

"SACARIFICAÇÃO DA HEMICELULOSE DO
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SUA
FERMENTAÇÃO POR PACHYSOLEN TANNO
PHILUS"

10/85

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parar

*Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida
por Raúl Jorge Hernan Castro Gómez e aprovada pela Comissão
Julgadora em 01.07.85.
Campinas, 01 de julho de 1985.*


Presidente da Banca

"SACARIFICAÇÃO DA HEMICELULOSE DO
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR E SUA
FERMENTAÇÃO POR PACHYSOLEN TANNOPHILUS"

NOME: RAÚL JORGE HERNAN CASTRO GÓMEZ
ENG. DE PESCA

ORIENTADOR

DR. YONG KUN PARK

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALI-
MENTOS E AGRÍCOLA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAM-
PINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE "DOUTOR EM CIÊN-
CIAS DE ALIMENTOS"

CAMPINAS

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

r	2279A
	Ex.
o BC/	6431
3C	

CM-00030365-6

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos	i
Resumo	ii
Summary	iv
Índice de Quadros	vi
Índice de Figuras	ix
 Capítulo	
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1. Introdução	05
2.2. Características dos resíduos lignocelulósicos ..	07
2.3. Pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos ...	10
2.4. Hidrólise dos resíduos lignocelulósicos	15
2.5. Produção de etanol de resíduos lignocelulósicos.	24
III. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Materiais	29
3.1.1. Equipamentos	29
3.1.2. Reagentes	30
3.1.3. Bagaço de cana de açúcar	30
3.1.4. Microrganismos	30
3.1.5. Reator para o processo de explosão-autohidrólise	31
3.2. Métodos	33
3.2.1. Produção de enzimas celulolíticas	33
3.2.2. Determinação da atividade enzimática	33
3.2.3. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar	35

3.2.4. Obtenção do extrato alcalino do bagaço de cana de açúcar.....	35
3.2.5. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar pelo processo de explosão-autohidrólise.....	36
3.2.6. Hidrólise das frações do bagaço de cana de açúcar por enzimas celulolíticas ou por ácido.....	37
3.2.7. Fermentação alcoólica de diversos açúcares e hidrolisados de bagaço de cana de açúcar...	38
3.2.8. Cromatografia de Papel.....	39
3.2.9. Determinação da celulose.....	40
3.2.10. Determinação da hemicelulose.....	41
3.2.11. Determinação da lignina.....	43
3.2.12. Determinação de açúcares redutores.....	44
3.2.13. Determinação de umidade.....	44
3.2.14. Determinação de etanol.....	45
3.2.15. Massa Celular.....	46
3.2.16. Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	46
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Produção de enzimas celulolíticas.....	47
4.2. Pré-tratamento alcalino de bagaço de cana de açúcar.....	49
4.3. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar pelo processo de explosão-autohidrólise.....	51
4.4. Hidrólise das frações do bagaço de cana de açúcar por enzimas celulolíticas.....	55
4.5. Fermentação alcoólica.....	59
4.5.1. Fermentação alcoólica de xilose e glicose por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL y-2460.....	60

4.5.2. Fermentação alcoólica do hidrolisado en- zimático e ácido da Fração II, obtida do pré-tratamento alcalino do bagaço de ca- na de açúcar, por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL y-2460.....	69
4.5.3. Fermentação alcoólica do hidrolisado en- zimático e ácido da Fração IV obtida do pré-tratamento explosão-autohidrólise do bagaço de cana de açúcar por <i>Pachysolen</i> <i>tannophilus</i> NRRL y-2460.....	78
V. CONCLUSÕES.....	91
ANEXO I.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

AGRADECIMENTOS

- . Ao Prof. Dr. Yong Kun Park da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola - Dep. Ciência de Alimentos - Laboratório Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio e estímulo permanente na condução do presente trabalho.
- . À Escola Superior de Agricultura de Lavras pelo apoio e liberação concedida para realizar este curso.
- . Aos meus amigos e colegas do Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras pela sua compreensão.
- . À CAPES/PICD pela bolsa de estudo concedida.
- . À Hélia pela sua valiosa ajuda na correção deste trabalho.
- . Às minhas amigas Vitória, Lúcia, Ingrid e Regina pela suas sugestões e a todos os amigos que direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste trabalho.
- . Ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de Prof. Dr. Ulf F. Schuchardt pelas facilidades concedidas para o uso do reator empregado no processo de explosão-autohidrólise.
- . À Cidinha pelo seu apoio, compreensão e amor nos momentos que precisei.
- . À Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, ABIA pelas cópias deste trabalho.

RESUMO

A informação apresentada neste trabalho mostra os resultados da pesquisa na produção de glicose e xilose do bagaço de cana de açúcar e sua subsequente fermentação a etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460.

O bagaço de cana de açúcar foi submetido a processos de pré-tratamentos com alcali e de explosão - autohidrólise antes da sua sacarificação enzimática e ácida com celulasas do *Trichoderma reesei* QM 9414 e com solução 5% de H_2SO_4 , respectivamente. Quando o bagaço de cana de açúcar foi tratado a $200^{\circ}C$ durante 4,0 minutos com uma relação água: bagaço de 8:1, o rendimento de extração da hemicelulose pelo pré-tratamento, com alcali, forneceu uma fração fermentecível a etanol. Após a neutralização da solução até pH 5,0, a hemicelulose foi recuperada do filtrado obtido no pré-tratamento com alcali por uma precipitação com álcool etílico (95%), seguido de um processo de deslignificação com etanol a $70^{\circ}C$ por 4 horas. Ambas frações de hemicelulose, do processo de explosão - autohidrólise (fração IV) e do pré-tratamento com alcali (fração II) foram submetidos a uma hidrólise ácida e enzimática.

A sacarificação foi inibida por substâncias de baixo peso molecular não voláteis, introduzidas pelo processo de explosão-autohidrólise do bagaço de cana de açúcar. Estas substâncias inibidoras foram eliminadas por um processo de diálise.

A eficiência da sacarificação foi de 36-94%, dependendo da concentração de sólidos presentes no líquido de autohidrólise. O maior grau de sacarificação correspondeu a

fração de hemicelulose obtida pelo pré-tratamento alcalino (fração II) seguida da fração de hemicelulose dialisada, obtida pelo processo de explosão-autohidrólise (fração IV).

A levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460 foi capaz de transformar a D-xilose, D-glicose e ambos hidrolisados do bagaço de cana de açúcar obtidos de acordo ao indicado acima, a etanol, sob as condições de fermentação de 32°C, 200 rpm., e pH 2,5-3,0.

Meios de cultura contendo uma concentração inicial de 24,5 g de D-xilose/L, rendeu 0,158 g de etanol/g de D-xilose consumida. Durante a fermentação alcoólica da D-glicose à concentração inicial de 21,5 g de D-glicose/L, a produção de etanol foi 0,384 g/g de D-glicose consumida. A fermentação alcoólica dos hidrolisados enzimáticos das frações IV e II do bagaço de cana de açúcar, produziram 0,098 e 0,10 g de etanol/g de açúcar redutor consumidos respectivamente. Os hidrolisados ácidos destas frações produziram muito pouco ou nada de etanol. Os baixos rendimentos de etanol foram o resultado das condições sub-ótimas de fermentação, principalmente à condição de aeração que favoreceu a formação de biomassa.

SUMMARY

The information presented in this work covers research findings on the production of glucose and xylose from sugar cane bagasse and the subsequent direct fermentation of those sugars to obtain ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460.

Sugar cane bagasse was subjected to heat explosion and alkali pre-treatments prior to enzymatic and acid saccharification with *Trichoderma reesei* QM 9414 cellulases and 5% H_2SO_4 solution, respectively. When the sugar cane bagasse was treated at 200°C for 4 minutes at a water-to-solids ratio of 8:1, the yield of hemicellulose extraction was maximum. A sodium hydroxide extraction yielded a hemicellulose fraction available for fermentation to ethanol. After the neutralization of the solution to pH 5.0, the hemicellulose was recovered from the liquid filtrates of the alkali pre-treatment, by ethyl alcohol (95%) precipitation followed by deslignification with ethanol at 70°C for 4 hours. Both hemicellulose fractions from the heat explosion (fraction IV) and alkali pre-treatments (fraction II), were subjected to enzymatic and acid hydrolyses.

The saccharification was inhibited by low molecular weight-non volatile substances, introduced by the heat explosion process of the sugar cane bagasse. Those inhibitory substances were eliminated by a dialyzed process. The saccharification efficiency was between 36 and 94%, depending of the solids concentration present in the auto-hydrolyzed liquid. The highest degree of saccharification corresponded to the hemicellulose fraction obtained by the alkali pre-treatment

(fraction II), followed by the dialyzed hemicellulose fraction obtained from the heat explosion process (fraction IV).

The yeast *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460 was found to be capable of converting D-xilose, D-glucose and both enzymatic hydrolysates from sugar cane bagasse, obtained by the above mentioned pre-treatments, to ethanol under the fermentation conditions of 32°C, 200 rpm and pH 2.5-3.0

Batch culture initially containing 24.5 g. of D-xylose/L, yielded 0.158 g of ethanol/g of D-xylose consumed. During D-glucose fermentation at an initial concentration of 21.5 g of D-glucose/L the production of ethanol of the enzymatic hydrolysates of the hemicellulose fraction of the sugar cane bagasse, gave 0.098 and 0.10 g ethanol/g of reducing sugars consumed for fractions IV and II, respectively. Both acid hydrolysates of these fractions gave negligible quantities of ethanol. The low yield of ethanol obtained were the result of the sub-optimal fermentation conditions, particularly the aeration condition through out the process which promote mainly biomass production.

ÍNDICE DE QUADROS

Página

QUADRO 01	Produção de enzimas celulolíticas de <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 por fermentação semi-sólida	47
QUADRO 02	Hidrólise enzimática do bagaço de cana e da hemicelulose do bagaço de cana pela preparação enzimática de <i>T.reesei</i> QM 9414, celulase e hemicelulase comerciais	48
QUADRO 03	Teor de celulose, hemicelulose e lignina nas diferentes frações de bagaço de cana obtidos pelo tratamento alcalino	51
QUADRO 04	Efeito da relação água:bagaço na extração de hemicelulose durante o pré-tratamento de explosão-autohidrólise do bagaço de cana	52
QUADRO 05	Teor de celulose, hemicelulose e lignina nas frações IV e V do bagaço de cana de açúcar obtidas pelo pré-tratamento de explosão-autohidrólise	55
QUADRO 06	Concentração de xilose, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação por <i>P. tannophilus</i> NRRL y-2460.....	96

QUADRO 07	Concentração de glicose, crescimen <u>to</u> celular e produção de e etanol durante a fermentação por <i>P.</i> <i>tannophilus</i> NRRL y-2460.....	97
QUADRO 08	Estudo cinético da fermentação de xilose e glicose por <i>Pachysolen</i> <i>tannophilus</i> NRRL y-2460 :.....	61
QUADRO 09	Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hi drolisado enzimático da Fração II por <i>P. tannophilus</i> NRRL y-2460.....	98
QUADRO 10	Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hi drolisado ácido da Fração II por <i>P. tannophilus</i> NRRL y-2460.....	99
QUADRO 11	Produção de etanol por <i>Pachysolen</i> <i>tannophilus</i> NRRL y-2460 a partir de vários açúcares	75
QUADRO 12	Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hi drolisado enzimático da Fração IV por <i>P. tannophilus</i> NRRL y-2460.....	100

QUADRO 13	Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado ácido da Fração IV por <i>P. tannophilus</i> NRRL y-2460.....	101
QUADRO 14	Inibição das celulases do <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 pelos sólidos presentes no líquido de explosão-autohidrólise.....	88

FIG. 01	Hidrólise da celulose	22
FIG. 02	Hidrólise da celulose	23
FIG. 03	Reator para o processo explosão-auto- hidrólise	31
FIG. 04	Sistema de aquecimento e agitação do reator utilizado no processo explosão- auto-hidrólise	32
FIG. 05	Ciclone separador utilizado no proces- so de explosão-auto-hidrólise	32
FIG. 06	Fluxograma do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar	50
FIG. 07	Hidrólise enzimática e ácido do extra- to líquido do processo de explosão-au- tohidrólise	53
FIG. 08	Hidrólise enzimática das frações do ba- gaço de cana de açúcar, obtidas do pre- -tratamento alcalino e do processo de explosão-autohidrólise	56
FIG. 09	Consumo de xilose e glicose durante a fermentação por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	62
FIG. 10	Produção de etanol de xilose e glicose durante a fermentação por <i>Pachysolen</i> <i>tannophilus</i> NRRL Y-2460	63
FIG. 11	Crescimento de <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 durante a fermentação al- coólica de xilose e glicose	64

FIG. 12	Consumo de açúcares redutores dos hidrolisados enzimáticos e ácidos da Fração II durante a fermentação por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	70
FIG. 13	Produção de etanol dos hidrolisados enzimáticos e ácidos da Fração II durante a fermentação por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	71
FIG. 14	Crescimento de <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 durante a fermentação alcoólica dos hidrolisados enzimáticos e ácido da Fração II	72
FIG. 15	Crescimento de <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 durante a fermentação de xilose e do hidrolisado enzimático da fração II	79
FIG. 16	Consumo de glicose e xilose do hidrolisado enzimático da fração IV, durante a fermentação alcoólica por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	80
FIG. 17	Consumo de açúcares redutores dos hidrolisados enzimáticos e ácidos da fração IV durante a fermentação alcoólica por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	81

FIG. 18	Produção de etanol dos hidrolisados enzimáticos e ácidos de fração IV durante a fermentação por <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	82
FIG. 19	Crescimento de <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 durante a fermentação alcoólica dos hidrolisados enzimáticos e ácidos da Fração IV	83
FIG. 20	Crescimento de <i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460 durante a fermentação de xilose e do hidrolisado enzimático da Fração IV	89

I. INTRODUÇÃO

O melhoramento na qualidade de vida da população exige uma solução urgente dos problemas de carência de alimentos, da escassez energética e da poluição.

O aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos tem sido apresentado como uma solução alternativa que abrange o contexto dos três problemas acima mencionados. Estes resíduos podem ser aproveitados para a produção de adubos orgânicos, ração animal, proteínas de unicelulares e glicose (11; 18; 54; 89; 97). Da atual crise energética decorre a sua grande importância como fonte de recursos renováveis para a produção de combustíveis. Por via direta, através de queima, pode-se obter, no caso do bagaço de cana, 1814 Kcal por kilo de bagaço com 50% de umidade (63). Por via indireta, destacam-se a produção de metano e etanol, utilizando processos de fermentação (17; 106). A conversão de resíduos orgânicos a metano é uma característica própria dos ecossistemas anaeróbicos naturais. Este processo, conhecido como digestão anaeróbica, além de produzir o metano produz um resíduo digerido de boas características fertilizantes que permitem seu uso como adubo orgânico. Hoje aparece como um processo alternativo interessante para suplementar fontes de energia convencionais e diminuir a poluição do ambiente.

Há muito interesse atualmente na aplicação de enzimas celulolíticas para a bioconversão dos resíduos lignocelulósicos em açúcares fermentecíveis. Estes açúcares podem ser utilizados como matéria prima para a obtenção de produtos químicos, incluindo etanol combustível. Um resíduo lignocelulô-

sico que tem um potencial muito grande para sua bioconversão é o bagaço de cana de açúcar, um resíduo da indústria do açúcar e das destilarias autônomas produtoras de etanol combustível. No Brasil, o Proálcool tem como meta a produção de 10,7 bilhões de litros de etanol, na safra 1985/1986. Tem-se então, em 1985, apenas para a produção de etanol, 135 milhões de toneladas de cana colhidas e considerando que uma tonelada de cana gera em torno de 300 kilos de bagaço, haverá então uma disponibilidade da ordem de 40 milhões de toneladas/ano desse resíduo. Tendo em vista que apenas 70% do bagaço é utilizado para a produção de vapor na própria indústria, haverá uma sobra de 12 milhões de toneladas/ano que deverão ser destinadas a outros fins já que, em caso contrário, constituirão um problema de poluição. O bagaço de cana como substrato para bioconversão apresenta as vantagens de conter um alto teor de carboidratos (celulose 40-50% e hemicelulose 20-40%), além de ser um substrato barato (é um resíduo), com um suprimento constante, ainda que estacional, dentro da fábrica de açúcar. Por outro lado, o conteúdo de aproximadamente 20% de lignina permite incluir o bagaço de cana de açúcar entre os materiais lignocelulósicos que são conhecidos pela resistência que tem à ação hidrolítica das enzimas e ao ataque microbiano. Esta característica do bagaço de cana deve-se principalmente à associação que existe entre os seus componentes polissacarídeos e a lignina, a qual atua como uma barreira protetora destes polissacarídeos. alguma forma de pré-tratamento é necessária para que estes polissacarídeos possam ficar acessíveis às enzimas que os transformam em monossacarídeos.

Características estruturais da celulose, tal como

o grau de cristalinidade, grau de polimerização, grau de incha-
mento pela água e a área de superfície de contato limitam o
acesso da enzima ao substrato e tem sido demonstrado que afe-
tam a velocidade da hidrólise enzimática da celulose.

Os métodos de pré-tratamento, que rompem a estrutura
ordenada da celulose e o complexo lignina-carboidrato, remo-
vem a lignina e aumentam a superfície de contato para que a en-
zima atue, promovem e aumentam a velocidade e extensão da hi-
drólise da celulose, em vários resíduos lignocelulósicos. As-
sim, há muitos problemas que solucionar em relação à utilização
destes materiais em processos de biodegradação. Estudos tem
demonstrado que por sacarificação eles produzem uma solução mis-
ta de pentoses e hexoses (122). As pentoses correspondem a
aproximadamente 1/3 e as hexoses a 2/3 do total dos açúcares re-
dutores obtidos. As leveduras comumente usadas na indústria
cervejeira produzem etanol muito eficientemente das hexoses ,
principalmente D-glicose, mas não conseguem fazê-lo da fração
de pentoses, compostas principalmente pela aldopentose D-xilose
e os processos utilizados atualmente para o aproveitamento de
resíduos lignocelulósicos estariam sub-utilizando a hemicelulo-
se que pode constituir até 40% desse material. Para aumentar a
eficiência desses processos, que visam a produção de etanol, é
importante a fermentação dos açúcares presentes na hemicelulo-
se. Do ponto de vista econômico um processo fermentativo que
utilize um único microrganismo e forme um só produto final, é
também de vital significância.

O objetivo básico deste trabalho foi estudar o fra-
cionamento do bagaço de cana de açúcar para obter um substrato
composto principalmente por xilose, que pudesse ser fermentado

a etanol pela levedura *Pachysolen tannophilus*, que se caracteriza pela sua capacidade de aproveitar, em processos de fermentação, tanto as hexoses como as pentoses.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Introdução

As estruturas ordenadas das macromoléculas, quando em estado natural, geralmente não permitem o acesso das enzimas que as degradam. Porém quando em condições modificadas, essas macromoléculas constituem substratos para a ação dessas mesmas enzimas. Exemplos típicos na área de polímeros incluem o amido abaixo do seu ponto de gelatinização e as fibras de celulose e hemicelulose cobertas pela lignina nos materiais lignocelulósicos.

A solução do problema de tornar as macromoléculas acessíveis às enzimas que as degradam, é de grande importância prática e econômica no aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, particularmente se os métodos de pré-tratamento são de baixo consumo de energia, não usam reagentes custosos e solubilizam ao mínimo estas macromoléculas. Os reagentes utilizados também devem ser facilmente retirados, de tal forma que não possam atuar como inibidores das enzimas subsequentemente utilizadas na hidrólise destes substratos. Obvias implicações existem também nos processos de fermentação (produção de etanol) onde microrganismos são utilizados para o aproveitamento dessas macromoléculas.

Os pré-tratamentos de materiais que serão fermentados posteriormente por microrganismos, podem produzir substâncias não fermentecíveis ou inibidoras do crescimento microbiano. Como exemplo, tem-se que durante a esterilização de meios de cultura contendo lactose, esta é transformada em lac

tulose, que não é fermentescível (111).

Na hidrólise ácida da celulose e de materiais lignocelulósicos, a falta de controle das condições do processo pode acarretar a formação de subprodutos tóxicos para os microrganismos, tais como produtos de degradação de lignina ou polifenóis (90). A baixa eficiência na degradação de resíduos de milho, por *Clostridium thermocellum*, foi atribuída à toxicidade da lignina presente; enquanto que na fermentação de hidrolisados de palha de trigo, pela levedura *Saccharomyces uvarum* e *Pachysolen tannophilus*, a inibição foi causada por substâncias produzidas durante os pré-tratamentos térmico e alcalino da palha (29).

Sabe-se que na composição geral dos resíduos lignocelulósicos encontram-se os biopolímeros celulose, hemicelulose e lignina. Conjuntamente com estas, aparecem em menor proporção pectinas, proteínas e outros polissacarídeos complexos (90). Pode-se estabelecer que para a utilização destes resíduos, seja na produção de alimentos e de compostos químicos ou na produção de energia, os processos de pré-tratamentos, sacarificação e fermentação são pontos críticos e é justamente nestas áreas que o esforço dos pesquisadores do mundo inteiro está sendo aplicado.

O problema básico, no caso dos pré-tratamentos, tem relação com o grande consumo de energia que estes processos exigem, o que afeta todo o balanço energético do sistema de bioconversão do resíduo lignocelulósico (22).

No caso da sacarificação as dificuldades relacionam-se com o mecanismo de hidrólise (62), o efeito da estrutura do resíduo em processo e a presença de inibidores enzimáticos.

cos (75; 99).

No caso da fermentação dos hidrolisados destes resíduos, o esforço está sendo aplicado na utilização das pentoses provenientes da hemicelulose e na eliminação de inibidores microbianos (29; 30).

A seguir apresenta-se uma revisão bibliográfica salientando os problemas básicos em relação a pré-tratamentos, hidrólise e fermentação dos resíduos lignocelulósicos.

2.2. Características dos resíduos lignocelulósicos

Ao redor de 90% dos materiais lignocelulósicos, tais como a palha de arroz, serragem de madeira, bagaço de cana-de-açúcar e outros são produzidos como resíduos derivados das práticas agrícolas. O resto provém dos resíduos urbanos e industriais (51).

Ainda que a produção anual destes resíduos seja suficiente para satisfazer a demanda de celulose, sua utilização é pequena, devido principalmente ao fato de que as tecnologias disponíveis são economicamente inviáveis (41). Estes resíduos tem um grande potencial para serem utilizados como substratos, na obtenção de proteínas unicelulares, enzimas celulolíticas e na produção de energia e combustíveis. Mas, para isso, devem ser hidrolisados por enzimas ou ácidos (38; 39; 63; 76; 120).

Os principais componentes dos resíduos lignocelulósicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina, que apresentam entre eles uma relação de peso, na maioria dos casos, de 4:3:3 respectivamente. No caso da madeira, esta relação é de 2:1:1 (60; 114).

A celulose é um homopolímero linear formada por unidades de glicose anidra, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4). O comprimento da macromolécula varia grandemente dependendo da fonte e do grau de processamento à qual tenha sido submetida (10; 40). A estrutura natural da celulose apresenta mais de 10.000 resíduos de β -glicose anidra. Isto significa que o peso molecular é de aproximadamente $1,5 \times 10^6$. O comprimento total desta molécula é de 5 μ m. As cadeias de celulose agregam-se para formar as fibrinhas elementares, que apresentam áreas ordenadas e outras menos ordenadas, denominadas áreas cristalinas e amorfas respectivamente (60). A proporção de material cristalino estima-se em 50-90% (35). A biodegradação da molécula de celulose está relacionada com a distribuição e configuração destas duas áreas, como também com a sua associação com outros polímeros que a protegem, tais como a lignina, hemicelulose, amido, proteínas e compostos minerais. (42; 45; 60).

As hemiceluloses são heteropolímeros constituídos por galactose, xilose, arabinose, e vários outros açúcares e também de seus ácidos urônicos (45; 51; 60). Tem-se apresentado de dois até seis resíduos de açúcares diferentes unidos por ligações β -(1-4). O grau de polimerização é geralmente 200. A forma mais abundante apresenta D-xilose na cadeia principal e L-arabinose nas cadeias laterais (60).

Depois da celulose, a hemicelulose é o material orgânico mais abundante na terra (60). Esta fração não tem recebido atenção como fonte de produção de combustíveis, embora constitua entre 10-40% dos carboidratos presentes em vários resíduos agrícolas (65).

Durante a hidrólise enzimática de resíduos celulósicos, tanto a hemicelulose como a celulose são degradadas nos seus respectivos açúcares, xilose e glicose, devido a atividade da hemicelulase nos sistemas de enzimas celulolíticos empregados. Por outro lado, durante a hidrólise ácida, a hemicelulose é hidrolizada mais rapidamente do que a celulose(45). Consequentemente a xilose produzida é totalmente decomposta em furfural, que produz problemas de inibição microbiana, no caso de utilizar o hidrolisado na produção de combustível ou de proteínas unicelulares(30; 45; 65). Por isto, qualquer processo que pretenda utilizar resíduos lignocelulósicos deve considerar a recuperação de hemicelulose ou seus monômeros de forma tal, que o processo seja economicamente viável. Isto também inclui o aproveitamento da lignina (45; 65).

A lignina é responsável em grande parte, pelas dificuldades que apresenta o hidrólise da celulose e hemicelulose, dos resíduos lignocelulósicos. Esta macromolécula está constituída por polímeros de fenilpropano, distribuídos ao acaso, formando uma estrutura tridimensional (45) e é o resultado dos produtos de desidratação de três álcoois monoméricos, álcool trans-p-coumarílico, o álcool trans-coniferílico o álcool trans-sinapílico. A proporção de cada um destes álcoois varia de acordo com o tipo de resíduo podendo ocorrer a presença de diferentes tipos de lignina dentro de uma mesma planta(39; 60). A sua estrutura varia muito em função do método de isolamento (3).

