base seca).

<b>Tempo (horas)</b>	<b>BAD - C2</b>	<b>desvio</b>	<b>BAD - C1</b>	<b>desvio</b>
0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	1.58	0.02	1.44	0.44
6	1.75	0.07	1.86	0.02
9	2.57	0.04	2.64	0.05
12	2.99	0.01	3.28	0.30
18	4.86	0.20	4.17	0.02
24	6.29	0.15	4.85	0.37
48	5.88	0.07	2.49	0.02
72	6.54	0.87	3.18	2.00
96	4.61	0.25	4.96	0.04
144	12.00	0.53	9.68	0.16

3. As Tabelas 10.9 e 10.10 abaixo exibem dados de celobiose em g/L para as hidrólises realizadas com ciclos do sobrenadante nas configurações R 12, R 24 e R 48 para os bagaços BH e BAD, nessa ordem.

**Tabela 10.9:** Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em reciclos nas configurações R 48, 24 e 12 para o BH. As concentrações de sólidos estão em m/v.

Ciclos BH	R48		R24		R12	
	Celobiose	desvio	Celobiose	desvio	Celobiose	desvio
1ª H-15%	6.41	0.109	4.88	0.01	4.41	0.05
2ª H- 5%	8.18	0.022	6.27	0.03	5.60	0.04
3ª H- 5%	10.87	1.418	8.30	0.22	6.71	0.21
4ª H- 5%	11.59	0.024	9.25	0.10	8.62	0.21

**Tabela 10.10:** Concentração de celobiose (g/L) alcançada durante as hidrólises enzimáticas em reciclos nas configurações R 48, 24 e 12 para o BAD. As concentrações de sólidos estão em m/v.

Ciclos BAD	R48		R24		R12	
	Celobiose	desvio	Celobiose	desvio	Celobiose	desvio
1ª H-15%	4.22	0.15	6.36	0.02	8.76	0.05
2ª H- 5%	10.71	0.14	6.90	0.07	6.24	0.13
3ª H- 5%	12.24	0.02	10.22	0.03	7.18	0.19
4ª H- 5%	14.07	0.11	10.41	0.18	8.63	0.35