Como se sabe os materiais lignocelulósicos são relativamente resistentes à biodegradação. Assim para o aproveitamento eficiente destes materiais, métodos de pré-tratamentos devem ser utilizados os quais podem ser do tipo físico, físico/

químico ou biológicos e suas combinações (3; 31; 42; 76; 102; 103).

2.3. Pré-tratamento de Resíduos Lignocelulósicos

A susceptibilidade dos resíduos lignocelulósicos ao ataque enzimático depende basicamente, da facilidade de acesso do agente hidrolisante à celulose e hemicelulose. A suscetibilidade da celulose depende basicamente de suas características estruturais que podem agrupar-se como segue: a) grau de inchamento da fibra com água, b) grau de cristalinidade, c) ordenamento molecular, d) presença de lignina, e) estrutura capilar da fibra de celulose (35; 36). Estes fatores estão interligados e pode-se dizer que o grau de cristalinidade e o conteúdo de lignina, atuam de forma adversa à bioconversão (24). A susceptibilidade biológica da celulose aumenta quando o índice de cristalinidade diminui. A celulose é sacarificada rápida e completamente no caso em que o índice de cristalinidade é menor que 1,0 (99). Por outro lado, o tamanho do capilar, e teor de umidade e a área superficial da fibra de celulose são fatores que favorecem a bioconversão (22).

Para superar estes problemas, os materiais lignocelulósicos são submetidos a processos de pré-tratamento, visando aumentar sua bioconversão, através de modificações estruturais que controlam a velocidade e extensão da hidrólise. De acordo com isto, um processo de pré-tratamento efetivo deveria romper a estrutura cristalina, provocar uma mudança na área superficial da fibra de celulose, diminuir a associação protetora da lignina e manter a estrutura capilar na fibra (36)

(19). Estes pré-tratamentos podem ser processos físicos, biológicos, químicos ou combinações deles (22; 35). A tabela 1 apresenta alguns dos processos mais comuns utilizados para aumentar a digestibilidade dos compostos lignocelulósicos. Alguns processos são, de fato, uma combinação de vários tratamentos aplicados simultaneamente ou em sequência. Os processos físicos, em geral, são utilizados para reduzir o grau de cristalinidade, diminuir o grau de polimerização, aumentar a fração solúvel em água e reduzir o tamanho das partículas (31; 36). O uso de temperaturas na faixa de 150-200°C leva ao aumento da bioconversão dos materiais lignocelulósicos porque se produz um aumento do tamanho dos poros da fibra, autohidrólise e o umedecimento do material, permitindo um melhor acesso das enzimas à celulose (22).

Dos métodos químicos, o hidróxido de sódio é talvez o mais usado e conhecido (4; 73; 82; 84; 107). Sua aplicação resulta numa quebra de estrutura da lignina, hidratação e inchamento da celulose e diminuição do grau de cristalinidade, aumentando a digestibilidade do material celulósico (35; 86). Este método tem sido usado amplamente na deslignificação de uma grande variedade de materiais para aumentar a sua digestibilidade para uso na alimentação animal. Sua aplicação conjuntamente com peróxido de hidrogênio tem melhorado substancialmente a disponibilidade de carboidratos em esterco de ruminantes. Quando combinado com processos térmicos, tem melhorado a produção de metano na utilização do lixo urbano (86). Palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar tem sido deslignificados usando uma solução de hidróxido de sódio a 1%, em ebulição (113).

O uso de solventes que permitem a extração seletiva da celulose dos resíduos lignocelulósicos tem sido testado

TABELA 1. PRÉ-TRATAMENTO APLICADOS AOS RESÍDUOS
LIGNOCELULÓSICOS (33)

FÍSICOS	BIOLÓGICOS	QUÍMICOS
.MOAGEM	.MICRORGANISMOS	.HIDRÓXIDO DE SÓDIO
.DESAGREGAÇÃO		.AMONIA
.VAPOR A PRESSÃO		.ÁCIDO CLORIDRICO
.RADIAÇÃO		.ÁCIDO FOSFÓRICO
.TEMPERATURA		.DIÓXIDO DE ENXOFRE
.MACERAÇÃO		.ÁCIDO ACÉTICO
.EXPLOÇÃO-AUTOHIDRO- LISE		.PERÓXIDO DE HIDRO- GÊNIO
	COMBINAÇÕES	
	.MOAGEM A QUENTE	
	.HIDRÓXIDO DE SÓDIO E MOAGEM	
	.NO ₃ ⁻ E IRRADIAÇÃO	
	.H ₂ O ₂ E HIDRÓXIDO DE SÓDIO	

com êxito, destacando-se o cadoxen e a hidrazina (81; 99; 114). O processo completo inclui a eliminação da hemicelulose com uma solução alcalina quente ou ácidos diluídos para logo adicionar o solvente que dissolve a celulose, que é, desta forma, facilmente hidrolizável pelas celulasas (114).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com SO_2 gasoso, na presença de vapor, tem levado a um substancial aumento na bioconversão destes materiais. Este processo solubiliza a lignina deixando a estrutura do material mais aberta ao ataque enzimático. Seu uso está limitado por um problema de poluição similar ao que ocorre na indústria de de papel (22; 31).

Um método de pré-tratamento de interesse atual é o processo de explosão-autohidrólise (25). Este processo modifica física e quimicamente os resíduos lignocelulósicos, permitindo o fracionamento nos três principais polímeros que os constituem: a hemicelulose que permanece no líquido de autohidrólise, a lignina, que pode ser separada com metanol, etanol ou NaOH do bagaço pré-tratado e a celulose, encontrada na porção insolúvel. Este tratamento hidrotérmico a altas temperaturas (185-260°C) gera ácido acético, a partir dos grupos acetil termolábeis presentes na hemicelulose, que irá catalizar a hidrólise da própria hemicelulose (121; 122) (autohidrólise) e sua subsequente solubilização em água. Se a autohidrólise é realizada a altas pressões, seguida de uma rápida descompressão através de orifício e da remoção da lignina com álcalis ou álcool, o resíduo resultante é altamente susceptível à hidrólise por enzimas celolíticas (25). Por outro lado, tem-se verificado que no processo de explosão

-autohidrólise são produzidas substâncias inibidoras da β -glicosidase, do complexo de celulasas do *Trichoderma harzianum* E 80, que também inibem o crescimento de alguns microrganismos fermentadores, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas modilis* e *Klebsiella pneumonia* (75).

Nos últimos anos tem havido um grande esforço na procura de microrganismos que degradem a lignina, fato no qual se baseiam a maioria dos métodos biológicos de pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos. Recentemente, o fungo *Pleurotus ostreatus* foi utilizado na deslignificação parcial da palha de trigo. O rendimento da sacarificação aumentou 4-5 vezes depois de 50 dias de fermentação (27). O fungo *Sporotrichum pulverulentum*, isolado da serragem de madeira, degrada a celulose e os materiais lignocelulósicos de forma muito eficiente (32). O termófilo Actinomicete *Thermomonospora fusca* consegue um bom desenvolvimento na presença de 8-10% de lignina. Acima deste nível, o rendimento celular por grama de substrato diminui (21). Recentemente, uma espécie da *Candida* isolada de folhas em decomposição demonstrou um alto poder de degradação da lignina, eliminando mais de 50% em 24 h de cultivo (15). *Phanerochaete chrysosporium* (Burds) produz enzimas que degradam a lignina, sendo esta degradação estimulada na presença de glicose (55).

Os processos de pré-tratamento são, em geral, operações que precisam de energia. A quantidade de energia vai depender da severidade do processo que no caso dos pré-tratamentos físicos (mecânicos) ou termoquímicos, é grande. Se somarmos este consumo de energia ao que se precisa para a separação dos produtos, verifica-se que alguns processos de bio

conversão de resíduos lignocelulósicos são muito ineficientes em energia. No caso de materiais fibrosos (lignocelulósicos) moídos até um tamanho de partículas de 200mesh, em moinho de bolas, o consumo de energia é maior que a energia que contém o material em processo. Em geral, as necessidades energéticas nos pré-tratamentos que visam a redução do tamanho das partículas variam na faixa de 1,3 até 163% do conteúdo de energia do material. No caso de pré-tratamentos químicos, este valor varia entre 9 e 25%, dependendo da complexidade do processo. Se bem que os pré-tratamentos biológicos apresentam necessidades de energia de processo mínimos, as perdas de energia devidas à degradação da lignina e sacarídeos são comparáveis à energia necessária em outros processos de pré-tratamento, tais como o uso de SO_2 e vapor (22).

Sem dúvida que as necessidades energéticas no pré-tratamento vão afetar todo o balanço de energia do processo de bioconversão do material lignocelulósico, pelo que processos que utilizem materiais com tamanho de partículas relativamente grandes, deslignificação à temperatura ambiente (alcali) e processos de fermentação que utilizem substratos não estereis, terão vantagens significativas neste sentido.

2.4. Hidrólise dos Resíduos Lignocelulósicos

A celulose apresenta na sua estrutura regiões cristalinas e amorfas. A proporção de material cristalino estima-se em 50-90% (35). A porção fácil de hidrolisar corresponde à parte amorfa e a parte cristalina é mais resistente. Esta característica e a barreira de lignina são consideradas por al

guns pesquisadores como as principais causas das dificuldades para se hidrolisar a celulose (114). Por outro lado segundo Fan e col. (36) a característica estrutural mais importante neste sentido seria estrutura capilar da fibra de celulose. Isto devido ao fato de que a susceptibilidade da celulose à hidrólise esta determinada em grande parte pela sua acessibilidade às enzimas celulolíticas; contato fisico direto entre o substrato e enzima é pré-requisito fundamental para que a hidrólise aconteça. Já que a celulose é um composto estruturalmente complexo e insolúvel em água, este contato pode ser obtido somente por difusão da enzima no interior da complexa estrutura da celulose. Qualquer característica estrutural que limite a acessibilidade da celulose à enzima diminuiria a sua susceptibilidade à hidrólise. Sendo assim, a velocidade da reação deveria ser uma função da área da celulose que está em contato com a enzima (35). Tem-se reportado recentemente que a velocidade de hidrólise depende principalmente de cristalinidade mais do que da superfície de contato da celulose com a enzima (36;97). Tem sido também salientado que o grau de enchimento da celulose e não o grau de cristalinidade é o fator estrutural mais importante (65), já que um alto grau de enchimento aumenta o tamanho do poro (do capilar) sobre certo valor crítico o qual é necessário para permitir à molécula de enzima penetrar no substrato. Um substrato celulósico com alto grau de celulose amorfa pode ser hidrolisado de forma devagar, porque a enzima não pode penetrar através dos capilares por problemas de tamanho. Por outro lado, há também estudos realizados levando em conta o tamanho de partículas, indicando que o mesmo não afeta a velocidade de digestão da celulose em forma significativa, já que as grandes partículas formam agregados soltos de partículas meno-

res, pelo que na realidade não há diferença significativa na relação superfície/volume (54; 121).

A água tem um profundo efeito sobre a estrutura da celulose, sendo a porção amorfa a mais afetada. A superfície específica da celulose aumenta drásticamente após umedece-la e quando é submetida a secagem com ar, a sua estrutura é modificada notavelmente (36). A estrutura capilar dilatada pode ser parcialmente mantida no caso em que a água seja substituída por um solvente polar orgânico (metanol) e este por sua vez substituído por um solvente orgânico não polar (benzeno) que é removido da celulose por secagem com ar (36).

A sacarificação dos resíduos lignocelulósicos pré-tratados pode realizar-se por ação de ácidos minerais ou enzimas celulolíticas. No caso da hidrólise ácida, existem basicamente dois processos. Um utiliza ácidos concentrados para catalisar a sacarificação e o outro utiliza ácidos diluídos. Os ácidos concentrados (H_2SO_4 , HCl) solubilizam completamente a celulose cristalina e a hemicelulose, quando em concentrações de 72 a 42% respectivamente, à temperatura ambiente (60). Neste caso é preciso recuperar o ácido por razões econômicas e pelo fato de que o açúcar não é fermentável na presença de ácidos concentrados (22; 108). Devido a estas considerações, o HCl tem mais possibilidade de aplicação porque é volátil. No caso da sacarificação com ácidos diluídos, o H_2SO_4 é normalmente utilizado, sendo depois neutralizado com CaO ou $CaCO_3$ (22).

Ao contrário da celulose, que é impermeável à água, a hemicelulose tem uma estrutura relativamente aberta. Esta arquitetura molecular facilita a difusão de ácidos den-

tro do polímero e aumenta a velocidade da hidrólise. Ainda mais, a hemicelulose provoca a sua própria hidrólise; grupos acetil são rapidamente hidrolisados e o ácido acético resultante catalisa a parcial despolimerização da cadeia. Em geral, os açúcares da hemicelulose podem ser recuperados com tratamentos suaves, conseguindo-se melhores rendimentos que no caso de obtenção da glicose a partir da celulose (1).

O fato da hemicelulose ser um polímero mais facilmente hidrolisável permite que esta fração seja isolada seletivamente dos resíduos lignocelulósicos (56), e soluções a 0,1% de H_2SO_4 são capazes de extrair seletivamente os açúcares da hemicelulose, notadamente xilose e outras pentoses presentes (65).

Tratando-se resíduos de milho com H_2SO_4 diluído (0,8-1,2%), por 30 minutos, sob condições de temperatura relativamente suaves (100°C), foi possível recuperar mais de 90% dos açúcares da hemicelulose (1).

A hidrólise em duas etapas, com soluções de ácido diluído, tem sido desenvolvida para melhorar a recuperação das pentoses e sua aplicação como pré-tratamento para a subsequente hidrólise enzimática de um resíduo celulósico insolúvel é recomendada (6; 59).

As principais desvantagens dos processos de sacarificação com ácido referem-se a que quase 30% dos açúcares produzidos na hidrólise são decompostos (não fermentam) e é preciso adicionar quase 40% a mais de energia para manter as condições do reator durante o processo. O equipamento é caro e necessita-se de materiais ácido-resistentes. Além disso, as impurezas presentes no resíduo celulósico, ao reagir com o

ácido, produzem sub-produtos que inibem o crescimento microbiano (22; 56; 76; 108).

Por outro lado, os hidrolisados ácidos de hemicelulose são substancialmente mais difíceis de utilizar pelos microrganismos do que misturas de açúcares puros. Isto é atribuível, em grande parte à presença de produtos de degradação de açúcares, principalmente furfural (6). Outros compostos não identificados também tem sido considerados como fatores de inibição microbiana sendo necessário submeter o hidrolisado a processos de purificação. O ácido sulfúrico utilizado pode ser neutralizado com CaO, havendo precipitação de CaSO_4 (48; 52). Este procedimento também retira os fosfatos, que devem ser adicionados posteriormente, para uma boa atividade microbiana. (48). Em geral 20-25% da energia contida no material é utilizada na redução de tamanho das partículas e na sacarificação(22). Estes deméritos tem proporcionado amplas oportunidades para o desenvolvimento de um processo de hidrólise enzimática, para a sacarificação dos resíduos lignocelulósicos.

A hidrólise enzimática tem recebido nos últimos anos a atenção de muitos pesquisadores, basicamente porque, sendo as enzimas catalisadores biológicos específicos, formam poucos sub-produtos e os processos são realizados sob condições moderadas de temperatura (4; 12; 14; 17; 20; 23).

A hemicelulose solúvel pode ser convertida em açúcares metabolizáveis, pela ação das hemicelulases. Estas são produzidas por muitos microrganismos, geralmente junto com as celulasas. Produtores comerciais importantes de hemicelulases são especialmente os fungos do gênero *Aspergillus sp.* e *Trichoderma* (20).

As enzimas utilizadas na sacarificação da celulose são as celulasas que, na realidade, são uma mistura de enzimas entre as quais destacam-se: a Endo- β -1,4-glucanase, que hidrolisa a molécula de celulose ao acaso; a Celobiohidrolase, que forma celobiose partindo do fim da molécula de celulose; e a β -glicosidase, que hidrolisa a celobiose e forma duas moléculas de glicose (21; 92; 104). Tem sido demonstrado que as enzimas que compõem a celulase atuam sinergisticamente. Isto é característico dos componentes da celulase que são liberados no caldo de cultivo (40). Muitas bactérias são celulolíticas, embora não liberem a enzima no caldo de cultivo. A maioria dos fungos porém, produzem celulase extracelular particularmente durante a última fase da fermentação(27). É o caso da β -glicosidade, em algumas espécies de *Aspergillus* (21).

A produção de celulase é regulada por mecanismos de repressão-indução, com a repressão catabólica como sistema regulador de sua biosíntese (77). A celobiose é um inibidor da celobiohidrolase sendo, no caso, uma inibição pelo produto. No caso da β -glucosidase ocorre inibição por substrato (celobiose) e por produto (glicose)(26; 36; 57; 97; 104). A inibição por produto porém, varia com o microrganismo do qual a celulase foi produzida (41; 112). Experimentos conduzidos com filtrados de *Sclerotium rolfsii* demonstraram que a inibição produzida por glucose e celobiose em concentrações de até 100mg/mL não foi significativa em 48 horas. A celobiose, provavelmente, é hidrolisada rapidamente a glicose pelo filtrado deste microrganismo (97).

Compostos como a celulose cristalina (Avicel) e alguns poucos dissacarídeos como soforose e celobiose induzem

a produção da celulase no caso do *Trichoderma* e *Pseudomonas* sp. (41; 85). A natureza do material celulósico e sua concentração inicial são fatores muito importantes no progresso de indução da celulase (96). Atualmente, a natureza do indutor não esta muito clara (26).

O exato mecanismo de hidrólise da celulose como também o efeito da sua estrutura no processo estão em constante debate (40; 99).

Tem sido proposto, que uma celulase, C_1 , pode iniciar a degradação da celulose nativa através de uma desagregação da cadeia de poli β -1,4-glucano e uma outra forma de celulase, C_x , hidrolizar até glicose. Esta hipótese foi modificada posteriormente, mantendo-se o conceito original de enchimento a C_1 (Fig.1) (87). Por outro lado o entumescimento ou modificação da celulose cristalina é efetuada pela ação de qualquer enzima que fortuitamente rompa as ligações covalentes da cadeia de celulose disponíveis na superfície cristalina. Aceita-se que a ação da enzima C_1 está limitada à superfície cristalina e que ela é uma forma altamente específica das enzimas que atuam ao acaso (endo- β -1,4 glucanase) (41). Entretanto, tem-se demonstrado que a enzima C_x atua na molécula de celulose entumescida ou quimicamente modificada de uma maneira ao acaso, produzindo uma grande diminuição da viscosidade da carboxi-metil-celulose por cada unidade de aumento dos açúcares redutores liberados (96; 124). O fato de que existem pontos específicos de adsorção das enzimas celulolíticas e que esta adsorção é maior à temperatura de 50°C num pH 4,8 (condições ótimas para a hidrólise da celulose) permite sugerir que os componentes ativos da celulase são retidos dentro da molécula de celulose

mais fortemente que aqueles que não participam do processo de hidrólise. Segundo tem-se demonstrado, há uma adsorção preferencial pelas endoglucanases, sendo que as exoglucanases atuam logo após a formação da celulose mais reativa (40). Em um trabalho recente, a enzima C_1 é considerada como uma β -1,4-glucan celobiohidrolase, permitindo sugerir a vários autores que o ataque inicial da celulose nativa pode ser atribuído à enzima C_x e não à enzima C_1 proposta originalmente (91).

HIDRÓLISE DA CELULOSE

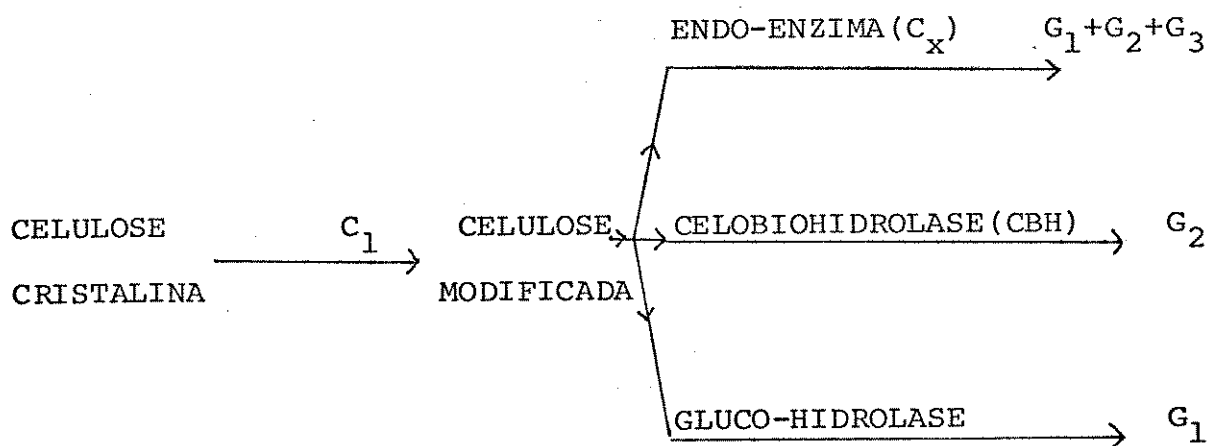


FIG: 1

Em estudos sobre os mecanismos de hidrólise da celulose, tem-se observado, que o índice de cristalinidade da celulose aumentava muito pouco durante a hidrólise, concluindo-se que tanto a parte amorfa como a cristalina são hidrolisadas em todo momento durante a reação mas, a porção amorfa é digerida mais rapidamente (36). Isto estaria indicando que outros fatores seriam os responsáveis pelo decréscimo da velocidade de hidrólise através do tempo. Estas observações levaram a estabelecer uma nova teoria sobre o mecanismo da hidrólise da celulose chamada de "Mecanismo paralelo" (Fig. 2) (35).

Está claro que o processo de hidrólise da celulose é de natureza sinérgica entre endoglucanases e exocelobiohi

HIDRÓLISE DA CELULOSE

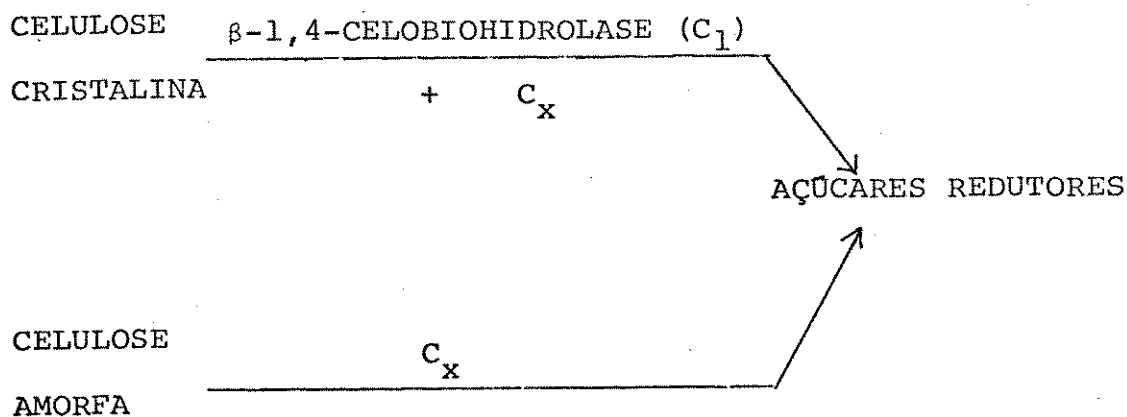


FIG: 2

drolases para produzir celobiose a qual é transformada a glucose pela β -glucosidase mas, esta sequência vai variar de acordo com o microrganismo produtor da enzima como também do substrato onde a enzima atue, sendo difícil estabelecer uma única forma de hidrólise porque os fatores que participam no processo são complexos.

2.5. Produção de etanol de resíduos lignocelulósicos

Um grande interesse na produção de etanol como combustível alternativo para motores de explosão e também como matéria-prima para a produção de vários produtos químicos orgânicos, é, atualmente notado. A produção anual, para 1985, no Brasil, está planejada para 11 milhões de m³, principalmente a partir de açúcar de cana, melaço, mandioca e raízes de babaçu (8; 16).

O etanol é atualmente o principal produto obtido por fermentação e é provável que o contínuo aumento dos programas de produção repercutam nas indústrias de fermentação do mundo inteiro. Isto provocará uma procura adicional de substratos, particularmente melaços, e um incremento da biomassa microbiana produzida, a qual, sem dúvida, terá que ser aproveitada como fonte de alimento animal (123).

Os trabalhos realizados sobre a produção de etanol foram revisados por Martins (74) Esser e Schmidt (33). Coombs (16), Faber (34), Maiorella e col. (67; 68) e Righelato (88). As principais limitações da sua obtenção por processos fermentativos são: disponibilidade de matérias-primas e seus pré-tratamentos, inibição pelo etanol, produtividade dos processos e

dificuldades na separação do produto final. A estas pode ser acrescentada a poluição causada pelos resíduos decorrentes tanto da fermentação alcoólica como da destilação (vinhoto)(123).

Atualmente, tem-se desenvolvido muitos processos onde a fermentação alcoólica e a hidrólise enzimática do substrato são realizados numa operação só. As principais vantagens destes processos tem relação com o aumento da velocidade de hidrólise e, subsequentemente, maiores rendimentos em etanol (93), devido, principalmente, a uma minimização da inibição da β -glucosidade, por apresentar baixas concentrações de glicose no meio de fermentação (41). Por outro lado, a baixa concentração de glicose minimiza também as possibilidades de contaminação (60).

Os processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultânea de resíduos lignocelulósicos tem sido estudados por diversos pesquisadores (60; 93).

Varios materiais celulósicos tem sido testados para serem utilizados em processos de hidrólise e fermentação simultânea (60; 43). A enzima celulolítica utilizada pelos pesquisadores corresponde à do *Trichoderma reesei* QM 9414 e as leveduras das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida brassicae*. Os resultados mostram um aumento de 60% na produção de etanol, em relação ao processo convencional.

Algumas desvantagens técnicas ainda existem por resolver nestes processos de produção simultânea tais como a compatibilização das temperaturas de hidrólise e fermentação, que são de 50 e 30°C respectivamente. Por outro lado, é necessário conhecer o efeito das enzimas celulolíticas sobre a viabilidade das leveduras (60).

Um grande número de microrganismos é capaz de sintetizar celulasas mas não tem a habilidade de produzir etanol. Assim o *Clostridium thermocellum*, e o *Acetobacterium cellulolyticus* não utilizam diretamente os açúcares que eles produzem como resultado de suas atividades celulolíticas (92; 119). Neste caso, é necessário adicionar ao sistema um microrganismo produtor de etanol (43; 60).

A fermentação direta da celulose e etanol tem sido demonstrada em sistemas de monocultura de *Monilia* sp., isolada de compostos de bagaço de cana-de-açúcar (47). A maior vantagem deste sistema de cultura pura, sobre o uso de dois ou mais microrganismos que atuam sinergisticamente é que ambos processos, o de sacarificação e o de fermentação, ocorrem a uma temperatura ótima.

Para a produção de etanol de resíduos lignocelulósicos em forma eficiente, é necessário considerar o aproveitamento da fração de hemicelulose. Isto tem sido um problema por longo tempo já que, a produção de etanol através da utilização de misturas de glicose, xilose e arabinose é de grande significado para a factibilidade econômica do processo de biodegradação destes resíduos (53).

Tanto bactérias como fungos e leveduras apresentam xilanase (9; 23) porém, poucos microrganismos apresentam a habilidade de fermentar as pentoses, particularmente xilose, a etanol (13; 98). A fermentação de carboidratos e de hidrolisados de hemicelulose tem sido pesquisada utilizando leveduras e fungos dos gêneros *Mucor* e *Fusarium* (118; 50). Os resultados demonstraram que tanto o *Mucor* sp. como as espécies de *Fusarium* estudadas fermentaram a etanol varios açúca-

res, incluindo glicose, pentoses e xilitol. A espécie *Mucor sp* fermentou o hidrolisado de bagaço de cana transformando os açúcares presentes em etanol. Nesta fermentação verificou-se o consumo inicial de glicose, seguido da xilose e arabinose (118).

Aeromonas hydrophila, *Bacillus polymyxa* e *Aerobacter indologenes* são bactérias que aproveitam hexoses e pentoses através de uma fermentação ácida mista mais o 2,3 butanodiol. Assim, quantidades significativas de etanol, 2,3 butanodiol e ácidos orgânicos podem-se obter como produto da fermentação de pentoses por estas bactérias (2; 101).

Várias espécies do genero *Clostridium* tem sido utilizadas para a conversão de celulose e hemicelulose para uma mistura de etanol, lactato e acetato (37). O *Bacillus acetohydrophilus* realiza uma fermentação ácida mista com etanol, ácido acético, dióxido de carbono, hidrogênio e acetona, utilizando 98% da xilose presente no meio de fermentação (69). Os processos que utilizam bactérias são relativamente ineficientes porque, além do etanol, produzem outras substâncias especialmente ácidos orgânicos de cadeia curta (125).

Embora muitas leveduras transformem eficientemente hexoses a etanol e utilizem pentoses oxidativamente, tem sido consideradas incapazes de produzir etanol das pentoses (7; 14). Recentemente tem-se demonstrado a conversão direta da xilose a etanol, por uma linhagem mutante de *Candida sp* (46). Igualmente, tem-se verificado que a levedura *Pachysolen tannophilus* também fermenta diretamente a xilose para etanol (94; 98). Ao mesmo tempo, outros pesquisadores tem isolado

isolaram/15 espécies de leveduras capazes de assimilar a xilose. Estes autores informaram que as leveduras *Pachysolen tannophilus*, *Candida guilliermondii*, *Candida tecebra* e *Pichia guilliermondii* produziam etanol da xilose, salientando a espécie *Pachysolen tannophilus* como a mais produtiva (71).

Recentemente foram estudadas as condições ótimas de fermentação da xilose por *Pachysolen tannophilus*. Ambos, crescimento microbiano e produção de etanol, foram ótimos à temperatura de 32°C e pH de 2,5. O rendimento alcoólico obtido foi de 0,34 gramas de etanol por grama de xilose consumida. Estes autores salientam o fato de que uma forte inibição do processo de fermentação ocorre quando a concentração de etanol, no meio de fermentação, supera os 20g/L (98).

Foi verificado que a levedura *Candida lusitaneae* produzia mais etanol, de uma mistura de xilose e celobiose, do que quando os dois açúcares eram fermentados separadamente (69). Por outrolado, os mesmos pesquisadores informaram que o *P. tannophilus* apresenta a habilidade de fermentar a galactose para etanol, sendo que o glicerol não era utilizado eficientemente (70).

A descoberta de que algumas leveduras fermentam a xilose diretamente a etanol, tem aberto um caminho para a utilização mais eficiente e completa dos resíduos lignocelulósicos. Neste sentido, os especialistas da área tem aplicado grande parte de seus esforços de pesquisa, nos últimos 3 anos, no estudo de processos de biodegradação, utilizando a levedura *Pachysolen tannophilus* (72; 94; 98).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Equipamentos

Todas as pesagens envolvidas no presente trabalho foram executadas em balança analítica ou semianalítica SAUTER ; as operações de centrifugação em centrífuga BECKMAN modelo J-21 B e para as diversas determinações de pH e preparações de tampões foi empregado em pHmetro HORIBA H-5. Um evaporador à pressão reduzida BUCHI, modelo RE-101 foi utilizado para concentrar os hidrolisados das frações do bagaço de cana de açúcar empregado para a formulação do meio de cultura utilizado na fermentação alcoólica. Os meios de cultura utilizados neste estudo, foram esterilizados em autoclave FABRE modelo 103 e as culturas submersas submetidas a aeração em agitador rotatório FERMENTATION DESING INC., PA 18103 enquanto os cultivos estacionários em meio semi-sólido e sólido desenvolveram-se em estufa FANEN, modelo RECTILINEA. Foram também utilizados, banho maria FANEN para o desenvolvimento das reações enzimáticas. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro COLEMAN modelo 295 . Os processos de liofilização foram realizados em um liofilizador marca VIRTIS modelo nº 10-146 MR-BA. As operações de moenda foram executadas em moinho de facas marca RENARD modelo 180-75-01

3.1.2. Reagentes

Os meios de cultura empregados durante o desenvolvimento deste trabalho foram de marca DIFCO.

Os açúcares padrões xilose e glicose utilizados na cromatografia em papel, foram respectivamente da marca CARLO ERBA e RIEDEL, enquanto que os padrões arabinose e xilobiose pertenciam a marca MERCK.

Todos os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.1.3. Bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana de açúcar utilizado no presente trabalho, foi obtido da Usina de Açúcar Bom Retiro, Paulínia, estado de São Paulo.

3.1.4. Microrganismos

As seguintes linhagens de fungos foram utilizadas durante o desenvolvimento deste trabalho:

a) *Trichoderma reesei* QM 9414, mantido em Agar Batata (extrato de batata 100 mL, glicose 40,0 g, agar-agar 32,0 g, por litro de água destilada) (116).

b) *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460, mantido em Agar YMDP (extrato de malte 3,0 g, extrato de levedura 3,0 g, peptona 5,0 g, dextrose 10,0 g, agar-agar 20,0 g, por litro de água destilada (30).

Estas linhagens foram conservadas por transferências periódicas e mantidas em geladeira à 4°C.

3.1.5. Reator para o processo de explosão-autohidrólise

O reator utilizado no processo de explosão-autohidrólise, corresponde ao descrito por Schuchardt e colaboradores e está ilustrado na figura 3 (95). Para descarregar o reator foi utilizada uma valvula de esfera de 1/2" de ermeto. A figura 4 mostra o sistema de aquecimento elétrico utilizado (manta elétrica 2.500 W) e a plataforma móvel que mantinha o conteúdo do reator em agitação constante (100 ciclos/min) durante o processo. Na figura 5 pode-se observar o ciclone separador utilizado para receber o bagaço pré-tratado.

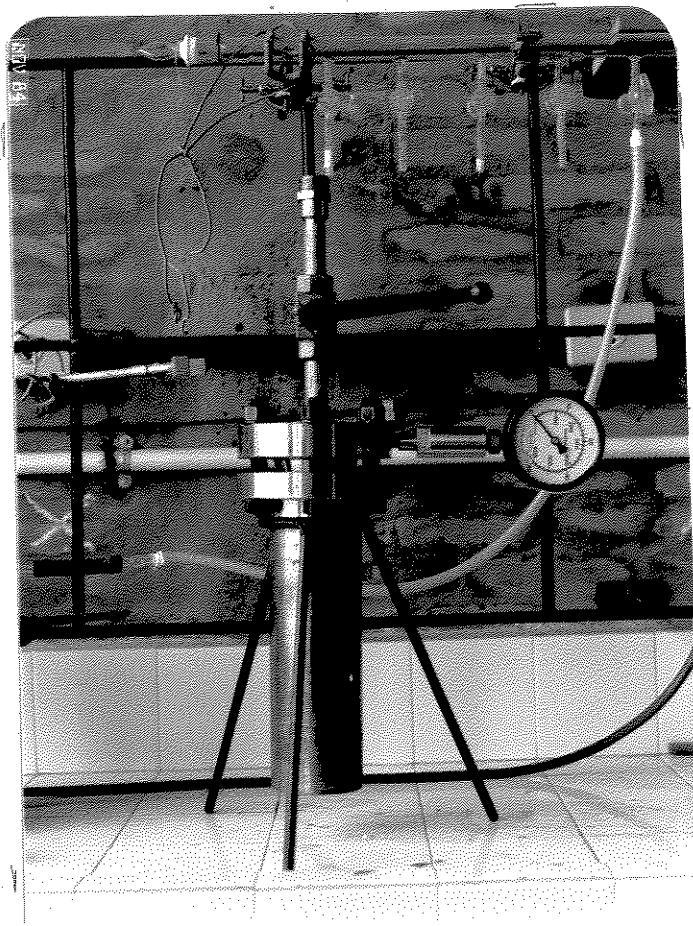


FIG. 03 REATOR PARA O PROCESSO EXPLOÇÃO-AUTOHIDRÓLISE

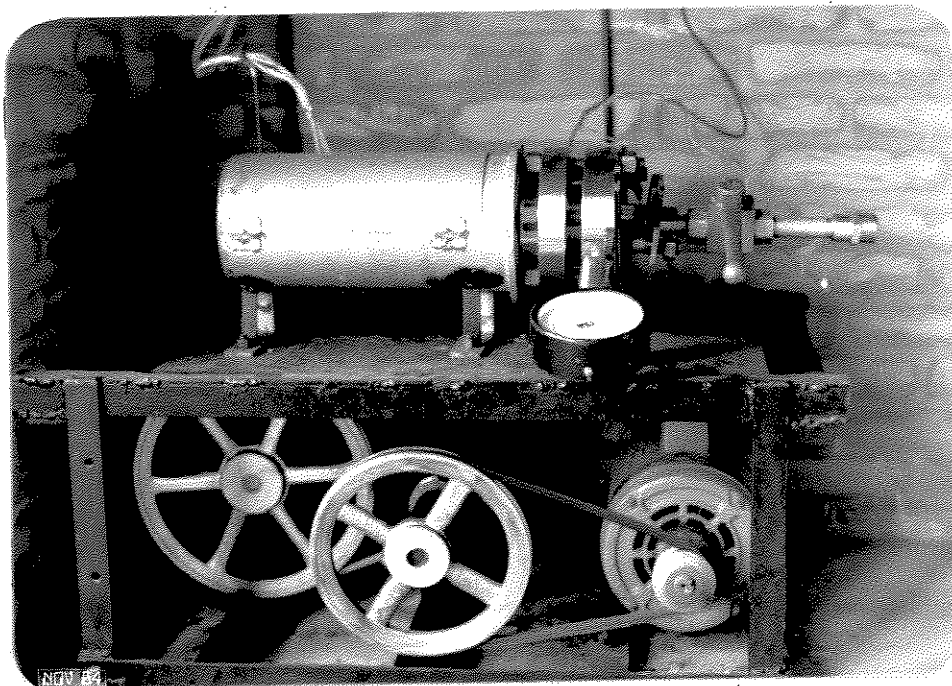


FIG. 04 SISTEMA DE AQUECIMENTO E AGITAÇÃO DO REATOR UTILIZADO NO PROCESSO EXPLOÇÃO-AUTOHIDRÓLISE.



FIG. 05 CICLONE SEPARADOR UTILIZADO NO PROCESSO DE EXPLOÇÃO-AUTOHIDRÓLISE.

3.2. Métodos

3.2.1. Produção de enzimas celulolíticas

Para a produção de enzimas celulolíticas os esporos de uma cultura de *Trichoderma reesei* QM 9414 incubado durante 3-5 dias à 30°C em Agar Batata (116) foram utilizadas para inocular frascos de Erlenmeyer de 500mL. contendo 20,0g. de uma mistura de farelo de trigo e água destilada na proporção 1:1 (p/V) (umidade de aprox. 60%) previamente esterilizados por 30 minutos à 121°C e resfriados à temperatura ambiente. Após um período de 3-5 dias o farelo fúngico foi submetido a uma extração com água destilada na proporção de 1:5 respectivamente (p/v), com agitação periódica durante 30 minutos. A seguir a mistura foi filtrada em papel de filtro. Ao filtrado obtido, após o ajuste do pH para 6,0, foi adicionado 0,1% de NaCl e álcool etílico 95° a concentração de 70%. Após o repouso à 4°C durante uma noite, o precipitado foi recuperado pela centrifugação a 5.900 x g durante 10 minutos à 5°C, submetido a secagem à temperatura ambiente em corrente de ar, triturado em almofariz de porcelana e armazenado à 0°C.

3.2.2. Determinação da atividade enzimática

Determinação da atividade de C₁-celulase (FPase)

A atividade C₁-celulase foi determinada pela capacidade da enzima em degradar papel filtro Whatman nº 1 em um tubo de ensaio (200 x 23mm). Foram colocados 0,2 mg de enzima e 1,0 mL de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 e um pedaço de papel filtro Whatman nº 1 de 1 x 6 cm. (50mg). O conjunto foi

incubado em banho maria à 50°C durante 1,0 hora com agitação periódica. Após a incubação foram retirados geralmente 1,0 mL de solução para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi e Nelson (80; 100). Uma unidade de atividade de C₁-celulase foi expressa como μ mol de glicose liberados por minuto e por miligrama de enzima (73).

Determinação da atividade C_x-celulase

A atividade de C_x-celulase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática sobre o substrato carboximetilcelulose de sódio de acordo com o método proposto por Reese e colaboradores (87). Os tubos de ensaio contendo a mistura de 4,0 mL de solução 0,625% de carboximetilcelulose de sódio em tampão acetato 0,1M, pH 4,5 e 1,0 mL de solução de enzima (0,4 mg/mL) foram incubados por 30 minutos à 40°C. Ao final da incubação foram retirados alíquotas para determinação de açúcares redutores, utilizando o método de Somogyi e Nelson (80; 100). Uma unidade de atividade enzimática de C_x-celulase foi expressa como μ mol de glicose liberados por minuto e por miligrama de enzima.

Determinação da atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores resultantes da ação enzimática sobre o substrato xilana. Os tubos de ensaio, contendo a mistura de 2,5 mL de solução 0,05% de xilana, 2,5 mL de tampão acetato 0,05 M, pH 4,0 e 1,0 mL de solução de enzima, foram incubados por 30 minutos à 50°C. Ao final da incubação, foram retiradas alíquota de 1,0 mL para determinação de açúcares redu-

tores, utilizando o método de Somogyi e Nelson (80; 100). Uma atividade xilanase foi expressa como μmol de xilose liberada por minuto e por miligrama de enzima (83).

3.2.3. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana seco à temperatura ambiente e moído em moinho de facas marca Reanard, modelo MFC 180-75-01 (100 mesh), foi tratado com solução 4% de NaOH na proporção 1:10 (p/v) respectivamente, à temperatura ambiente (27-30°C) durante uma noite. Após este período a mistura foi centrifugada durante 10 minutos e o resíduo foi lavado com água destilada e com HCl 1N até neutralidade. O bagaço assim obtido foi secado à 60°C durante uma noite e mantido em dessecador em embalagem de vidro. Este produto foi denominado Fração III. O sobrenadante foi utilizado para obter o extrato alcalino como descrito a seguir.

3.2.4. Obtenção do extrato alcalino do bagaço de cana de açúcar

O sobrenadante obtido no item 3.2.3., foi ajustado a pH 5,0 com HCl 2N e a hemicelulose foi precipitada da solução pela adição de etanol 95% na proporção 1:3 (v/v) respectivamente. A mistura foi mantida à 4°C durante uma noite; o precipitado foi separado por filtração através de placa porosa e lavada com etanol 95%G.L., até obtenção de um filtrado claro. O resíduo assim obtido foi submetido a secagem à temperatura de 60°C durante uma noite. Este produto foi denominado Fração I. Após a secagem, o produto foi moído em almofariz de porcelana e deslignificado pelo tratamento com etanol 70%G.L. à 70°C du-

rante 4 horas (25). Após este período, o material foi filtrado através de placa porosa e o resíduo lavado com etanol 70% até a obtenção de um filtrado claro. O produto assim obtido foi secado à temperatura de 60°C durante uma noite e armazenado em embalagem de vidro em dessecador. Este produto foi denominado Fração II.

3.2.5. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar pelo processo de explosão-autohidrólise

O bagaço de cana seco e moído (28 mesh), foi misturado com água destilada na proporção de 1:5, 1:8 e 1:10 (p/v). Amostras da mistura foram colocadas no reator descrito no item 3.1.5. e submetidas a aquecimento à 200°C durante um tempo de 4,0 minutos e a pressão de 16 bar.. Após este período o reator foi despressurizado rapidamente e a mistura bagaço/água descarregada por arraste a um ciclone separador.. Em seguida a mistura foi filtrada através de placa porosa a pressão reduzida. O bagaço assim obtido foi secado à 60°C durante uma noite e mantido em dessecador em embalagem de vidro. Este produto foi denominado Fração V. O filtrado (líquido de auto-hidrólise) foi submetido aos seguintes tratamentos:

Liofilização

O filtrado foi liofilizado e armazenado em embalagem de vidro em geladeira.

Hidrólise com enzimas celulolíticas ou com ácido

O filtrado foi hidrolisado com enzimas ou com ácidos de acordo com o item 3.2.6.

Diálise

O filtrado foi dialisado contra água destilada, em sacos de diálise de celulose durante 72 horas à 50°C. O produto assim obtido foi denominado Fração IV.

3.2.6. Hidrólise das frações de bagaço de cana de açúcar por enzimas celulolíticas ou por ácido

As frações obtidas segundo os Ítems 3.2.4 e 3.2.5, foram submetidas a hidrólise enzimática ou ácida com o objetivo de obtenção de xilose.

A hidrólise enzimática da Fração II consistiu no tratamento de uma solução de 10% desta fração em água (p/v) com 20 mg de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* QM 9414 contendo 1,8 unidades de atividade C_1 , 2,4 unidades de atividade de C_x e 10,6 unidades de atividade xilanase obtida de acordo com o item 3.2.1. O pH foi ajustado a 4,5 com NaOH 2N e a mistura incubada à 50°C durante 48 horas.

A hidrólise enzimática da Fração IV consistiu no tratamento de 50 mL desta fração com 20 mg de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* QM 9414, nas mesmas condições que no caso da Fração II.

A hidrólise enzimática de bagaço de cana sem pré-tratamento, Fração III e Fração V foi feita utilizando solução 2% de substrato em tampão acetato 0,1M e pH 4,5. Nesta mistura foram adicionados 20 mg de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* QM 9414 contendo 1,8 unidades de atividade C_1 , 2,4 unidades de atividade C_x e 10,6 unidades de atividade xilanase e incubada durante 24 horas à 50°C.

A hidrólise ácida da Fração II consistiu no tratamento de uma solução de 10% desta fração em água com ácido sulfúrico na concentração final de 5% (v/v) à 100 °C durante uma hora.

Para a hidrólise ácida da Fração IV, 2,6 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a 50 mL desta fração e aquecida à 100°C durante uma hora.

3.2.7. Fermentação alcoólica de diversos açúcares e hidrolisados do bagaço de cana de açúcar

Para os estudos de fermentação alcoólica foi utilizada a levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2640.

Preparação do meio de cultura

O meio de cultura basal (98) era constituído de: 10,0 mL de solução A; 10,0 mL de solução B; 100,0 mL de solução C; 10,0 g de extrato de levedura e fonte de carbono de concentração variável por litro de água destilada. A solução A continha: 1,10 g de CaO; 0,40 g de ZnO; 5,40 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,36 g de MgO; 0,25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,24 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g de H_3BO_3 e 13,0 mL de HCl concentrado por litro de água destilada.

A solução B era constituída por: 10,1 g de MgO e 45,0 mL de HCl concentrado por litro de água destilada. A solução C continha 64,0 g de Uréia; 12,0 g de KH_2PO_4 e 1,80 g de Na_2HPO_4 por litro de água destilada.

Os açúcares ou hidrolisados de bagaço de cana de açúcar foram dissolvidos em água destilada e autoclavada sepa

radamente durante 15 minutos à 121°C e adicionados assépticamente ao meio de cultura basal previamente esterilizado. O pH do meio de cultura estéril e frio era ajustado para pH 2,5-3,0 com HCl 2N estéril.

Preparação do inóculo

Uma amostra de 50,0 mL de cultura de 48 Hr de *P. tannophilus* NRRL y-2460 em meio de cultura descrito acima, mais 2,5% de xilose como fonte de carbono, incubada à 32°C em agitador rotatório a 200 rpm, foi centrifugada assépticamente a 5.900 x g durante 5 min. à 50°C e a massa celular lavada com 20 mL de solução 0,85% NaCl estéril. Após a lavagem, a massa celular foi ressuspensa em 50 mL de solução salina esterilizada.

Fermentação alcoólica

Frasco de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 mL de meio de cultura descrito acima, foi inoculado com 1,0 mL de suspensão de *Pachysolen tannophilus* obtida de acordo com o item anterior. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm à 32°C. Amostras de 3,0 mL de meio de cultura foram retiradas assépticamente para determinações periódicas de açúcares redutores, massa celular, concentração de etanol e pH, de acordo com os itens 3.2.12, 3.2.15 e 3.2.14 respectivamente.

3.2.8. Cromatografia de papel

A identificação dos açúcares produzidos durante o processo de sacarificação foi feita utilizando cromatografia de papel pelo método descendente e utilizando um sistema de solventes N-butanol: piridina: água destilada (6:4:3 v/v). Os

açúcares glicose, arabinose, xilose e xilobiose foram utilizados como padrões de identificação. As cromatografias foram desenvolvidas durante uma noite e reveladas com AgNO_3 -acetona, NaOH-etanol e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ de acordo com os métodos descritos por Trevelyan e colaboradores e Shewale e Sadana (97; 115).

3.2.9. Determinação de celulose

A celulose foi determinada de acordo com o método descrito por Updegraff (117).

Uma amostra de 200 mg de bagaço de cana de açúcar, moído (200 mesh) e seco foi lavado com 10 mL de água destilada. O resíduo obtido por centrifugação a 810 x g durante 5 minutos foi tratado com 3 mL de reagente ac. acético/ac. nítrico constituído de 50 mL de ácido acético 80% e 15 mL ácido nítrico concentrado, em banho maria em ebulição durante 30 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada nas condições descritas acima e o resíduo lavado exhaustivamente com alíquotas de 10 mL de água destilada e recuperado através de centrifugação. O resíduo obtido foi tratado com 10 mL de ácido sulfúrico 67% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após este período 1,0 mL do hidrolisado foi diluído para 100 mL com água destilada. Desta diluição pipetou-se 1,0 mL e adicionou-se 4,0 mL de água destilada e a mistura foi resfriada e mantida em banho de gelo durante a adição de 10 mL de solução 0,2% de Antrona em H_2SO_4 concentrado. A seguir os tubos foram colocados em banho maria em ebulição durante 16 minutos. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro Coleman 295 à 620 nm contra branco constituído da mistura de 5 mL de água destilada e 10 mL de reagente de antrona e o conteúdo de celulose da amostra foi extrapolada de curva padrão de celulose.

3.2.10. Determinação de hemicelulose

A determinação de hemicelulose do bagaço de cana de açúcar, foi realizada utilizando-se a técnica nº T 223 m 58 recomendada pela "Technical Association of the Pulp and Paper Industry, TAPPI" (110).

Uma amostra de 1,0 g de bagaço de cana seco e moído (200 mesh) e 100 mL de HCl diluído (12%) foram adicionados em um balão de destilação de 500 mL. A seguir a mistura foi destilada durante 90 minutos, a velocidade de aproximadamente 50 mL a cada 15 minutos e 300 mL do destilado foram recolhidos num frasco de Erlenmeyer de 1000 mL de boca esmirilhada. A medida que a destilação prosseguia, foi adicionado HCl diluído (12%), através de um funil de decantação adaptado ao balão de destilação, para a manutenção do volume inicial de 100 mL.

Após a destilação, o conteúdo de hemicelulose foi determinado no destilado pelo método colorimétrico indicado para concentrações menores que 10% e pelo método de Bromação volumétrica para determinação de hemicelulose em concentrações superiores a 10%, descritos a seguir:

Método colorimétrico de determinação de hemicelulose

O destilado (300 mL) obtido acima foi diluído para 1,0 L com água destilada.

Determinou-se previamente a quantidade de solução NaOH 24% (p/v), necessária para neutralizar 20 mL de amostra de destilado diluído, usando-se 1 gota de solução 0,5% de fenolftaleína em etanol como indicador.

A seguir, uma alíquota de 20 mL de destilado diluído foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e neutralizada com quantidade necessária de solução de NaOH 24%. Adicionou-se ao balão volumétrico 20 mL de solução estabilizadora constituída de 200 g de NaCl e 100 g de Na_2HPO_4 em 1,0 L de água destilada.

Preparou-se um branco constituído de 20 mL solução de NaCl (58 g/L) e 20 mL de solução estabilizadora.

Os frascos foram resfriados à 20°C e em seguida adicionou-se 50 mL de solução de acetato de anilina (5 mL de anilina destilada mais 45 mL de ácido acético glacial).

As misturas foram diluídas para 100 mL com água destilada e mantidas à 20°C durante 30 minutos. Após este período, a transmitância da solução foi medida à 520 nm contra o branco, em espectrofotômetro Coleman 295.

A concentração de hemicelulose na amostra, foi calculada utilizando-se a curva padrão de furfural na faixa de concentração de 0,01 a 0,30 mg e a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemicelulose} = \frac{7,9 \times \text{mg furfural}}{\text{peso amostra seca}} \times 100$$

Método de Bromação Volumétrica de determinação de hemicelulose

Ao destilado (300 mL) obtido de acordo com o item 3.2.10 foram adicionados 50 mL de água destilada e 250 g de gêlo picado. Após a temperatura da solução atingir 0°C, foi adicionado cuidadosamente 20 mL de brometo-bromato de potássio 0,2 N (5,57 g KBrO_3 , 50 g KBr e 1,0 g Na_2CO_3 em 1 L água destilada); o frasco de Erlenmeyer foi fechado com tampa de vidro,

agitado e deixado em repouso. Após exatamente 5 minutos, acrescentou-se rapidamente 10 mL de solução 10% KI, tampando-se e agitando-se bem a solução para a absorção do vapor de bromo. A amostra foi titulada com solução $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N, usando-se como indicador de viragem, solução 5% de amido.

Foi feito um branco constituído de 270 mL de HCl diluído a 12%, 80 mL de água destilada e 250 g de gelo picado, e tratado como descrito acima.

O teor de hemicelulose no bagaço foi expresso em porcentagem utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ hemicelulose} = \frac{7,58 \times N(a-b)}{\text{peso amostra seca}} - 1,1\%$$

onde:

N = normalidade do $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

a = mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto no Branco

b = mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na Amostra

3.2.11. Determinação de lignina

A determinação de lignina foi realizada de acordo com a norma técnica T 222 m-54 recomendada pela "Technical Association of the Pulp and Paper Industry, TAPPI" (109).

Uma amostra de 1,0 g de bagaço de cana seco e moído (200 mesh) foi pesado em um cartucho de papel de filtro e tratado com 200 mL da mistura de etanol-benzeno na proporção 1:2 (v/v) em extrator Soxhlet durante 6-8 horas.

Após o tratamento a amostra foi secada à tempera-

tura ambiente, e transferida para um bequer de 100 mL. Após a adição cuidadosa de 40 mL de solução de H_2SO_4 72%, o bequer foi tampado com vidro relógio e a amostra foi homogenizada com o ácido durante 1 minuto. A mistura foi mantida à 20°C por 2 horas com agitação periódica a intervalos de meia hora.

A seguir, a amostra foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de 2 L. e diluída com água destilada até a concentração de 3% de H_2SO_4 e fervida durante 4 horas, sob refluxo, para manutenção de volume constante.

Após este período, o material foi filtrado em cadinho previamente tarado. O material insolúvel foi lavado com 500 mL de água destilada quente para a eliminação do ácido. O cadinho filtrante com o resíduo lavado foi aquecido, em estufa, a 105°C até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem de lignina em relação à amostra de bagaço de cana seco.

3.2.12. Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método de Somogyi e Nelson(80; 100). A absorbância da solução foi determinada à 540 nm em espectrofotômetro Coleman 295.

3.2.13. Determinação de umidade

Para a determinação de umidade, as amostras foram mantidas em estufa a 105°C até peso constante.

3.2.14. Determinação de Etanol

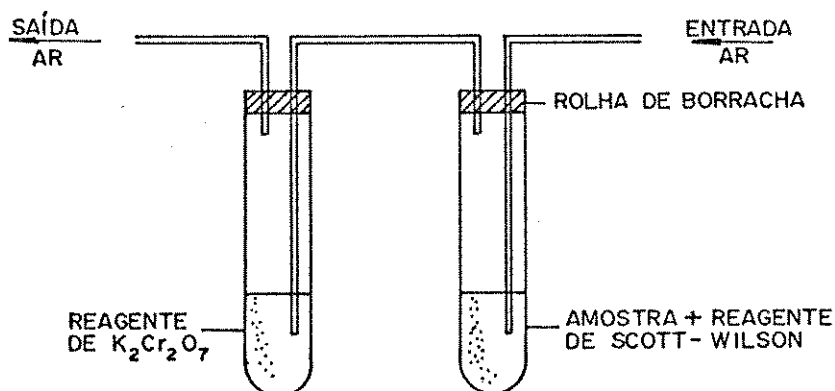
As determinações de etanol foram realizadas de acordo com o método de Kaye e Haag (58).

Este método baseia-se na oxidação do etanol a ácido acético pelo dicromato de potássio (de cor amarela) com a consequente formação de sulfato crômico (de cor verde). A intensidade da cor verde é proporcional à concentração de etanol.

Em um tubo de ensaio de 25 x 210 mm foram adicionados 1,0 mL de amostra do meio de fermentação, 5,0 mL de água destilada e 4,0 mL de reagente de Scott-Wilson constituído de 5,0 g de $\text{Hg}(\text{CN})_2$, 90,0 g de NaOH e 1,5 g de AgNO_3 em 800 mL de água destilada.

Em outro tubo de ensaio de 25 x 210 mm foi adicionado 9,0 mL de reagente de dicromato de potássio constituído de 3,7 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 280 mL de H_2SO_4 conc. e 220 mL de água destilada.

Estes tubos de ensaio foram conectados através de tubos de vidro como ilustrado no esquema:



Uma corrente de ar foi introduzida através da conexão de vidro durante o aquecimento do conjunto, em banho maria em ebulição por 15 minutos. Após este período, o tubo de ensaio contendo o reagente de dicromato de potássio, foi resfriado e a absorção da solução medida em espectrofotômetro Coleman 295 à 605 nm contra branco obtido segundo o procedimento descrito acima com a substituição de 1,0 mL de água destilada em lugar da amostra. O conteúdo de etanol da amostra foi extrapolada de curva padrão de etanol absoluto.

3.2.15. Massa celular

As determinações de massa celular foram feitas medindo-se a absorbância de uma suspensão de células lavadas e resuspensas em água salina (0,85% NaCl) estéril à 660 nm. em espectrofotômetro Coleman 295. Os valores de biomassa em g/L foram calculados através de curva padrão relacionando absorbância a 660 nm. e peso seco.

3.2.16. Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os dados experimentais obtidos durante a fermentação alcoólica de xilose e glicose, foram plotados contra o tempo de fermentação e os parâmetros cinéticos, taxa específica de crescimento celular, taxa específica de consumo de substrato e taxa específica de produção de etanol, foram calculados pelo método geométrico de LeDuy e Zajic (64).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de enzimas celulolíticas

A produção de enzimas celulolíticas foi realizada de acordo com o item 3.2.1. e a atividade das mesmas, na preparação bruta, foi determinada de acordo com o item 3.2.2.

Os resultados estão apresentados no Quadro 1.

QUADRO 1. Produção de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* QM 9414 por fermentação semi-sólida

Atividade Enzimática	mol açúcar redutor/minuto/mg de enzima bruta
C _I (FPase)	0,09
C _x (CMC)	0,12
Xilanase (xilana)	0,53

A atividade das enzimas celulolíticas, da preparação bruta, obtidas pela fermentação semi-sólida foi sempre maior do que aquela obtida por fermentação submersa. Este resultado foi demonstrado anteriormente por Urieta e colaboradores (116). Além disso, o processo de produção de enzima por fermentação semi-sólida é mais simples e econômico do que o processo de fermentação submersa (116).

O Quadro 2 ilustra a hidrólise enzimática do bagaço de cana intacto (sem tratamento) e da hemicelulose do bagaço de cana utilizando-se a preparação enzimática obtida de *T. reesei* de acordo com o item 3.2.1., celulase e hemicelulase comerciais.

QUADRO 2. Hidrólise enzimática do bagaço de cana e da hemicelulose do bagaço de cana pela preparação enzimática de *T. reesei* QM 9414, celulase e hemicelulase comerciais.

Substrato	Enzimas celulolíticas		
	Celulases (<i>T. reesei</i>)	Hemicelulase comercial	Celulase (comercial)
	<i>A. niger</i>		
Bagaço de cana	mg Açúcar Redutor liberado/100 mL.		
	58	45	23
Hemicelulose de bagaço de cana	182	212	138

A preparação enzimática de *T. reesei* foi mais ativa sobre o bagaço de cana intacto do que a celulase e hemicelulase comerciais. Na hidrólise de hemicelulose do bagaço de cana a preparação comercial de hemicelulose obtida de *A. niger* foi mais efetiva em relação às celulases de *T. reesei* e celulase comercial isto é devido à ausência da atividade de celulase C_I e atividade somente de celulase C_X e xilanase no sistema de celulases do *A. niger* (116).

O *T. reesei* apresenta um sistema de enzimas celolíticas completo com atividade de xilanase, celulasas C_I e C_X e por esta razão é a fonte de enzimas celolíticas mais utilizada para a hidrólise de substratos que apresentam celulose e hemicelulose como principais constituintes, como é o caso do bagaço de cana de açúcar.

4.2. Pré-tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar

O pré-tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar foi realizado de acordo com os métodos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4. O fluxograma da figura 6 ilustra o procedimento adotado e os resultados obtidos.

No pré-tratamento alcalino de 200 g. de bagaço de cana seco e moído, foram obtidos 125 g de resíduo insolúvel seco denominado Fração III e 42 g de extrato alcalino seco denominado Fração I.

No processo de deslignificação de 42 g da Fração I, com etanol a 70°C, foi obtido 12 g de fração insolúvel, seca e deslignificada, denominada Fração II.

A determinação quantitativa de celulose, hemicelulose e lignina nas diferentes frações obtidas pelo tratamento alcalino de bagaço de cana foi realizada de acordo com os itens 3.2.9., 3.2.10. e 3.2.11., respectivamente e os resultados estão apresentados no Quadro 3.

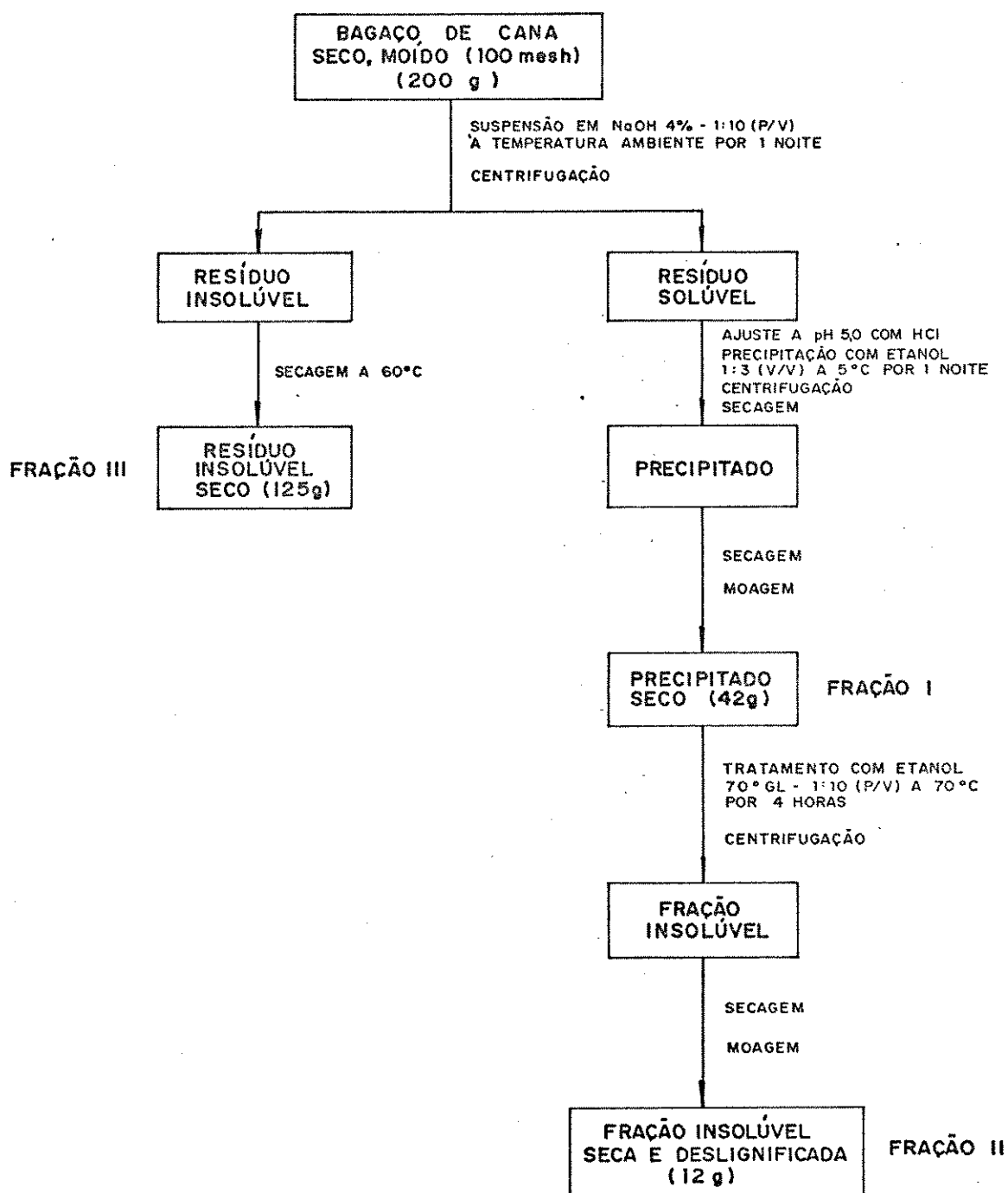


FIGURA Nº 6 : PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR.

QUADRO 3. Teor de celulose, hemicelulose e lignina nas diferentes frações de bagaço de cana obtidas pelo tratamento alcalino.

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Fração I	5,9	25,2	12,7
Fração II	0,0	46,4	9,4
Fração III	37,2	11,0	24,8
Bagaço de cana seco e moído (sem tratamento)	34,4	22,4	20,3

% base seca

4.3. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar pelo processo de explosão-autohidrólise

O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar pelo processo de explosão-autohidrólise foi realizado de acordo com o item 3.2.5. Durante este processo há um aumento lento da temperatura (20 min) até 200°C e da pressão até 16 bar e depois uma despressurização rápida. Neste processamento ocorre a separação da fração de hemicelulose presente no bagaço de cana, por um fenômeno de afrouxamento e ao mesmo tempo há uma liberação de grupos acetila da hemicelulose. Assim, durante o processo de explosão-autohidrólise o líquido é acidificado provocando a hidrólise da hemicelulose (auto-hidrólise). Isto é

devido a que as ligações glicosídicas da hemicelulose são mais lábeis do que aquelas presentes na celulose(12). Os monossacarídeos formados degradam-se com formação de furfural. Os resultados estão apresentados no Quadro 4.

QUADRO 4. Efeito da relação água: bagaço na extração de hemicelulose durante o pré-tratamento de explosão-autohidrólise do bagaço de cana.

Proporção água:bagaço	Autohidro- lise.	Autohidro- lise e hi- drolise en- zimática.	Autohidro- lise e hi- drolise ácida
	Açúcares redutores totais g/100 g bagaço		
5:1	0,53	1,24	1,43
8:1	1,30	3,08	3,55
10:1	1,24	2,93	3,37

O conteúdo de água na mistura água: bagaço influenciou a liberação de hemicelulose e açúcares redutores durante o processo de explosão-autohidrólise e foi observado maior eficiência na proporção água: bagaço 8:1 (v/p). Após a hidrólise enzimática e ácida do líquido obtido do processo de explosão -autohidrólise, observou-se um aumento na concentração de açúcares redutores.

Na figura 7 pode-se observar a presença de açúcares redutores antes e após a hidrólise enzimática e ácida do extrato líquido obtido do processo de explosão-autohidrólise. Em ambos os casos verificou-se uma maior quantidade de pentose

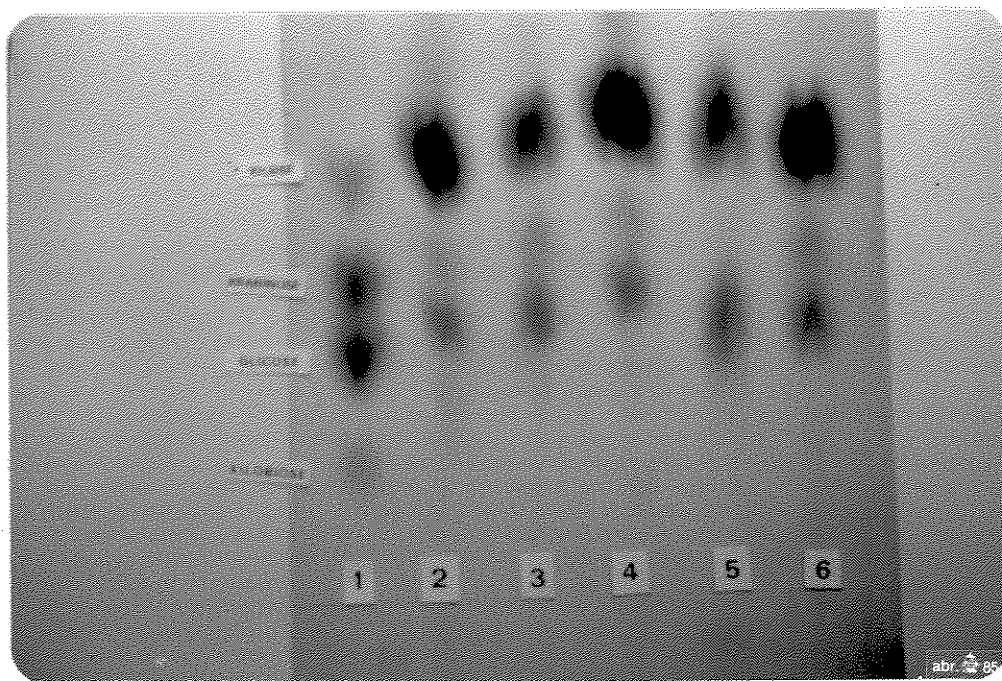


FIG. 07 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E ÁCIDA DO EXTRATO LÍQUIDO DO PROCESSO DE EXPLOÇÃO-AUTOHIDRÓLISE.

1. Açúcares padrões;
2. Líquido do processo de explosão-autohidrólise
3. Líquido do processo de explosão-autohidrólise, hidrolisado por enzimas do *T. reesei* QM 9414.
4. Líquido do processo de explosão-autohidrólise, dialisado e hidrolisado com enzimas do *T. reesei* QM 9414.
5. Líquido do processo de explosão-autohidrólise, dialisado e hidrolisado com solução 5% (v/v) de H_2SO_4 .
6. Hemicelulose obtida pelo método de pré-tratamento alcalino e hidrolisada com enzimas do *T. reesei* QM 9414.

na forma de xilose, indicando que a hemicelulose do bagaço de cana foi liberada no processo. Ao mesmo tempo pode-se observar que a hemicelulose sofreu uma hidrólise parcial que foi completada pela ação das hemicelulases ou do ácido diluído.

Durante o processo de explosão-autohidrólise há liberação de substâncias que inibem o desenvolvimento microbiano, sendo o furfural e o hidroximetil furfural os compostos mais conhecidos (25; 30). Este fato também foi observado durante o desenvolvimento do presente trabalho. O líquido obtido da autohidrólise foi submetido a tratamento visando a eliminação destas substâncias. Isto foi conseguido através da diálise de acordo com o item 3.2.6.

O Quadro 5 mostra o teor de celulose, hemicelulose e lignina no líquido de autohidrólise dialisado denominado Fração IV e no bagaço seco (parte insolúvel) denominado Fração V, obtidos pelo processo de explosão-autohidrólise.

A Fração IV apresentou alto teor de hemicelulose e baixo conteúdo de lignina, não apresentando celulose. Por outro lado, a Fração V apresentou alto conteúdo de celulose e valor considerado normal de lignina em relação ao bagaço intacto. Porém o conteúdo de hemicelulose na Fração V foi relativamente alto em comparação aos resultados obtidos por Dekker e colaboradores (25). Estes autores obtiveram 90% de solubilização da heteroxilose do bagaço de cana pré-tratado com o processo de explosão-autohidrólise e teores de celulose e lignina de 50-60% e 29-34% respectivamente (25).

QUADRO 5. Teor de celulose, hemicelulose e lignina nas Frações IV e V do bagaço de cana de açúcar obtidas pelo pré-tratamento de explosão-autohidrólise.

Amostra	Celulose (%) ⁺	Hemicelulase (%) ⁺	Lignina (%) ⁺
Fração IV	0,00	39,0	3,1
Fração V	52,00	15,7	22,3
Bagaço de cana seco e moído (sem tratamento)	34,4	22,4	20,3

+ base seca

4.4. Hidrólise das frações do bagaço de cana por enzimas celolíticas.

As Frações I, II, III do bagaço de cana foram obtidas pelo pré-tratamento alcalino de acordo com o método descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4 e as Frações IV e V foram obtidas pelo processo de explosão-autohidrólise como descrito no item 3.2.5. Estas frações foram hidrolisadas por enzimas celolíticas de acordo com o item 3.2.6 e os resultados estão apresentados na figura 8.

Como vemos na figura 8 o maior grau de hidrólise foi obtido com a Fração II deslignificada após a extração alcalina. No Quadro 3 apresentam-se os teores de celulose, hemicelulose e lignina nas diferentes frações do bagaço. A Fração II

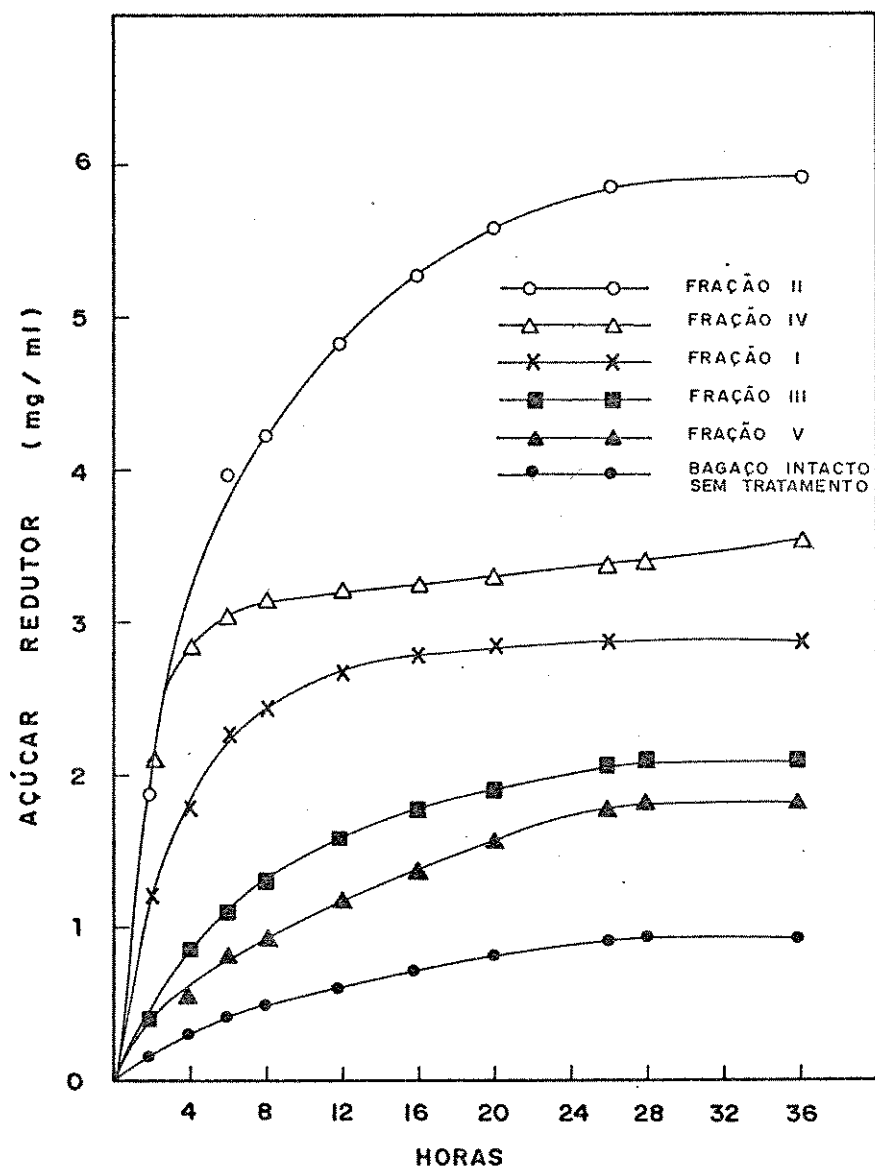


FIGURA Nº 8 : HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS FRAÇÕES DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR OBTIDAS DO PRÉ-TRATAMENTO AL-CALINO E DO PROCESSO DE EXPLOÇÃO-AUTOHIDRÓLISE.

apresentou maior susceptibilidade à ação enzimática porque contém um baixo teor de lignina e também porque esta fração apresenta maior proporção de hemicelulose que é mais suscetível à hidrólise ácida, alcalina e enzimática. Além disso, as enzimas celulolíticas de *T. reesei* contêm ambas atividades, hemicelulase e celulasas, como mostra o Quadro 1.

As outras frações, apesar de conterem maior quantidade de celulose, apresentam teores de lignina acima de 20% o que representa uma maior dificuldade no acesso da enzima ao substrato. Pode-se observar na figura 8 que a Fração IV apresentou maior grau de hidrólise do que a Fração I e menor do que a Fração II. Apesar da lignina na Fração IV ser menor do que na Fração II, esta última apresentou um teor maior de hemicelulose. O baixo conteúdo de lignina presente em ambas frações, parece não afetar a hidrólise enzimática.

Ambos processos de extração das Frações II e IV visaram basicamente extrair a hemicelulose. A lignina presente nestas Frações não estariam na forma organizada como no caso dos substratos naturais não tratados e não interferiria no acesso da enzima ao substrato.

Observou-se que o grau de hidrólise da Fração V, da qual foi removida parcialmente a hemicelulose pelo processo de explosão-autohidrólise, foi maior do que o grau de hidrólise do bagaço sem tratamento, porém menor do que a Fração III, resíduo insolúvel de bagaço de cana tratado com NaOH.

Tanto a celulose como a hemicelulose, nos materiais lignocelulósicos, encontram-se protegidos do ataque enzimático. Esta proteção é devida, principalmente à associa-

ção destes polissacarídeos com a lignina, que atua como uma barreira, envolvendo-os.

As características estruturais da celulose tais como grau de cristalinidade, de polimerização, de entumescimento com água e área de superfície limitam o acesso da enzima ao substrato e isto afeta a velocidade de hidrólise da celulose (19).

Os resultados mostrados na figura 8 indicam que o bagaço pré-tratado com NaOH 4% é mais susceptível ao ataque enzimático do que o bagaço obtido do processo de explosão-autohidrólise. Tem-se reportado que o bagaço de cana de açúcar pré-tratado com NaOH 1% apresentou o mesmo grau de hidrólise do bagaço obtido do processo de explosão-autohidrólise(25). Sabe-se que neste último processo não acontecem modificações significativas no grau de cristalinidade da celulose, sendo que no pré-tratamento com álcali a diminuição do grau de cristalinidade do material celulósico é uma modificação importante facilitando assim o ataque enzimático(31). Por outro lado, a possibilidade de formação de complexos de lignina-carboidrato durante o processo de explosão-autohidrólise que dificultam a atuação das celulasas, tem sido considerada por alguns pesquisadores como uma das causas do menor grau de hidrólise dos substratos submetidos a este pré-tratamento (25). Entretanto, em ambos os pré-tratamentos foi verificado, que a hemicelulose é removida, Quadro 3 Fração III e Quadro 5 Fração V, deixando o material pré-tratado mais susceptível ao ataque enzimático. Assim, temos que no processo de pré-tratamento com álcali acontecem duas modificações importante em relação à atuação das enzimas celulolíticas, isto é, a diminuição do

grau de cristalinidade e a remoção da hemicelulose, resultando desta maneira um material mais adequado ao ataque enzimático. No caso do bagaço pré-tratado com o processo de explosão-autohidrólise, verifica-se a remoção parcial da hemicelulose, mas a provável formação de complexos de lignina - carboidrato torna este material menos apropriado ao ataque enzimático.

É importante salientar também, que neste estudo o tratamento com álcali foi realizado utilizando-se solução de NaOH 4% e por um tempo de contato de mais de 12 horas no qual, provavelmente se produz um material mais susceptível ao ataque enzimático que no pré-tratamento com solução 1% de NaOH e com tempo de contato de 2 horas, utilizado por outros pesquisadores (66).

4.5. Fermentação alcoólica

De acordo com os resultados anteriormente discutidos no item 4.4, as frações mais adequadas à hidrólise enzimática foram as Frações II e IV. A Fração II caracterizou-se por seu elevado conteúdo de hemicelulose, que após hidrólise com as enzimas celulolíticas apresentou um alto teor de pentoses, principalmente de xilose e pequena quantidade de glicose. A Fração IV, como foi discutido no item 4.3, Quadro 5, também apresentou alto teor de hemicelulose e xilose após o pré-tratamento de explosão-autohidrólise. As Frações III e V apresentaram alto teor de celulose; entretanto, a hidrólise das mesmas com enzimas celulolíticas não forneceu quantidade suficiente de xilose. Não sendo o objetivo deste trabalho estudar pré-tratamentos do bagaço de cana de açúcar e estando mais

interessado na fermentação alcoólica de pentoses, foram escolhidas para estudos mais detalhados as Frações II e IV.

As pentoses, especialmente xiloses, podem ser fermentadas à etanol por diferentes tipos de bactérias como *Bacillus macerans*, *Clostridium thermosaccharoliticum* e *Klebsiella pneumoniae* (37; 60) e por alguns fungos filamentosos tais como *Fusarium*, *Mucor* e *Monilia* (47; 118). Estes microrganismos fermentam a xilose formando uma mistura de produtos de fermentação, além do etanol. Portanto, este processo não é eficiente. Até há pouco tempo atrás, considerava-se que as leveduras não podiam fermentar a xilose à etanol diretamente mas, podiam fermentar a D-xilulose à etanol (7; 105) e, neste caso a xilose deveria ser convertida à xilulose pela enzima xilose-isomerase (49). Mais tarde, independentemente, Schneider, Slininger e colaboradores (94; 98) descobriram que uma linhagem de levedura *Pachysolen tannophilus* podia fermentar diretamente xilose à etanol. Recentemente, tem-se informado que a xilose e glicose do hidrolisado de hemicelulose da palha de trigo eram fermentadas à etanol por *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 (28; 29; 30). Considerando estes resultados, escolhemos a levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 para fermentar diretamente xilose e glicose dos hidrolisados das Frações II e IV do bagaço de cana de açúcar à etanol

4.5.1. Fermentação alcoólica de xilose e glicose por *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460

A fermentação alcoólica de glicose e de xilose pura por *P. tannophilus* NRRL Y-2460 foi realizada de acordo com

o item 3.2.7. Os resultados estão apresentados nas figuras 9, 10 e 11 e nos Quadros 6 e 7 do Anexo I. Os resultados da cinética de fermentação estão ilustrados no Quadro 8.

QUADRO 8. Estudo cinético da fermentação de xilose e glicose por *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460

Substrato	Taxa Específica de		
	Crescimento Celular	Produção de Etanol	Consumo de Açúcar Redutor
	hr ⁻¹	g.g ⁻¹ .h ⁻¹ *	g.g ⁻¹ .h ⁻¹ **
Xilose	0,17	0,034	0,14
Glicose	0,18 0,0125	0,138	0,473

* Gramas de etanol/gramas de levedura/hora

** Gramas de substrato/gramas de levedura/hora

Como pode ser observado na figura 9 e Quadro 6, houve um consumo lento de xilose durante as primeiras 20 horas de fermentação. Na fase inicial, a xilose foi transformada principalmente em massa celular. A produção de etanol, neste período, foi desprezível enquanto que houve a formação de 4,15 gramas de massa celular por litro de meio de fermentação, como pode ser observado nas figuras 10 e 11 respectivamente. Após 20 horas de fermentação, houve um consumo rápido de xilose, à uma taxa específica de 0,14 g de xilose por grama de levedura por

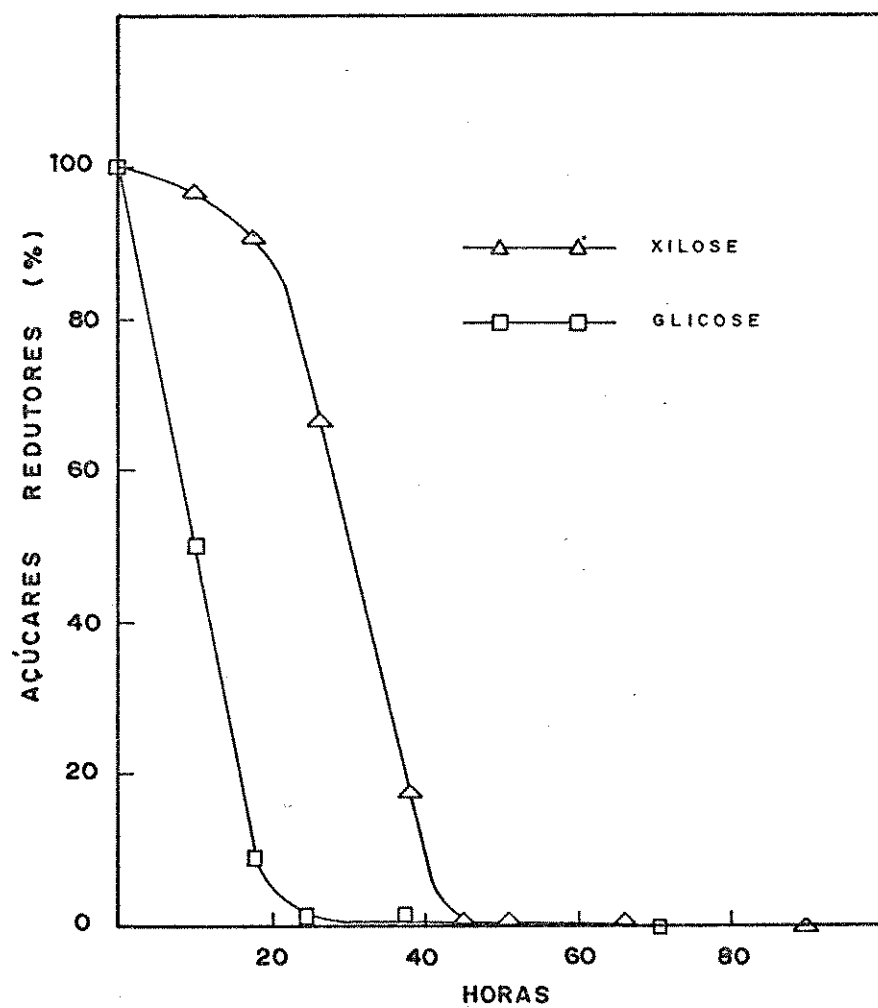


FIGURA Nº 9 : CONSUMO DE XILOSE E GLICOSE DURANTE A FERMENTAÇÃO POR Pachysolen tannophilus NRRL Y-2460.

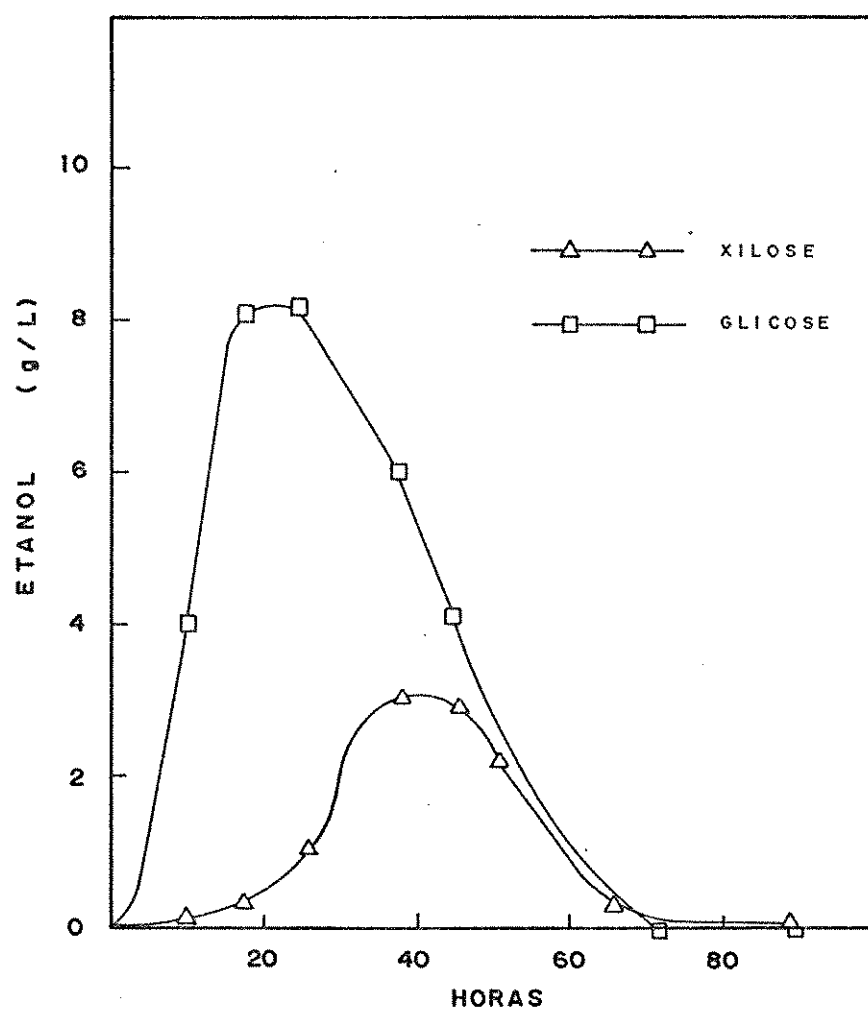


FIGURA Nº 10 : PRODUÇÃO DE ETANOL DURANTE A FERMENTAÇÃO DE XILOSE E GLICOSE POR Pachysolen tannophilus NRRL Y-2460.

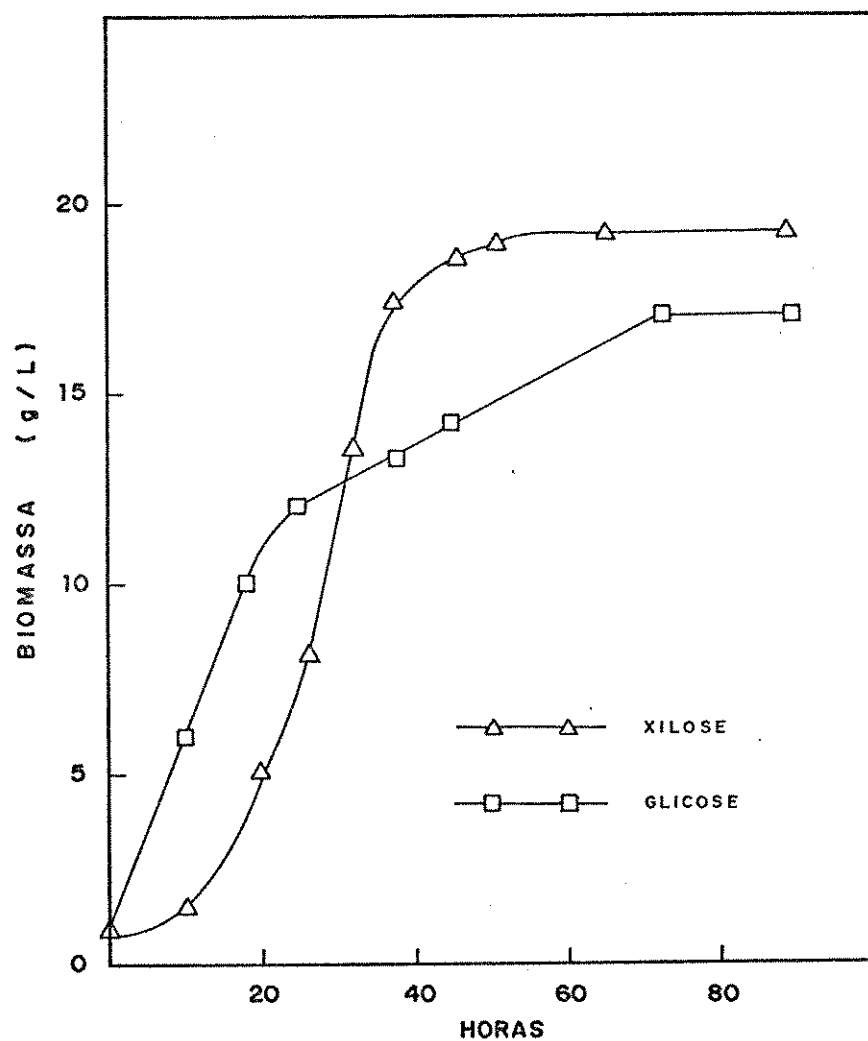


FIGURA Nº 11 : CRESCIMENTO DE *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE XILOSE E GLICOSE.

hora, como pode ser observado no Quadro 8 e figura 9. Este rápido consumo de xilose foi observado até aproximadamente 40 horas de fermentação, quando a xilose foi reduzida para uma concentração de mais ou menos 0,3 g por litro de meio de fermentação. Paralelamente, como pode ser observado no Quadro 6 e figura 10, a concentração de etanol atingiu o valor máximo de 3,2 g/L de meio e diminuiu com o prosseguimento da fermentação. Por outro lado, o microrganismo iniciou o crescimento exponencial após 20 horas de fermentação, à uma taxa específica de $0,17 \text{ h}^{-1}$ até aproximadamente 36 horas. Após este período o crescimento celular diminuiu e a fase estacionária foi atingida após 55 horas de fermentação, como pode ser observado na figura 11 e Quadro 6.

Na fermentação de *P. tannophilus* NRRL Y-2460 em meio contendo xilose, o etanol foi produzido na fase exponencial a uma taxa específica de 0,034 g de etanol por grama de levedura por hora.

Foi obtido o rendimento de 0,158 g de etanol por grama de xilose consumida.

A produção máxima de etanol 3,20 g/L foi obtida após 38 horas de fermentação. O consumo de xilose e a formação de massa celular no meio de cultura, neste mesmo período, foram respectivamente 20,2 g/L e 16,5 g/L. Assumindo que o rendimento teórico de transformação de xilose à etanol é 0,51g. de etanol/g de xilose (49; 98) e considerando-se o consumo de 20,2 g de xilose, o rendimento de etanol durante a fermentação foi 61% deste valor. Considerando-se que a célula de levedura apresenta na sua composição entre 45 e 50% de carbono em base seca, e tendo-se em conta que o etanol formado foi assimi

lado em parte pela própria levedura, (72) como pode-se observar na figura 10 e Quadro 6, verificou-se que 74% da xilose consumida durante o processo de fermentação foi utilizada na formação de biomassa, manutenção ou formação de outros metabólitos, restando-se somente 26% para a produção de etanol. Considerando-se o etanol produzido proveniente da xilose disponível para a fermentação alcoólica, o rendimento de transformação de xilose à etanol foi de 77%. O baixo rendimento na produção de etanol é causado principalmente pelo alto consumo de xilose pela levedura para a formação de biomassa. Por outro lado, existe a possibilidade de formação de outros produtos além de etanol e dióxido de carbono (79).

Durante o processo de fermentação, particularmente durante a fase de consumo rápido de xilose, observou-se um abaixamento de pH a valores menores que 2, o que se deve provavelmente, à formação de ácidos orgânicos (44). O alto rendimento de biomassa, de aproximadamente 0,76 g de levedura/g de xilose consumida, afetou os outros valores cinéticos em relação aos obtidos por outros pesquisadores (73). Nos estudos realizados por Slininger e colaboradores (98) somente 11% da xilose foi utilizada pela levedura para o aumento da massa celular, sendo esta última de 4,4 g/L. Por outro lado, estudos cinéticos de fermentação de xilose a concentrações menores de 50 g/L não tem sido feitos por serem considerados concentrações não comerciais do ponto de vista da fermentação industrial da xilose (98).

No caso da fermentação da glicose, observou-se um consumo rápido, sem fase de adaptação da levedura (Fig. 9). Em menos de 24 horas de fermentação a concentração de glicose

no meio atingiu níveis abaixo de 0,5 g/L. Após 46 horas de fermentação o consumo de glicose cessou ficando uma concentração final de 0,16 g/L. A taxa específica de consumo de glicose foi de 0,473 g de glicose/g de levedura/hora, 3,4 vezes maior do que no caso da fermentação de xilose (Quadro 8).

A figura 11 mostra o crescimento celular com a formação de 16,15 g. de massa celular após 90 horas de fermentação. O *P. tannophilus* apresentou um crescimento exponencial logo no início da fermentação com uma taxa específica de crescimento de $0,18 \text{ h}^{-1}$, comparável com a obtida em xilose (Quadro 8). A fase exponencial de crescimento foi mantida durante as primeiras 20 horas de fermentação. Em seguida houve diminuição do crescimento para uma taxa de $0,0125 \text{ h}^{-1}$, fase mantida até as 70 horas de processo (Fig. 11). Após este período, a levedura passou para a fase estacionária. Por outro lado, como se observa na Fig. 10, a produção de etanol iniciou-se logo no começo da fermentação com uma taxa específica de produção de 0,138 g de etanol/g de levedura/hora correspondendo a uma taxa 4 vezes maior do que no caso da fermentação de xilose. O valor máximo da concentração de etanol foi de 8,2 g/L, valor este 2,6 vezes maior do que no caso da xilose, obtido após 26 horas de fermentação. Após este período, como pode-se observar na figura 10, a concentração de etanol começou a diminuir e foi totalmente consumido após 90 horas de fermentação. Este comportamento, idêntico ao verificado na fermentação de xilose, coincidiu com o esgotamento de glicose e diminuição da velocidade de crescimento, e sugere o consumo de etanol pela levedura. Este fenômeno tem sido observado por outros pesquisadores que além de atribuírem esta diminuição na concentração de etanol a um processo de assimilação oxida-

tiva por parte da levedura, sugerem perdas por evaporação do etanol produzido (72; 98).

No Quadro 7 pode-se observar que para cada grama de glicose consumida, são formados 0,8 gramas de massa celular e 0,384 gramas de etanol. Estes valores são superiores aos obtidos com xilose, com a diferença que neste caso 40% da glicose foi consumida para formação de biomassa e manutenção enquanto que 60% foi destinada à formação de etanol. Considerando-se o etanol produzido como sendo proveniente da glicose disponível para a fermentação alcoólica, a conversão de glicose à etanol foi de 82%. Assim, o processo de fermentação alcoólica utilizando-se glicose como fonte de carbono apresentou um aproveitamento 5% maior na conversão à etanol e destinou mais 34% das fontes de carbono para a produção de etanol em comparação à fermentação da xilose. Neste último caso observou-se uma maior tendência à produção de biomassa do que à produção de etanol sob as condições experimentais utilizadas neste trabalho.

Sabe-se que a produção de etanol por *Pachysolen tannophilus* em condições aeróbicas caracteriza-se pela sua dependência da intensidade de aeração (72). Assim, quando a aeração diminui, a velocidade de crescimento também diminui, porém, a concentração de etanol no meio aumenta e o tempo para atingir a produção máxima de etanol diminui. Em processos de fermentação excessivamente aerados, é possível obter concentrações menores do que 0,1% (94). Os baixos rendimentos de etanol obtidos durante o desenvolvimento da fermentação de xilose e glicose foram devido em grande parte ao excesso de aeração utilizado nos nossos experimentos. Segundo Schneider

e colaboradores (94), 50mL de meio de cultura incubado a 30°C em frascos de Erlenmeyer de 500mL a 150 rpm, constitui um sistema altamente aerado. Slininger e colaboradores também salientaram este fato (98). Os dados destes pesquisadores mostraram essencialmente que não havia crescimento celular na ausência de oxigênio e consequentemente não havia fermentação quando o inóculo era muito diluído. Entretanto, quando o inóculo era concentrado, a produção de etanol acontecia ainda sob condições anaeróbicas e na ausência de desenvolvimento celular. Nestas condições a alta densidade do inóculo contribuía para a manutenção do oxigênio em nível suficientemente baixo (61). Por outro lado, as condições experimentais utilizadas por estes pesquisadores diferem substancialmente das usadas no presente trabalho. Isto contribuiu em grande parte para a obtenção das diferenças nos resultados experimentais.

4.5.2. Fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático e ácido da Fração II, obtida do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar por *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460.

A Fração II foi obtida pelo tratamento alcalino do bagaço de cana de açúcar, de acordo com o método descrito no item 3.2.4. A hidrólise desta fração a açúcares foi realizada de acordo com o item 3.2.6. O hidrolisado obtido foi fermentado pelo *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 de acordo com 3.2.7. Os resultados estão apresentados nas figuras 12, 13 e 14 e nos Quadros 9 e 10 do Anexo I.

Na figura 12 pode-se observar o consumo de substrato durante a fermentação do hidrolisado enzimático e ácido da

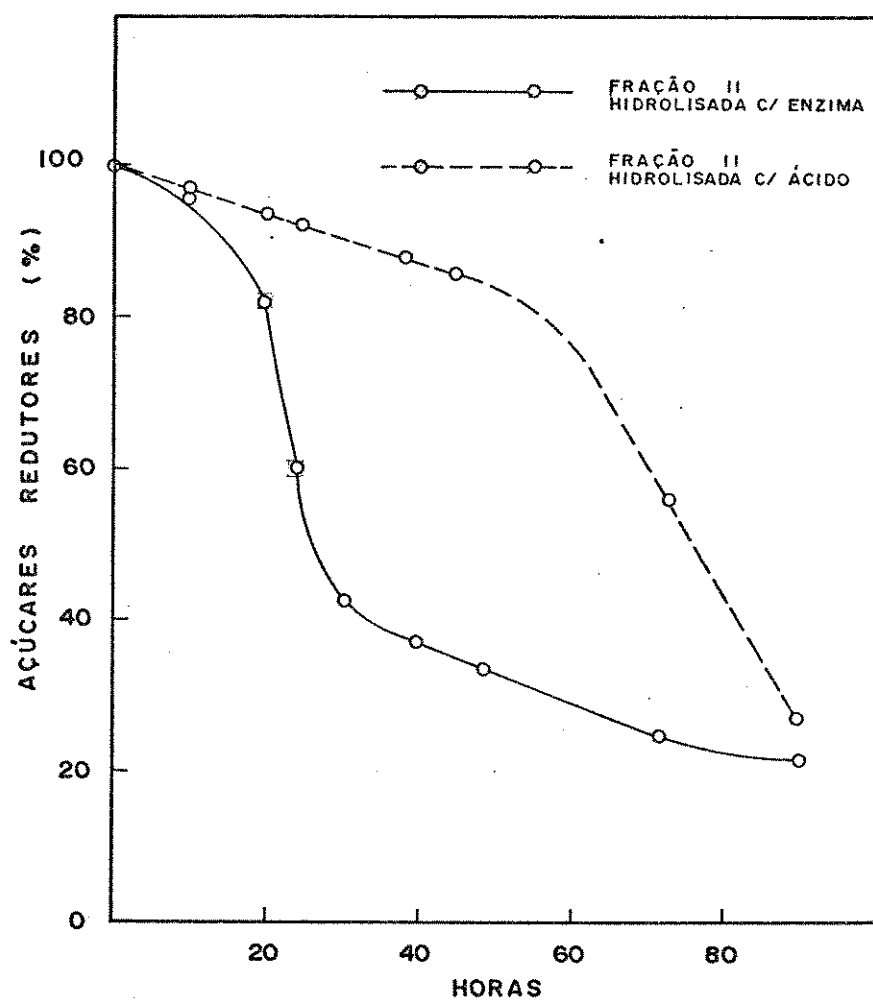


FIGURA Nº 12 : CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES DOS HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS E ÁCIDOS DA FRAÇÃO II DURANTE A FERMENTAÇÃO POR Pachysolen tannophilus NRRL Y-2460.

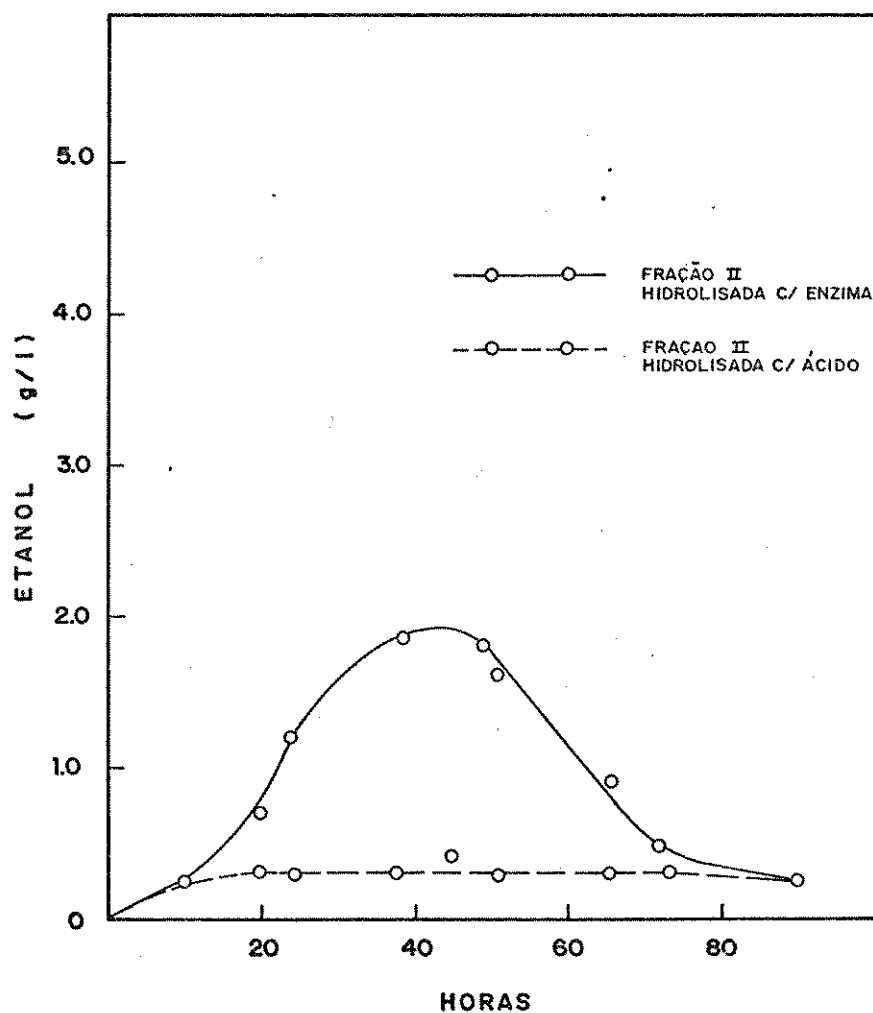


FIGURA Nº 13 : PRODUÇÃO DE ETANOL DOS HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS E ÁCIDOS DA FRAÇÃO II DURANTE A FERMENTAÇÃO POR Pachysolen tannophilus NRRL Y- 2460.

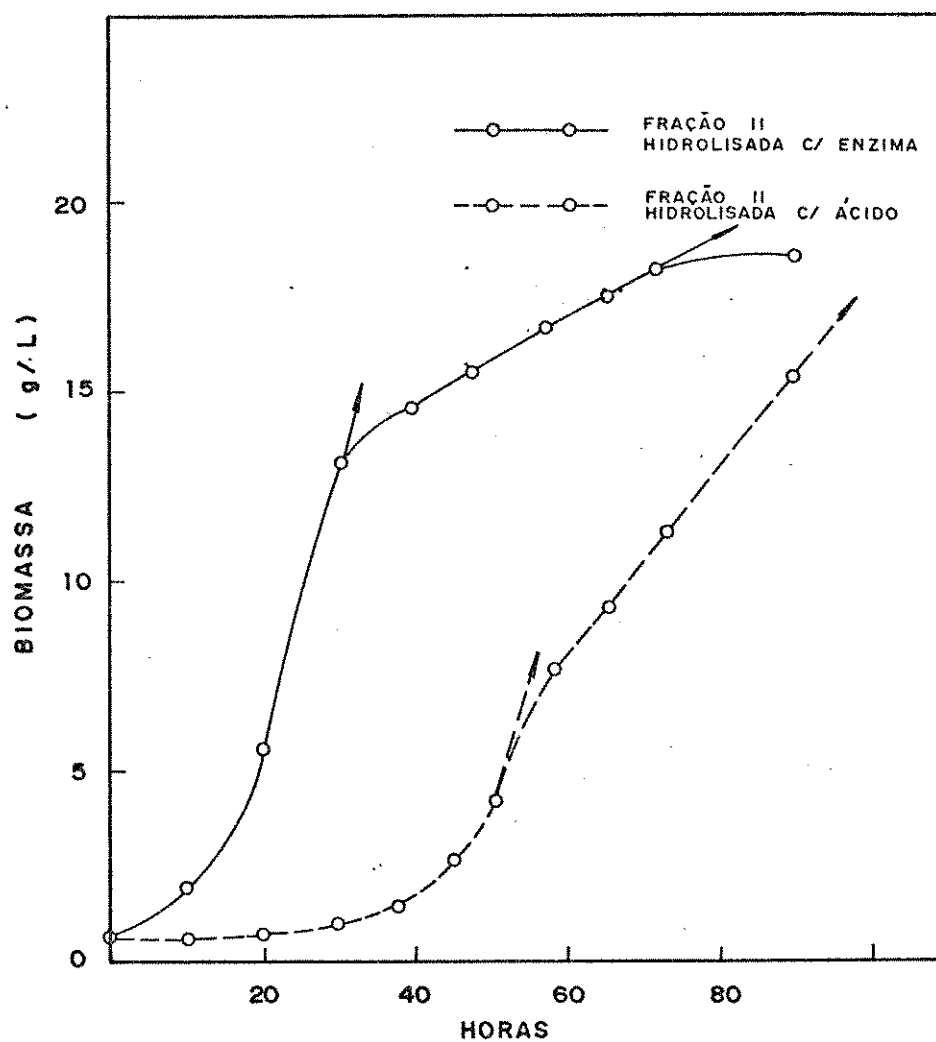


FIGURA Nº 14 : CRESCIMENTO DE *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DOS HIDROLISADOS ENZIMÁTICO E ÁCIDO DA FRAÇÃO II.

Fração II. Na fermentação do hidrolisado enzimático, a levedura apresentou uma fase inicial de consumo lento de substrato, de aproximadamente 20 horas e em seguida uma fase de consumo rápido de substrato de cerca de 10 horas, de velocidade de consumo 1,05 g de substrato/h a uma taxa específica de 0,13 g de substrato/g de levedura/hora. Nas últimas 50 horas de fermentação a velocidade de consumo diminuiu para 0,078 g de substrato/h. Após 90 horas de fermentação foram consumidos 18,8 g/L de substrato expressos como açúcares redutores.

Na fermentação do hidrolisado ácido observou-se consumo inicial lento de 0,070 g de substrato/h a uma taxa específica de consumo de 0,068 g de substrato/g de levedura / hora. Esta fase de consumo lento de substrato teve uma duração de aproximadamente 50 horas e foi seguida por uma fase de consumo rápido, de velocidade 0,353 g de substrato/h, a uma taxa específica de 0,0316 g de substrato/g de levedura/ hora que persistiu por cerca das 40 horas seguintes. Após 90 horas de fermentação do hidrolisado ácido da Fração II foram consumidos 15,9 g de substrato expressos como açúcares redutores.

Na figura 13 pode-se observar que a fase de produção de etanol a partir do hidrolisado enzimático da Fração II está associada às fases de velocidade máxima de consumo de substrato e de crescimento celular. A concentração de etanol atingiu um valor de 1,9 g/L após 40 horas de fermentação, e em seguida decresceu continuamente.

A maior velocidade de produção de etanol, 0,17g/h, foi verificada no período de 20 à 25 horas de fermentação com uma taxa específica de aproximadamente 0,0235 g de etanol/g de levedura/h.

Na fermentação do hidrolisado ácido da fração II, a produção de etanol não foi significativa, chegando a um valor máximo de 0,4 g/L após 45 horas de fermentação.

Na figura 14 se apresentam as curvas de crescimento celular de *P. tannophilus* NRRL Y-2460 durante a fermentação do hidrolisado enzimático e ácido da fração II. Na fermentação do hidrolisado enzimático da fração II, o crescimento celular iniciou-se imediatamente após a inoculação apresentando uma velocidade específica de $0,11 \text{ h}^{-1}$ na vigésima hora de fermentação e de $0,04 \text{ h}^{-1}$ na trigésima hora. Esta diminuição da velocidade de crescimento coincidiu com a diminuição da taxa específica de consumo de substrato.

Na fermentação do hidrolisado ácido da fração II, o *P. tannophilus* apresentou um período de latência de aproximadamente 30 horas. Após esta fase, a levedura iniciou um desenvolvimento relativamente rápido, com uma velocidade específica de $0,12 \text{ h}^{-1}$ no período de 49 a 53 horas de fermentação. A seguir verificou-se um período de aproximadamente 35 horas onde a velocidade de crescimento diminuiu chegando a valores de $0,031 \text{ h}^{-1}$ na sexagésima hora e de $0,019 \text{ h}^{-1}$ na nonagésima hora de fermentação.

A figura 7 ilustra os açúcares redutores presentes no hidrolisado enzimático da Fração II. Além da xilose, o hidrolisado apresentou glicose e pequena quantidade de arabinose. É importante para evitar perda de substrato que o microrganismo seja capaz de utilizar o maior número de açúcares possível. Como pode-se observar no Quadro 11, o *P. tannophilus* produz etanol a partir de glicose, manose, xilose e frutose porém produz quantidades mínimas a partir de arabinose, galacto-

se, sacarose e maltose. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros pesquisadores (7; 61; 70; 94; 98).

QUADRO 11. Produção de etanol por *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 a partir de vários açúcares.

Açúcar	Etanol (% p/v)
Sacarose	0,029
Galactose	0,045
Arabinose	0,074
Maltose	0,093
Manose	0,677
Xilose	0,610
Glucose	0,710
Frutose	1,310

Na fermentação do hidrolisado enzimático de Fração II, verificou-se que o substrato foi aproveitado em grande parte para a formação de biomassa; para cada grama de açúcar redutor consumido formaram-se 0,94 g de massa celular e 0,10 g de etanol.

Por outro lado, na fermentação do hidrolisado ácido da Fração II, formaram-se aproximadamente 0,93 g de massa celular e 0,025 g de etanol para cada grama de açúcar redutor consumido.

A produção de etanol por leveduras depende em grande parte das condições experimentais (98). A intensidade de aeração é talvez o fator mais importante nas fermentações em que o *P. tannophilus* participa e a xilose é a fonte de carbono (94). Um dos fatores que indicariam a necessidade de otimizar as condições de fermentação seria o consumo de etanol enquanto ainda existe xilose ou outro açúcar fermentecível em quantidades significativas, no meio de fermentação. Este consumo de etanol tem sido observado particularmente nas fermentações com *P. tannophilus* (94). Maleszka e Schneider (71) relataram que a D-glicose inibe o consumo de etanol e que esta inibição aumenta com o incremento desta hexose. Verificaram também que a xilose e a arabinose apresentam esta característica porém em menor grau.

Como pode ser observado no Quadro 9 e Figura 13, o consumo de etanol iniciou-se no período entre 44 a 47 horas de fermentação, quando a concentração de açúcares diminuiu para 9,1 g/L. Nesta fase a xilose havia sido consumida ou a concentração de açúcares era suficientemente baixa para produzir qualquer tipo de inibição no processo de assimilação do etanol. Por outro lado se os açúcares presentes no meio de fermentação não são facilmente assimiláveis pela levedura, está tenderá a consumir uma fonte de carbono alternativa que neste caso seria o etanol produzido.

Como se observa na figura 12, no final da fermentação 21,7% e 26,7% dos açúcares redutores respectivamente, dos hidrolisados enzimático e ácido, não foram consumidos possivelmente por serem de difícil assimilação pela levedura.

De acordo com os resultados da cromatografia em

papel, na figura 7, a arabinose seria um dos açúcares presentes no hidrolisado enzimático da fração II, não utilizados pelo *P. tannophilus*.

Além da presença de açúcares não fermentáveis verificou-se que a porcentagem de conversão da hemicelulose presente na fração II à açúcares redutores por hidrólise enzimática foi em torno de 80%, deixando cerca de 20% da hemicelulose intacta. Em ambos os casos a levedura não teve condições de aproveitar estes carboidratos para a produção de etanol ou como fonte de carbono assimilável por vias oxidativas para a formação de massa celular. Assim os rendimentos alcoólicos obtidos foram baixos tanto a partir do hidrolisado enzimático quanto a partir do hidrolisado ácido. O rendimento alcoólico do hidrolisado enzimático da fração II foi 38,4% do rendimento teórico, valor considerado baixo e comparável ao valor 33,2% obtido por Detroy e colaboradores (29) para hidrolisados de palha de trigo. Deve ser considerado que estes pesquisadores utilizaram 4,3% de xilose e condições diferentes de fermentação enquanto que neste trabalho foi utilizado 2,5% de xilose no meio de fermentação.

No caso do hidrolisado ácido, o rendimento alcoólico foi ainda mais baixo atingindo 26% do valor teórico sugerindo a presença de substâncias inibidoras como derivados de lignina, produtos de degradação de açúcares e da hemicelulose, como por exemplo furfural e hidroximetilfurfural (29; 30).

A figura 15 apresenta o crescimento celular do *P. tannophilus* em xilose pura e no hidrolisado enzimático da fração II. Observou-se que a levedura apresentou fenômeno diauxico de crescimento na fermentação do hidrolisado enzimático

da fração II. Verifica-se pela figura 16, que a levedura utilizou primeiro a glicose e depois a xilose como fonte de carbono. A diminuição da velocidade de crescimento celular que se verificou após 40 horas de fermentação do hidrolisado enzimático da fração II pode também estar associada ao consumo de etanol produzido. Schneider e colaboradores (94) sugeriram que o *P. tannophilus* consumiria primeiro a glicose numa mistura de glicose e galactose.

4.5.3. Fermentação alcoólica do hidrolisado enzimático e ácido da fração IV, obtida do pré-tratamento explosão-autohidrólise do bagaço de cana de açúcar, por *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460.

A fermentação alcoólica dos hidrolisados da fração IV, foi realizada de acordo com o item 3.2.7. Os resultados estão apresentados nas figuras 17, 18 e 19 e nos quadros 12 e 13 no anexo I. A hidrólise da fração IV com enzimas celulolíticas e com ácido sulfúrico diluído foi realizada nas condições descritas no item 3.2.6.

Na figura 17, pode-se observar o consumo de açúcares redutores dos hidrolisados da fração IV durante a fermentação por *Pachysolen tannophilus*. Na fermentação do hidrolisado enzimático verificou-se uma fase de 15 horas de consumo lento de açúcares redutores e logo em seguida uma fase de consumo rápido de substrato, de 1,25 g de açúcares redutores/h, no período de 20 à 26 horas de fermentação, com taxa específica de consumo de 0,21 g e de 0,13 g de açúcar redutor/g de levedura na vigésima e na vigésima sexta hora, respectivamente.

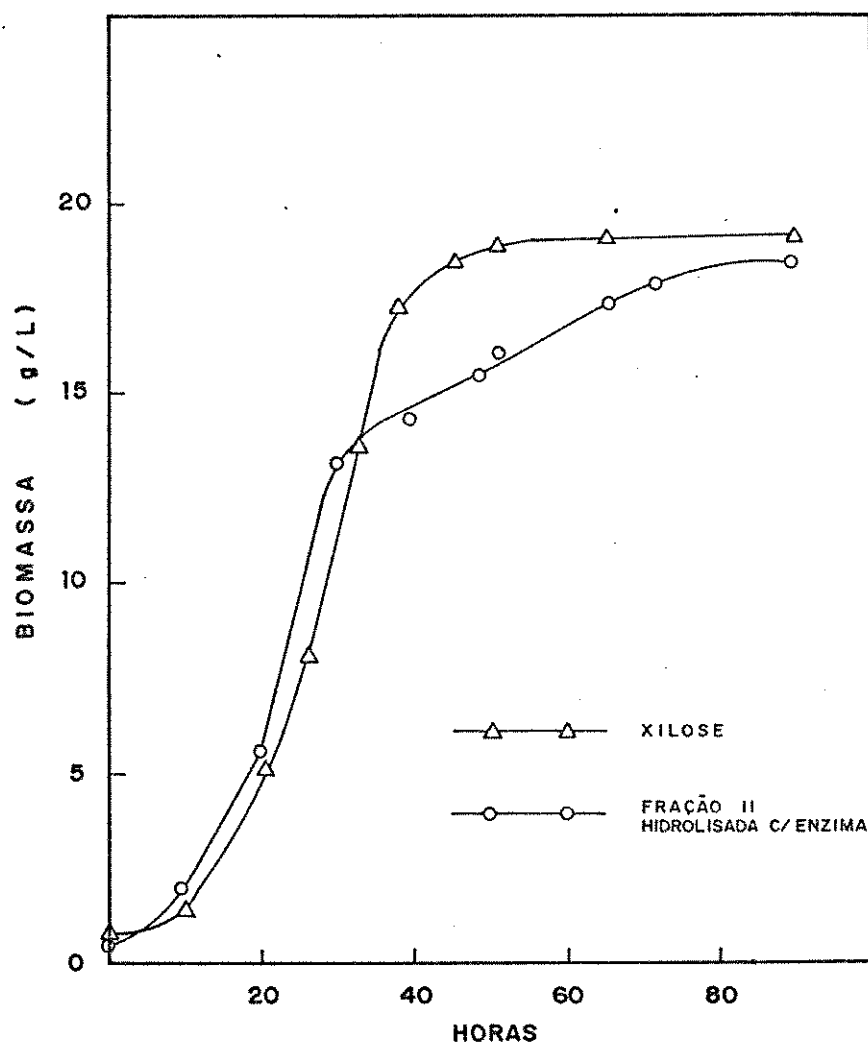


FIGURA Nº 15 : CRESCIMENTO DE *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 DURANTE A FERMENTAÇÃO DE XILOSE E DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO II .

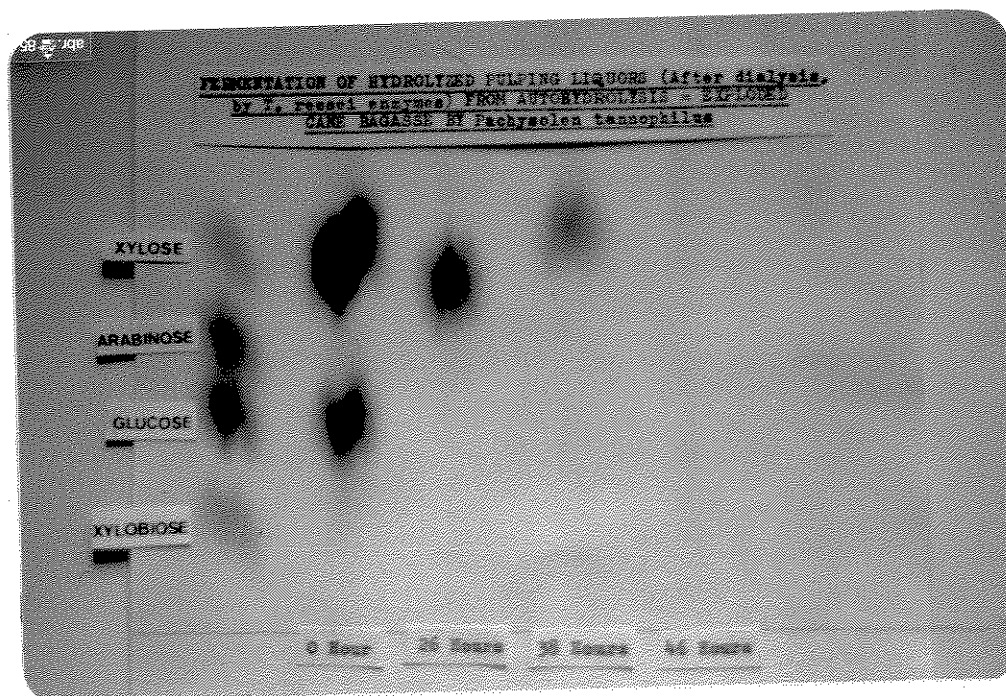


FIG: 16 CONSUMO DE GLICOSE E XILOSE DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO IV, DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, POR *PACHYSOLEN TANNOPHILUS* NRRL Y-2460.

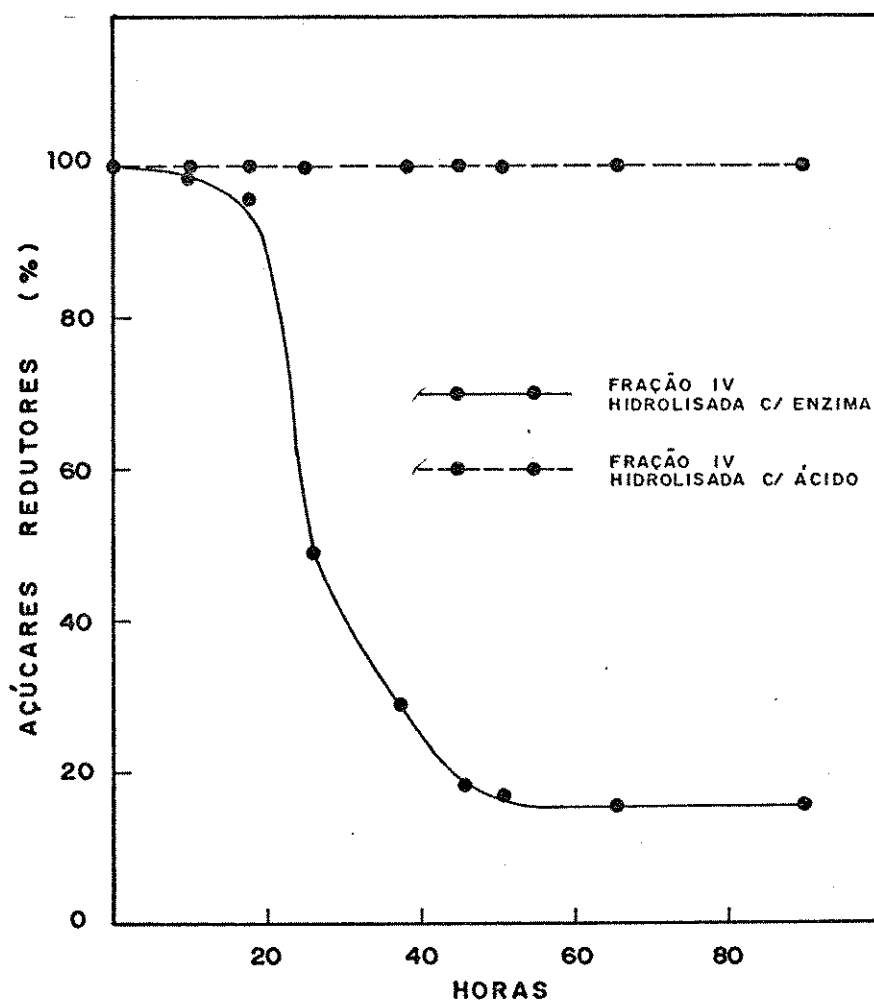


FIGURA Nº 17 : CONSUMO DE AÇÚCARES REDUTORES DOS HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS E ÁCIDOS DA FRAÇÃO IV DURANTE A FERMENTAÇÃO POR Pachysolen tannophilus NRRL Y-2460.

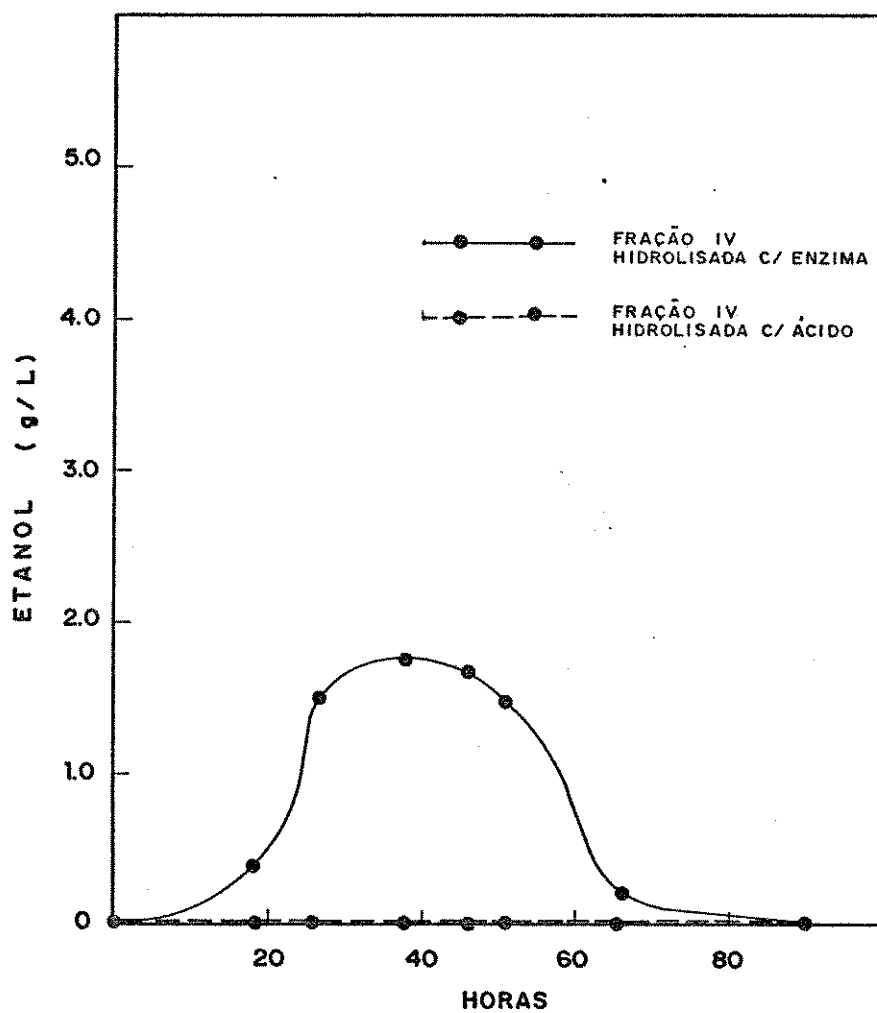


FIGURA N° 18 : PRODUÇÃO DE ETANOL DOS HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS E ÁCIDOS DA FRAÇÃO IV DURANTE A FERMENTAÇÃO POR Pachysolen tannophilus NRRL Y- 2460.

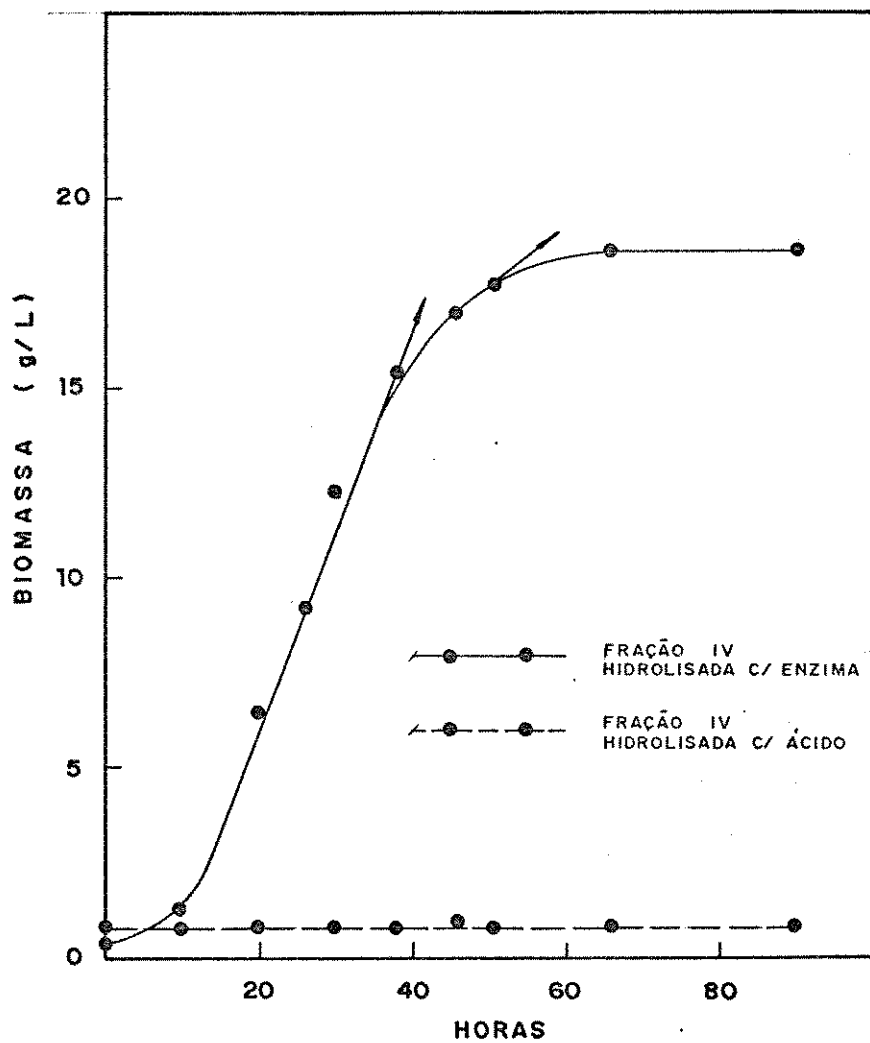


FIGURA Nº 19 : CRESCIMENTO DE *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DOS HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS E ÁCIDOS DA FRAÇÃO IV.

te. Após esta fase de consumo rápido verificou-se diminuição da velocidade de consumo de substrato no período de 26 à 50 horas para 0,45 g de açúcar redutor/hora na vigésima nona hora e 0,25 g açúcar redutor/hora na quadragésima sexta hora de fermentação, com taxas específicas de consumo de 0,042g e de 0,015 g de açúcar redutor/g de levedura/hora, respectivamente.

Finalmente, decorridas 50 horas cessou o consumo de substrato, restando no meio de fermentação 15% dos açúcares redutores iniciais. Após 90 horas de fermentação foram consumidos 17,8 g de açúcares redutores.

Na fermentação do hidrolisado ácido da fração IV verificou-se que os açúcares não são aproveitados pela levedura mesmo após 90 horas de incubação.

Comparando-se a figura 17 e a figura 18, verificou-se que no caso do hidrolisado enzimático houve uma correspondência entre a fase de velocidade máxima de consumo de substrato e as fases de produção de etanol. Este fenômeno também foi observado na fermentação do hidrolisado enzimático da fração II obtida do tratamento alcalino de bagaço de cana. A concentração máxima de etanol foi de 1,75 g/L, atingida após 38 horas de fermentação e em seguida a concentração de etanol diminuiu. A velocidade máxima de 0,15 g/h de produção de etanol verificou-se no período entre 20 e 27 horas de fermentação. A taxa específica de produção foi de 0,0214 g de etanol/g de levedura/hora. No caso do hidrolisado ácido da fração IV, não houve produção de etanol.

Na figura 19 pode-se observar as curvas de crescimento celular do *P. tannophilus* para ambos hidrolisados. No

caso do hidrolisado enzimático da fração IV, a levedura iniciou seu crescimento logo após a inoculação, com velocidade específica de $0,091 \text{ h}^{-1}$ na vigésima hora e de $0,048 \text{ h}^{-1}$ na trigésima hora. Após 35 horas de fermentação, a velocidade específica de crescimento começou a diminuir, sendo $0,0080 \text{ h}^{-1}$ na quadragésima oitava hora, cessando o crescimento na sexagésima quinta hora de fermentação. Este período coincidiu com a fase de consumo de etanol.

Não houve crescimento celular no hidrolisado ácido da fração IV.

De acordo com os resultados obtidos, na fermentação do hidrolisado enzimático formaram-se 1,02 g de levedura e 0,098 g. de etanol por grama de açúcares redutores consumidos. Estes valores são indicativos de condições de fermentação sub-ótimas para a produção de etanol, favorecendo-se desta forma a produção de biomassa, como se observa na figura 19. Sabe-se que o *P. tannophilus* utiliza o etanol quando a concentração de xilose no meio de fermentação se torna limitante e que o consumo pode ser minimizado controlando-se a aeração do meio (24; 78). Como se observa na figura 18, o *P. tannophilus* consumiu o etanol produzido quando a concentração de açúcares redutores no meio diminuiu aproximadamente para 5,3 g/L. Por outro lado, como se observa na figura 19, o crescimento da massa celular do *P. tannophilus* continuou, a uma velocidade menor, até a sexagésima hora de fermentação às custas do etanol produzido, já que a partir da quinquagésima hora os açúcares redutores presentes no meio não foram aproveitados, restando após 90 horas de fermentação 15% dos açúcares redutores iniciais. Isto sugere que estes açúcares redu-

tores remanescentes sejam de difícil assimilação, ficando o etanol como única fonte de carbono aproveitável pela levedura. Aproximadamente na sexagésima quinta hora, quando a concentração de etanol era extremamente baixa, o crescimento celular cessou. Após 90 horas de fermentação o etanol foi totalmente consumido. As variações na velocidade de crescimento da levedura estariam sugerindo um crescimento diauxico, que é um fenômeno normal quando duas ou mais fontes de carbono assimiláveis fazem parte da composição do meio de fermentação. Como pode-se observar na figura 16 o *P. tannophilus* durante as primeiras 26 horas de fermentação consumiu a glicose como fonte de carbono. A seguir utilizou completamente a xilose no período entre 36 a 46 horas de fermentação e finalmente o etanol produzido.

O consumo de etanol na fermentação do hidrolisado enzimático da Fração IV teve início após a utilização da glicose e xilose pela levedura. Além disso a utilização de etanol foi favorecida pelas condições de fermentação, principalmente a aeração do meio de cultura (72).

Verificou-se que na obtenção da Fração IV pelo processo de explosão-autohidrólise, formaram-se substâncias que inibiram o crescimento da levedura *P. tannophilus*. Estas substâncias também apresentaram efeito inibidor da atividade das enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* QM 9414 sobre os componentes da Fração IV.

No quadro 14 pode-se observar que a inibição foi direta e proporcional à concentração dos sólidos presentes no líquido obtido do processo de explosão-autohidrólise. Esse mesmo material, obtido pelo processo de explosão-autohidrólise após diálise e hidrólise enzimática, apresentou crescimento celular

e produção de etanol comparável ao obtido pela fermentação de xilose pura (Fig. 18 e 20) respectivamente.

Isto indica que as substâncias inibidoras são compostos de baixo peso molecular que foram eliminados durante a diálise. Por outro lado, quando o extrato líquido do processo de autohidrólise foi liofilizado e posteriormente submetido à hidrólise enzimática, não ocorreu crescimento do *P. tannophilus*, o que sugere que estas substâncias inibidoras não são voláteis.

Pode-se observar no quadro 14, que as substâncias inibidoras, presentes no extrato líquido do processo de explosão-autohidrólise, não estavam em concentrações suficientemente altas para inibirem o complexo enzimático do *Trichoderma reesei* QM 9414 e conseqüentemente os valores de conversão das substâncias celulósicas a açúcares redutores foram razoáveis. Mes-Hartre e Saddler (75), relataram que derivados do furano, furfural e hidroximetil furfural não eram inibidores de celulas nas concentrações normalmente encontradas nos substratos lignocelulósicos pré-tratados por processos de explosão-autohidrólise.

Estes pesquisadores reportaram que estes compostos inibem a atividade de β -glicosidade do complexo enzimático celololítico do *Trichoderma harzianum* E 58. Verificaram também que estas substâncias inibiram o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e *Klebsiella pneumoniae*.

No caso do hidrolisado ácido da Fração IV, não houve consumo de substrato, produção de etanol, nem crescimento celular da levedura *P. tannophilus*, o que sugere a formação de substâncias inibidoras durante a hidrólise ácida. Detroy e co-

QUADRO 14. Inibição das celulasas do *Trichoderma reesei* QM 9414 pelos sólidos presentes no líquido de exploração-autohidrólise.

CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS %	AÇÚCARES REDUTORES APÓS HIDRÓLISE gr/g de SOL.	CONVERSÃO
0,26	0,82	94
2,60	0,45	73
12,50	0,32	61
23,00	0,19	36

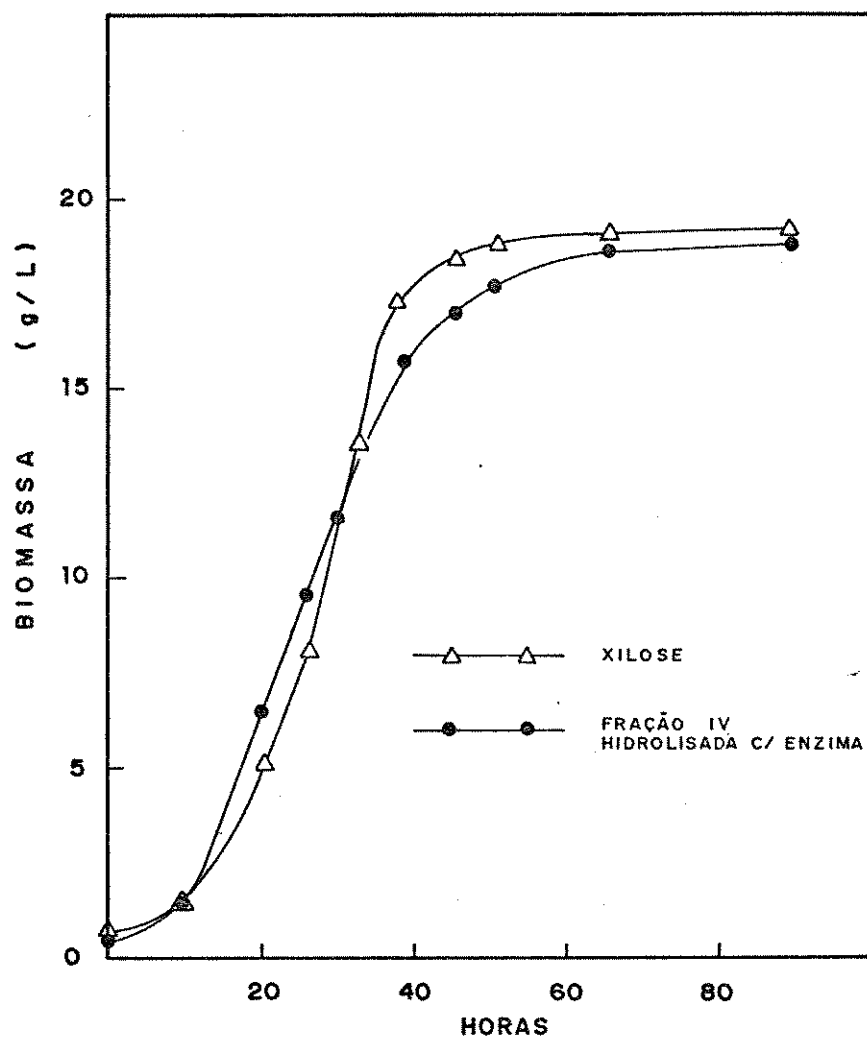


FIGURA Nº 20 : CRESCIMENTO DE *Pachysolen fannophilus* NRRL Y-2460 DURANTE A FERMENTAÇÃO DE XILOSE E DO HIDROLISADO ENZIMÁTICO DA FRAÇÃO IV.

laboradores (30) estudaram a habilidade do *Pachysolen tannophilus* para fermentar D-xilose obtida de hidrolisados de palha de trigo. Não houve fermentação dos substratos obtidos pelos processos de explosão-autohidrólise e de hidrólise ácida. Este resultado foi atribuído à presença de concentrações tóxicas de furfural e de compostos derivados de lignina nos hidrolisados. Os autores relataram que concentrações de furfural na faixa de 0,25 - 0,30% são letais para o *P. tannophilus*.

Como se observa no Quadro 5, a Fração IV contém 3,1% de lignina que sob as condições de hidrólise com ácido sulfurico também poderiam dar origem a subprodutos tóxicos à levedura (90).

V. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir o seguinte:

- 1 - O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com solução 4% de NaOH ou pelo método de explosão-autohidrólise, dá origem a substratos solúveis com alto teor de hemicelulose, baixos teores de lignina e celulose. As frações insolúveis obtidas por estes mesmos pré-tratamentos, apresentam altos teores de celulose, conteúdo de lignina acima de 20% e baixos teores de hemicelulose. Na obtenção da fração hemicelulósica, a partir do bagaço de cana de açúcar, pelo pré-tratamento com alcali, o rendimento na extração foi de 21% e 6% para as frações sem deslignificar e deslignificada respectivamente.

No pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar pelo método de explosão-autohidrólise, 37% da hemicelulose foi hidrolisada durante o processo e foi observado uma maior eficiência de extração de hemicelulose quando a relação de bagaço:água era de 1:8 respectivamente (p/v).

- 2 - A sacarificação por hidrólise enzimática ou ácida das diferentes frações do bagaço de cana de açúcar obtidos pelos pré-tratamentos com alcali e explosão-autohidrólise, foi superior para o caso da Fração II (extrato alcalino deslignificado). No caso da Fração IV (líquido de autohidrólise dialisado) obtida no processo de explosão-autohidrólise, a hidrólise enzimática não foi muito eficiente devido a presença de substâncias inibidoras das celulasas do

Trichoderma reesei QM 9414 utilizadas. Todas as frações obtidas do bagaço de cana de açúcar pelos métodos de pré-tratamentos já indicados, foram mais suscetíveis à hidrólise enzimática que no caso do bagaço de cana sem pré-tratamento.

As sacarificações utilizando ácido sulfúrico 5% à 100°C, foram 100% eficientes para todas as frações.

- 3 - A fração IV do bagaço de cana de açúcar obtida pelo processo de explosão-autohidrólise apresenta substâncias que inibem o crescimento da levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460.

Estas substâncias são compostos de baixo peso molecular e não voláteis. Estas ou outras substâncias presentes na fração IV também afetam a atividade enzimática das células do *Trichoderma reesei* QM 9414. A inibição que estes compostos exercem sobre as celulasas do *T. reesei* QM 9414 está em relação direta à concentração de sólidos presentes na fração IV. Quanto maior a concentração de sólidos maior a inibição e vice-versa.

- 4 - As fermentações alcoólicas por *Pachysolen tannophilus* dos açúcares puros, glicose e xilose, e dos hidrolisados das diferentes frações do bagaço de cana de açúcar obtidos pelos métodos de pré-tratamento com alcali e explosão-autohidrólise, frações II e IV respectivamente, apresentaram uma maior tendência à produção de biomassa do que à produção de etanol. Isto foi causado pelas condições experimentais utilizadas neste trabalho, salientando-se excesso de aera

ção como a principal causa.

- 5 - No processo de fermentação alcoólica utilizando-se glicose como fonte de carbono, o *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460 apresentou um rendimento alcoólico de 82%, valor este 5% maior do que no caso do uso de xilose como fonte de carbono. No entanto, sob as condições do experimento, o *P. tannophilus* consumiu 40% da glicose para formação de biomassa e manutenção, enquanto que 60% foi destinada à formação de etanol. Assim no processo de fermentação alcoólica utilizando-se glicose como fonte de carbono, o *P. tannophilus* NRRL y-2460 destinou mais 34% da glicose para a produção de etanol em comparação com a fermentação da xilose. A taxa específica de crescimento da levedura à 20 horas de fermentação em xilose e glicose foi de $0,17\text{h}^{-1}$ e $0,18\text{h}^{-1}$ respectivamente.
- 6 - Os hidrolisados enzimáticos e ácidos das Frações II e IV apresentaram ao final do processo de fermentação, açúcares redutores não fermentecíveis e não aproveitáveis pela levedura *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460. As concentrações finais atingiram valores que variaram desde 15% na fermentação do hidrolisado enzimático da Fração IV até 26,7% na fermentação do hidrolisado ácido da Fração II.
- 7 - A produção de etanol por *P. tannophilus* NRRL y-2460 dos hidrolisados enzimáticos das Frações II e IV esta associada às fases de velocidade máxima de consumo de substrato e de crescimento celular da levedura.

- 8 - A *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460 apresentou fenômeno diauxico de crescimentos durante a fermentação alcoólica dos hidrolisados enzimáticos de Frações II e IV. Isto ocorreu devido ao consumo inicial de glicose e depois de xilose, presentes nestes hidrolisados.
- 9 - Durante a fermentação alcoólica por *P. tannophilus* NRRL y-2460 da xilose, glicose e dos hidrolisados enzimáticos das Frações II e IV do bagaço de cana de açúcar, foi observado o consumo de etanol produzido por parte da levedura após 40 horas de fermentação devido a condições adversas à fermentação.
- 10 - A *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460 não produz etanol ou se o faz as quantidades produzidas são desprezíveis nos hidrolisados ácidos das Frações II e IV do bagaço de cana de açúcar sob as condições experimentais deste trabalho.
- 11 - O hidrolisado enzimático da Fração II do bagaço de cana de açúcar, apresenta-se como o melhor substrato para a *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460 em relação a produção de etanol e crescimento celular. A taxa específica de crescimento foi de $0,11 \text{ h}^{-1}$ à 20 horas de fermentação.

ANEXO I

QUADRO 6. Concentração de xilose, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação por *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460

TEMPO DE FERMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE XILOSE	MASSA CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL
Horas	g/L	g/L	g/L
0	24,5	0,85	0,00
10	23,8	1,50	0,15
18	22,3	4,00	0,40
26	16,3	8,20	1,00
38	4,3	17,40	3,20
46	0,3	18,40	2,90
51	0,3	19,00	2,20
66	0,3	19,20	0,30
90	0,3	19,20	0,20

QUADRO 7. Concentração de glicose, crescimento celular e produção de Etanol durante a fermentação por *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460

TEMPO DE FERMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	MASSA CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL
Horas	g/L	g/L	g/L
0	21,50	0,85	0,00
10	10,75	6,00	4,00
18	1,80	10,00	8,10
26	0,33	12,00	8,20
38	0,27	13,20	6,00
46	0,16	14,20	4,10
51	0,16	14,80	2,70
66	0,16	16,80	0,30
90	0,16	17,00	0,10

QUADRO 9. Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado enzimático da Fração II por *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	MASSA CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL
Horas	g/L	g/L	g/L
0	24,0	0,85	0,00
10	22,6	2,00	0,25
20	19,7	6,60	0,72
24	14,4	8,80	1,20
30	10,3	13,30	1,60
40	9,1	14,60	1,90
49	8,3	15,50	1,80
72	5,9	18,20	0,40
90	5,2	18,50	0,25

QUADRO 10. Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado ácido da Fração II por *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	MASSA CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL
Horas	g/L	g/L	g/L
0	21,7	0,66	0,00
10	21,0	0,66	0,25
20	20,4	0,66	0,30
24	19,8	0,80	0,30
38	19,2	1,50	0,30
45	18,7	2,70	0,40
51	18,1	4,20	0,30
58	16,9	7,80	0,30
66	14,5	9,30	0,30
90	5,8	15,40	0,30

QUADRO 12. Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado enzimático da Fração IV por *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	MASSA CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL
Horas	g/L	g/L	g/L
0	21,2	0,4	0,00
10	20,8	1,3	0,10
18	20,3	5,0	0,40
26	10,3	9,2	1,50
30	8,5	12,2	1,65
38	6,2	15,4	1,75
46	3,8	17,0	1,70
51	3,4	17,8	1,50
66	3,4	18,6	0,20
90	3,4	18,6	0,00

QUADRO 13. Concentração de açúcares redutores, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado ácido da Fração IV por *Pachysolen tannophilus* NRRL y-2460.

TEMPO DE FERMENTAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	MASSA CELULAR	PRODUÇÃO DE ETANOL
Horas	g/L	g/L	g/L
0	23,4	0,8	0,0
10	22,3	0,8	0,0
18	22,3	0,8	0,0
25	22,0	0,8	0,0
38	22,4	0,8	0,0
46	22,3	1,0	0,0
51	22,3	0,8	0,0
66	22,0	0,8	0,0
90	22,0	0,8	0,0

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERSON, M., SIOBRO, M. and GADDY, J.L. "Two-Stage Acid Hydrolysis of Biomass" In "Third Symposium on Biotechnology in energy production and conservation". Edited by Charles D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol Bioeng. Symp. 11, 103-112, 1981 .
2. ADAMS, G.A. and STANIER, R.Y. "Production and Properties of 2,3-Butanediol. III Studies on the Biochemistry of carbohydrate fermentation by *Aerobacillus polymixa*". Can. J. Res. 23, Sec. B(L), 1-9, 1945 .
3. AMER, G.I. and DREW, S.W. "Microbiology of Lignin Degradation" In "Annual Reports on fermentation processes". Edited by Perlman D. & Tsao G.T. Academic Press Inc. Vol. 4, 69-103, 1980.
4. ARAUJO, A. and D'SOUZA, J. "Production of Biomass from Enzymatic Hydrolysate of Agricultural Waste". J. Ferment. Technol. 58, 399-401, 1980 .
5. AVGERINOS, G.C. and WANG, D.I.C. "Direct Microbiological Conversion of Cellulosic to Ethanol" In "Annual Reports on fermentation processes". Edited by Perlman D. & Tsao G.T. , Academic Press Inc. Vol. 4, 165-191, 1980 .
6. AZHAR, A.F., BERY, M.K., COLCORD, A.R., ROBERTS, R.S. and CORBITT, G.V. "Factors Affecting Alcohol Fermentation of Wood Acid Hydrolysate" In "Third Symposium on Biotechnology

- in Energy Production and Conservation". Edited by Charles D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11, 293-300, 1981 .
7. BARNETT, J.S. "The Utilization of Sugars by Yeast". Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32, 125-234, 1976 .
 8. BARRETT DE MENEZES, T.J. "Starchy Materials for Alcohol Fuel Production". Process Biochem. 15(5), 30-35, 1980 .
 9. BELY, P. "Xylan-Degrading Activity in Yeasts: Growth on Xylose, Xylan and Hemicelluloses" Folia Microbiol. 23, 366-371, 1978 .
 10. CALLIHAN, C.D. and CLEMMER, J.F. "Biomass from Cellulosic Materials" In "Economic Microbiology Microbial Biomass". Edited by Rose, A.H. Academic Press Inc. Vol. 4, 271-288, 1979.
 11. CASTRO GOMES, R.J.H. and PARK, Y.K. "Conversion of Cane Bagasse to Compost and its Chemical Characteristics". J. Ferment. Technol. , 61(3), 329-332, 1983
 12. CHANG, M.M., CHON, T.Y.C. and TSAO, G.T. "Structure, Pre-treatment and Hydrolysis fo Cellulose". Adv. Biochem. Eng. 20, 15-42, 1981 .
 13. CHIANG, L.C., HSIAO, H.Y., FLICKINGER, M.C., CHEN, L.F. and TSAO, G.T. "Ethanol Production from Pentoses by Immobilized Microorganisms". Enzyme. Microb. Technol., 4, March, 93, 1982
 14. CHIANG, L.C., HSIAO, H.Y., VENG, P.P. and TSAO, G.T. " Enzy-

matic and Microbial Preparation of D-Xylulose from D-Xylose".
Appl. Environ. Microbiol. 42, 66-69, 1981 .

15. CLAYTON, N.E. and SRINIVASAN, V.R. "Biodegradation of Lignin by *Candida sp*". In "American Society for Microbiology 81th Annual Meeting, 1-6 March, micro 019, Abstract, 1981 .
16. COOMBS, J. "Biogas and Power Alcohol". Chem. Ind. (4 April) , 223-229, 1981 .
17. COONEY, C.L., WANG, D.I.C., SANG, S., JENNIFER, G. and JIMENEZ, M. "Simultaneous Cellulose Hydrolysis and Ethanol Production by a Cellulolytic Anaerobic Bacterium" In "Biotechnology in energy production and conservation". Edited by Charles D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 103-114, 1978 .
18. COUSIN, M.A. "Converting Food Processing Wastes into Food or Feed Through Microbial Fermentation" In "Annual Reports on Fermentation Processes". Edited by Perlman, D. and Tsao, G. T. Vol. 4, 31-65, 1980 .
19. COWLING, E.B. and KIRK, T.K. "Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Processes" In "Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Applications". Edited by Gaden, E.L., Mandels, M.H., Reese, E.T. and Spano, L.A, John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6 , 95-124, 1976 .
20. COWLING, E.B. "Structural Features of Cellulose That Influence its Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis" In "Advances in

Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials".

Edited by Reese, E.T. Pergamon Press, 1-32, 1963 .

21. CRAWFORD, D.L., McCOY, E. HARKIN, J.M. and JONES, P. "Production of Microbial Protein From Waste Cellulose by *Thermomonospora fusca*, a Thermophilic Actinomycete". Bio-technol. Bioeng., 15, 833-843, 1973 .
22. DATTA, R. "Energy Requirements for Lignocellulose Pretreatment Processes". Process. Biochem. June/July, 16-19, 1981 .
23. DEKKER, R.F.H. and RICHARDS, G.N. "Hemicellulases: Their Occurrence, Purification, Properties, and Mode of Action". Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32, 277-352, 1976 .
24. DEKKER, R.F.H. "Ethanol Production From D-Xylose and Others Sugars by the Yeast *Pachysolen tannophilus*". Biotechnol. Lett. 4(7), 411-416, 1982 .
25. DEKKER, R.F.H. "Enzymic Saccharification of Sugar Cane Bagasse Pretreated by Autohydrolysis-Steam Explosion". Bio-technol. Bioeng. 25, 3027-3048, 1983 .
26. DEMAIN, A.L. "Comments on Cellulase Production" in Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Applications. Edited by Caden, E.L., Mandels, M.H., Reese, E.T. and Spano, L.A., John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 95-124, 1976 .
27. DENNIS, C. "Breakdown of Cellulose by Yeast Species". J. Gen. Microbiol. 71, 409-415, 1972 .

28. DETROY, R.W., LINDENFELSER, L.A., SOMMER, S. and ORTON, L.
"Bioconversion of Wheat Straw to Ethanol: Chemical Modification, Enzymatic Hydrolysis and Fermentation". Biotechnol. Bioeng. 23, 1527-1535, 1981 .
29. DETROY, R.W., CUNNINGHAM, R.L., BOTHAST, R.J., BAGBY, M.O. and HERMAN, A. "Bioconversion of Wheat Straw Cellulose/Hemicellulose to Ethanol by *Saccharomyces uvarum* and *Pachysolen tannophilus*". Biotechnol. Bioeng. 24, 1105-1113, 1982 .
30. DETROY, R.W., CUNNINGHAM, R.L. and HERMAN, A.I. "Fermentation of Wheat Straw Hemicellulose to Ethanol by *Pachysolen tannophilus*" In "Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation". Edited by Charles, D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 81-89, 1982 .
31. DUNLAP, C.E., THOMSON, J. and CHIANG, C.L. "Treatment Processes to Increase Cellulose Microbial Digestibility". AIChE. Symp. Series 158, 72, 58-63, 1976 .
32. ERIKSSON, K.E. and LARSSON, K. "Fermentation of Waste Mechanical Fiber from a Newsprint Mill by the Rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*". Biotechnol. Bioeng. 17, 327 - 348, 1975 .
33. ESSER, K. and SCHMIDT, U. "Alcohol Production by Biotechnology". Process Biochem. 17(3), 46-49, 1982 .
34. FABER, M.D. "Production of Ethanol from Renewable Resources" In "Development in Industrial Microbiology". Edited by the

Society for Industrial Microbiology. Arlington, Virginia ,
Vol.22, 111-119, 1981 .

35. FAN, L.T., LEE, H.Y. and BEARDMORE, D.H. "Major Chemical and Physical Features of Cellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Hydrolysis". Adv. Biochem. Eng. 14, 101-117, 1980.
36. FAN, L.T., LEE, H.Y. and BEARDMORE, D.H. "Mechanism of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Effects of Major Structural Features of Cellulose on Enzymatic Hydrolysis". Bio-technol. Bioeng. 22, Suppl. 1, 27-48, 1980 .
37. FLICKINGER, M.C. "Current-Biological Research in Conversion of Cellulosic Carbohydrates into Liquid Fuels: How far have we come?". Biotechnol. Bioeng. 22, Suppl. 1, 27-48, 1980 .
38. GALLO, B.J., ANDREOTTI, R., ROCHE, C., RYU, D. and MANDELS, M. "Cellulase Production by a New Mutant Strain of *Trichoderma reesei* MCG 77" In "Biotechnology in Energy Production and Conservation". Edited by Charles, D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 89-101, 1978 .
39. GARG, S.K. and NEELAKANTAN, S. "Bioconversion of Sugar Cane Bagasse for Cellulase Enzyme and Microbial Protein Production". J.Ferment. Technol. 17, 271-279, 1982 .
40. GHOSE, T.K. and BISARIA, V.S. "Studies on the Mechanism of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substances". Biotechnol. Bioeng. 21, 131-146, 1979 .
41. GHOSE, T.K. and GHOSH, P. "Bioconversion of Cellulosic Sub-

- stances". J. Appl. Chem. Biotechnol. 28, 309-320, 1978 .
42. GHOSE, T.K. "Cellulase Biosynthesis and Hydrolysis of Cellulosic Substances". Adv. Biochem. Eng. 6, 39-74, 1977 .
43. GHOSH, P., PAMMENT, N.B. and MARTIN, W.R.B. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose: Effect of β -D-Glucosidase Activity and Ethanol Inhibition of Cellulases". Enzyme Microb. Technol. 4, 425-430, 1982 .
44. GIBBS, M., COCHRANE, V.W., PAEGE, L.M. and WOLIN, H. "Fermentation of D-Xylose-1-C¹⁴ by *Fusarium liri* Bolley". Arch. Biochem. Biophys. 50, 237-242, 1954 .
45. GOLDSTEIN, I.S. "Chemicals from Lignocellulose" in "Enzyme Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Applications". Edited by Gaden, E.L., Mandels, M.H., Reese, E.T. and Spano, L.A. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 293-301, 1976 .
46. GONG, C.-S., McCRACKEN, L.D. and TSAO, G.T. "Direct Fermentation of D-Xylose to Ethanol by a Xylose Fermenting Yeast Mutant, *Candida sp* XF 217". Biotechnol. Lett. 3, 245-250, 1981.
47. GONG, C.-S., MAUN, C.M. and TSAO, G.T. "Direct Fermentation of Cellulose to Ethanol by a Cellulolytic Filamentous Fungus, *Monilia sp*". Biotechnol. Lett. 3, 77-82, 1981 .
48. GONG, C.-S., LADISCH, M.R. and TSAO, G.T. "Production of Ethanol from Wood Hemicellulose Hydrolysates". Biotechnol.

Lett. 3, 657-662, 1981 .

49. GONG, C.-S., CHEN, L., FLICKINGER, M.C., CHIANG, L. and TSAO , G.T. "Production of Ethanol from D-Xylose by Using D-Xylose Isomerase and Yeasts". Appl. Environ. Microbiol., 41, 430-436, 1981 .
50. GONG, C.-S., CLAYPOOL, T.A., McCRACKEN, L.D., MAUN, C.M., UENG, P.P. and TSAO, G.T. "Conversion of Pentoses by Yeast". Bio-technol. Bioeng. 25, 85-102, 1983 .
51. HAN, Y.W. "Microbial Utilization of Straw (a review)". Adv. Appl. Microbiol. 23, 119-153, 1978 .
52. HSIA, H.-Y. "Effects of Borate on Isomerization and Yeast Fermentation of High Xilulose Solution and Acid Hydrolysate of Hemicellulose". Enzyme Microb. Technol. 4, 25-31, 1982..
53. HSIAO, H.-Y. "Sequential Utilization of Mixed Monosaccharides by Yeasts". Appl. Environ. Microbiol. 43, 840-845, 1982 .
54. HUMPHREY, A.E., MOREIRA, A., ARMIGER, W. and ZABRISKIE, D. "Production of Single Cell Protein from Cellulose Waste" In "Single Cell Protein from Renewable and Non Renewable Resources". Edited by Gaden, E.L. and Humphrey, A.E. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 7, 45-64, 1977 .
55. JANSHEKAR, H. and FIECHTER, A. "Lignin: Biosynthesis, Application and Biodegradation". Adv. Biochem. Eng/Biotechnol. 27, 120-178, 1983 .

56. JEFFRIES, T.W. "Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts and Fungi". Adv. Biochem. Eng/Biotechnol. 27, 1-32, 1983 .
57. KATZ, M. and REESE, E.T. "Production of Glucose by Enzymatic Hydrolysis of Cellulose". Appl. Environ. Microbiol. 16 , 419-420, 1968 .
58. KAYE, S. and HAAG, H.B.J. "Determination of Ethyl Alcohol in Blood". J.Forensic. Med. 1, 373, 1954 .
59. KNAPPERT, D., GRETHLEIN, H. and CONVERSE, A. "Partial Acid Hydrolysis of Poplar Wood as a Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis" In "Third Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation". Edited by Charles D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11, 1103-112, 1981.
60. KOSARIC, N., WIECZOREK, A., COSENTINO, P.G., MAGEE, R.J. and PRENOSIL, J.E. In "Biotechnology". Edited by Dellweg, H. , Weinheim-Deerfield Beach, Florida. Badel Verlag Chemie. Vol. 3, p. 315, 1983 .
61. KURTSMAN, C.P. "Biology and Physiology of the D-Xylose Fermenting Yeast *Pachysolen tannophilus*". Adv. Biochem. Eng/Biotechnol. 27, 73-82, 1983 .
62. KUSAKABE, I., YASUI, T. and KOBAYASHI, T. "Enzymatic Preparation of Crystalline Glucose from Waste Cellulosic Materials". J. Ferment. Technol. 61, 163-170, 1983 .
63. LAMB, B.W. and BILGER, R.W. "Combustion of Bagasse: Litera

- ture Review" . Sugar Technol. Rev. 4, 89-130, 1976 /77
64. LEDUY, A. and ZAJIC, J.E. "A Geometrical Approach for differentiation of on Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation". Biotechnol. Bioeng. 15, 805-810, 1973 .
65. LEE, Y.Y., LIN, C.M., JOHNSON, T. and CHAMBERS, R.P. "Selective Hydrolysis of Hardwood Hemicellulose by Acids" In "Biotechnology in Energy Production and Conservation". Edited by Charles D. Scott. John Wiles & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 75-88, 1978 .
66. LINKD, M. "An Evaluation of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials". Adv. Biochem. Eng. 5, 27-48, 1977 .
67. MAIORELLA, B., WILKE, C.R. and BLANCH, H.N. "Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes". Biotechnol. Bioeng. 26, 1003-1025, 1984 .
68. MAIORELLA, B., WILKE, C.R. and BLANCH, H.N. "Alcohol Production and Recovery". Adv. Biochem. Eng. 20, 43-92, 1981 .
69. MALESZKA, R., WANG, P.Y. and SCHNEIDER, H. "Yeasts That Ferment D-Cellobiose as Well as D-Xylose". Biotechnol. Lett 4, 133-136, 1982 .
70. MALESZKA, R., WANG, P.Y. and SCHNEIDER, H. "Ethanol Production from D-Galactose and Glycerol by *Pachysolen tannophilus*". Enzyme. Microb. Technol. 4, September, 349-352, 1982 .

71. MALESZKA, R., and SCHNEIDER, H. "Fermentation of D-Xylose, Xylitol and D-Xylulose by Yeasts". Can. J. Microbiol. 3, 360-363, 1981 .
72. MALESZKA, R. and SCHNEIDER, H. "Concurrent Production and Consumption of Ethanol by Cultures of *Pachysolen tannophilus* Growing on D-Xylose". Appl. Environ Microbiol. 44, 902-912, 1982.
73. MANDELS, M., HONTZ, L. and NYSTROM, J. "Enzymatic Hydrolysis of Waste Cellulose". Biotechnol. Bioeng. 16, 1471-1493, 1974.
74. MARTIN, S.R. "The Production of Fuel Ethanol From Carbohydrates". Chem. Engineer, 377, 50-53 e 58, 1982 .
75. MES-HARTREE, M. and SADDLER, J.N. "The Nature of Inhibitory Materials Present in Pretreated Lignocellulosic Substrates Which Inhibit the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose". Bio-technol. Lett. 5, 531-536, 1983 .
76. MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A.R., DAUGULIS, A.J. and ROBINSON, C. W. "Bioconversion of Agricultural Wastes Into Animal Feed and Fuel Gas" In "Biotechnology in Energy Production and Conservation". Edited by Charles D.Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 8, 205-218, 1978 .
77. MOREIRA, A.R., PHILLIPS, J.A. and HUMPHREY, A.E. "Production of Cellulases by *Thermomonospora* sp". Biotechnol. Bioeng. 23, 1339-1347, 1981 .

78. MUTZE, B. and WANDREY, C. "Continuous Fermentation of Xylose With *Pachysolen tannophilus*". Biotechnol. Lett. 5, 633-638, 1983 .
79. NEIRINCK, L., MALESZKA, R. and SCHNEIDER, H. Alcohol Production From Sugar Mixtures by *Pachysolen tannophilus*" In "Fourth Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation". Edited by Charles D. Scott. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 12, 161-169, 1982 .
80. NELSON, N. "A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination fo Glucose". J. Biol. Chem. 153, 375-380 , 1944 .
81. OI, S., YAMANAKA, H. and YAMAMOTO, T. "Methane Fermentation of Bagasse and Some Factors to Improve the Fermentation". J. Ferm. Technol. 58, 367-372 , 1980 .
82. PAMMENT, N. ROBINSON, C.W., HILTON, J. and MOO-YOUNG, M. "Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on Alkali-pretreated Sawdust". Biotechnol. Bioeng. 20, 1735-1744, 1978 .
83. PARK, Y.K. and TOMA, M. "Purification and Characterization of extracellular Xylanase from *Streptomyces ostreogriseus*". Korean J. Biochem. 14(1), 37-40, 1982 .
84. PEITERSEN, N. "Production of Cellulase and Protein from Barley Straw by *Trichoderma viride*". Biotechnol. Bioeng. 17, 361-374, 1975 .

85. PEITERSEN, N. and ROSS, E.W. "Mathematical Model for Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Cellulose by *Trichoderma*". Biotechnol. Bioeng. 21, 997-1017, 1979.
86. PFEFFER, J.T. and KHAN, K.A. "Microbial Production of Methane from Municipal Refuses". Biotechnol. Bioeng. 18, 1179-1191, 1976.
87. REESE, E.T., SIU, R.G.H. and LEVINSON, H.S. "The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivates and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis". J. Bacteriol. 59, 485-497, 1950.
88. RIGHELATO, R.C. "Anaerobic Fermentation: Alcohol Production". Phil. Trans. R. Soc. London, B 290, 303-312, 1980.
89. OGERS, J.C., COLEMAN, E., SPINO, F.D., PURCELL, T.C. and SCARPINO, P.V. "Production of Fungal Protein from Cellulose and Waste Cellulosics". Environ. Science and Technol., 6(8), 715-719, 1972.
90. ROLZ, C. and HUMPHREY, A.E. "Microbial Biomass from Renewables: Review of Alternatives" Adv. Biochem. Eng. 21, 1-53, 1982.
91. SADDLER, J.N. and KHAN, A.W. "Cellulolytic Enzyme System of *Acetovibrio cellulolyticus*". Can. J. Microbiol. 27, 288-294, 1981.
92. SADDLER, J.N. and KHAN, A.W. "Cellulose Production by *Acetovibrio cellulolyticus*". Can. J. Microbiol. 26, 760-765, 1980.

93. SAVARESE, J.J. and YOUNG, S.D. "Combined Enzyme Hydrolusis of Cellulose and Yeast Fermentation". Biotechnol. Bioeng. 20, 1291-1293, 1978.
94. SCHNEIDER, H. MALESZKA, R., NEIRINCK, L. VELIKY, I.A., WANG, P.Y. and CHAN, Y.K. "Ethanol Production from D-Xylose and Several Other Carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and Other Yeasts". Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 27, 57-71, 1983.
95. SCHUCHARDT, U.F. PEREIRA, M.F.A., LEAL, C e PEIXOTO, E.M.A. "Uma Autoclave de Alta Pressão "Made in Brazil". Química Nova 3, 161, 1980.
96. SELBY, K. and MAITLAND, C.C. "The Fractionation of Gel Filtration". Biochem. J. 94, 578-583, 1965.
97. SHEWALE, J.G. and SADANA, J.C. "Enzymatic Hydrolysis Cellulosic Materials by *Sclerotium rolfsii* Culture Filtrate for Sugar Production". Can. J. Microbiol. 25, 773-783, 1979.
98. SLININGER, P.J., BOTHAST, R.J. and VANCAUWENBERGE, J.E. "Conversion of D-Xylose to Ethanol by the Yeast *Pachysolen tannophilus*". Biotechnol. Bioeng. 24, 371-384, 1982.
99. SASAKI, T., TANAKA, T., NANBU, N., SATO, Y. and KAINUMA, K. "Correlation Between X-ray Diffraction Measurements of Cellulose Crystalline Structure and the Susceptibility to Microbial Cellulase". Biotechnol. Bioeng. 21, 1031-1042, 1979.

100. SOMOGYI, M. "A New Reagent for the Determination of Sugars".
J. Biol. Chem. 160, 61-68, 1945.
101. STANIER, R.Y. and ADAMS, G.A. "The Nature of the *Aeromonas*
Fermentation". Biochem. J. 38, 168-171, 1944.
102. STERN, A.M. and GASNER, L.L. "Degradation of Lignin Combined
Chemical and Biological Treatment". Biotechnol. Bioeng. 16,
789-805, 1974.
103. STUTZENBERGER, F.J. "Degradation of Cellulosic Substances by
Thermomonospora curvata". Biotechnol. Bioeng. 21, 909-913,
1979.
104. SUNDSTROM, D.W., KLEI, H.E., COUGHLIN, R.W., BIEDERMAN, G.I.,
and BROWER, C.A. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to
Glucose Using Immobilized β -Glucosidase". Biotechnol. Bio-
eng. 23, 473-485, 1981.
105. SUOMALAINEN, H. and OURA, E. "Yeast Nutrition and Solute Up-
take" In "The Yeast". Edited by Rose, A.H. & Harrison, J.
S. Academic Press. Inc., New York, Vol. 2, p. 3-74, 1970.
106. SZETELA, E.J. and McMAHON, D.G. "Production of Methane through
Energy Farming". Amer. Inst. Chem. Eng. Symp. Series N^o158,
17-23, 1976.
107. TANAKA, M., TANIGUCHI, M., MORITA, T., MATSUNO, R. and KAMI -
KUBO, T. "Effect of Chemical Treatment on Solubilization
of Crystalline Cellulose and Cellulosic Wastes with
Pellicularia filamentosa Cellulase". J. Ferment. Technol.
57, 186-190, 1979.

108. TANAKA, T., YAMANAKA, s. and TAKINAMI, K. "Saccharification of Cellulose by Acetolysis". J. Ferment. Technol. 56, 410-415, 1978.
109. TAPPI. Technical Association of the Pulp and Paper Industry. "Lignin in Wood". T. 222 M-54.
110. TAPPI. Technical Association of the Pulp and Paper Industry "Hemicellulose in Wood". T. 223 M-58.
111. THAYANITTY, K., HARDING, G. and WASW, D.A.J. "Rearrangement of Lactose on Sterilization". Biotechnol. Lett. 4, 423-424, 1982.
112. TOYAMA, N. and OGAWA, K. "Sugar Production from Agricultural Woody Waste by Saccharification with *Trichoderma viride* Cellulase". In "Cellulose as a Chemical and Energy Resource". Edited by Wilke, C.R. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5, 225-244, 1975.
113. TOYOMA, N. "Feasibility of Sugar Production from Agricultural and Urban Cellulosic Waste with *Trichoderma viride* Cellulase". In "Enzymatic Conversion of Cellulosic Materials: Technology and Applications". Edited by Gaden, E.L., Mandels, M. H., Reese, E.T. and Spano, L.A. John Wiley & Sons. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 84-94, 1976.
114. TSAO, G.T. "Cellulosic Materials as a Renewable Resource". Process Biochem., October, 12-14, 1978.
115. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. and HARRISON, J.G. "Detection

of Sugars on Paper Chromatograms". Nature 166, 444, 1950.

116. URIETA, A.B., TOMA, M. e PARK, Y.K. "Estudo Comparativo da Produção de Celulase Fúngica por Fermentação Submersa e por Cultura em Semi-Sólida". Revista Brasileira de Tecnologia, 6, 181-188, 1975.
117. UPDEGRAFF, D.M. "Semi-Micro Determination of Cellulose in Biological Materials". Anal. Biochem. 32, 420-424, 1969.
118. UENG, P.P. and GONG, C.-S. "Ethanol Production from Pentoses and Sugar-Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* Species". Enzyme Microb. Technol. 4, 169-171, 1982.
119. WEINER, P.J. and ZEIKUS, J.E. "Fermentation of Cellulose and Cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the Absence and Presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*". Appl. Environ. Microbiol. 33, 289-297, 1977.
120. WIKEN, T.O. "Utilization of Agricultural and Industrial Waste by Cultivation of Yeast". In "Proc. IV IFS :Ferment. Technol. Today. Edited by Gyoza Termi. Society of Fermentation Technology. Japan, March 19-25, 569-576, 1972.
121. WILKE, C.R., YANG, R.D., SCIAMANNA, A.F. and FREITAS, R.P. "Raw Materials Evaluation and Process Development Studies for Conversion of Biomass to Sugar and Ethanol". Biotechnol. Bioeng. 23, 163-183, 1981.
122. WILKIE, K.C.B. "The Hemicellulose of Grasses and Cereals".

Adv. Carbohydr, Chem. Biochem. 36, 215-264, 1979.

123. WINKLER, M. "Limitation of Fermentation Processes for utilization of Food Wastes". In "Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology". Edited by Wiseman, A. John Wiley & Sons. Vol. 7, 271-306, 1983.
124. WOOD, T.M. "The Cellulase of *Fusarium solani*". Biochem. J. 121, 353-362, 1971.
125. YU, E.K.J. and SADDLER, J.N. "Power Solvent Production by *Klebsiella pneumoniae* Grown on Sugars Present in Wood Hemicellulose". Biotechnol. Lett. 4, 121-126. 1982.

ERRATAS

Página 11 Linha 10 ... "o rendimento de extração da hemice-
lulose pelo pré-tratamento, com al-
cali"...

LEIA-SE:

... "o rendimento de extração da hemice-
lulose foi máxima. A extração da he-
micelulose pelo pré-tratamento, com
alcali"...

Página 37 Linha 2 ... 72 horas à 50°C.

LEIA-SE:

... 72 horas à 5°C.

Página 39 Linha 10 ... 5 min. à 50°C.

LEIA-SE:

... 5 min. à 5°C.

Página 68 Linha 6 ... caso 40% da ...
Linha 8 ... que 60% foi...
Linha 14 ... mais 34% das...

LEIA-SE RESPECTIVAMENTE:

... caso 25% da ...
... que 75% foi ...
... mais 49% das...

Página 65 Linha 27 ... foi 61% deste valor

LEIA-SE:

... foi 31%.