

# **AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NA PRODUÇÃO DE ETANOL EM MEIOS À BASE DE MELAÇO E HIDROLISADOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

\*Vanessa Silva de Oliveira<sup>1,2</sup>, Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra<sup>1,2</sup>, Ester Ribeiro Gouveia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Pernambucana de Saúde, curso de Farmácia \*(oliveiravs07@gmail.com)

<sup>2</sup>Laboratório de Processos Biotecnológicos, Departamento de Antibióticos - UFPE

## **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi estudar o desempenho fermentativo de cinco linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* em meios à base de melaço na presença de hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar. Inicialmente o bagaço foi submetido a um pré-tratamento hidrotérmico a 186°C por 8 minutos, sendo utilizada uma carga de sólidos de 500 g e 10 L de água. A hidrólise ácida do material pré-tratado foi realizada em autoclave a 121°C por 30 minutos. Para a fermentação do hidrolisado ácido foram utilizadas cinco linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: UFPEDA 1238, UFPEDA 1324, UFPEDA 1326, UFPEDA 1333 e UFPEDA 1337. As fermentações foram realizadas a temperatura ambiente, sem agitação e a concentração inicial do inóculo de 1 g/L. As concentrações de açúcares redutores totais e etanol foram quantificados por reação com o ácido dinitrosalicílico e por cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente. Observou-se que o hidrolisado resultante da hidrólise com ácido sulfúrico, contendo 6 % de bagaço foi o que apresentou maior conversão de celulose em glicose, 15,58 g/L aproximadamente. Este foi selecionado para compor o meio de 20 % cultura à base de melaço e demais nutrientes na produção de etanol pelas linhagens industriais. A maior produção de etanol (76 g/L) foi alcançada pela linhagem UFPEDA 1324 em 24 horas, o que resulta numa produtividade de 3,2 g/L.h.

Palavras-chave: bagaço, hidrólise, fermentação, etanol.

PERFORMANCE ASSESSMENT OF LINES FERMENTATIVE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN INDUSTRIAL PRODUCTION OF  
ETHANOL IN BASED MEDIA AND MOLASSES HYDROLYSATES  
BAGASSE OF CANE SUGAR

ABSTRACT

The objective of this work was to study the fermentation performance of five industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* in molasses based media in the presence of acid hydrolyzed bagasse cane sugar. Initially, the pulp was subjected to a pre-hydrothermal treatment at 186 ° C for 8 minutes, using a solids loading of 500 g in 10 L of water. Acid hydrolysis of the pretreated material was carried out by autoclaving at 121° C for 30 minutes. For the fermentation of the hydrolysed acid were used five strains of *Saccharomyces cerevisiae*: UFPEDA 1238, UFPEDA 1324, UFPEDA 1326, UFPEDA 1333 and UFPEDA 1337, being held at room temperature without stirring and the initial concentration of the inoculum of 8 g / L. The concentrations of total reducing sugars and ethanol were quantified by reaction with acid dinitrosalicílico and HPLC. It was observed that the hydrolyzate resulting from hydrolysis with sulfuric acid, containing 6% pulp showed the highest conversion of cellulose to glucose, 15.58 g / L approx. This was selected to compose the 20% culture medium based on molasses and other nutrients in the production of ethanol by industrial strains. The highest yield of ethanol (76 g / L) was achieved by strain 1324 UFPEDA 24 hours, resulting in a yield of 3.2 g / L.h

Keywords: bagasse, hydrolysis, fermentation, ethanol.

## INTRODUÇÃO

Os principais micro-organismos utilizados na produção industrial de etanol são as leveduras. Dentre as mais utilizadas, estão as do gênero *Saccharomyces* que utilizam hexoses como matéria-prima e *Kluyveromyces fragilis* e *Candida* sp. que utilizam lactoses e pentoses. Algumas bactérias, como as do gênero *Zymomonas* também são capazes de produzir etanol<sup>1</sup>.

Linhagens industriais selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* possuem uma alta eficiência fermentativa na produção de etanol, permitindo assim que características adquiridas às tornem produtores superiores de etanol mais tolerantes aos produtos da fermentação<sup>2</sup>. Algumas dessas características são de não necessitar de oxigenação, apresentar pH ótimo baixo e serem tolerantes à alta concentração de etanol<sup>3</sup>.

Durante a fermentação, as leveduras podem sofrer alguns estresses como deficiência nutricional, altas temperaturas, contaminações, acúmulo de etanol. Tais fatores influenciam no crescimento celular e na produção de etanol e podem afetar severamente as leveduras, reduzindo a viabilidade celular e diminuindo o rendimento do etanol<sup>4</sup>.

A quantidade e o número de subprodutos da fermentação dependem de uma série de fatores. Os principais são o tipo de matéria-prima, a linhagem de levedura empregada e o processo de fabricação de etanol. Frequentemente encontram-se os seguintes produtos, considerados inibidores da fermentação: glicerol, ácido succínico, ácido acético, alcoóis superiores, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, gás sulfídrico e furfural<sup>5,6</sup>.

O bagaço de cana-de-açúcar, para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados em estudos para a bioconversão em etanol, uma vez que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem<sup>7</sup>.

A biomassa pode ser processada para obtenção de diversos subprodutos. Os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontamente disponíveis para a bioconversão. São compostos por polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, que

precisam ser hidrolisados por ácidos ou enzimas, a açúcares fermentáveis<sup>6</sup>. A organização e interação entre esses polímeros da parede celular constituem força e resistência ao ataque biológico, físico e químico. Esta barreira deve ser desconstruída<sup>8</sup>.

Para obtenção rápida da hidrólise enzimática da biomassa com um rendimento alto de açúcares (tanto hexoses como pentoses), as duas principais camadas de proteção em torno da celulose – hemicelulose e lignina – precisam ser removidas ou alteradas sem que haja degradação dos açúcares da hemicelulose<sup>9</sup>.

Para este fim, um passo de pré-tratamento é geralmente usado para a solubilização das hemiceluloses<sup>10</sup>. Neste contexto, o pré-tratamento hidrotérmico vem ganhando cada vez mais atenção tanto como um solvente ambientalmente amigável e uma medida atraente para uma variedade de aplicações<sup>11</sup>.

A hidrólise eficiente de material lignocelulósico e a fermentação dos açúcares formados, pentoses e hexoses, têm sido um grande desafio técnico. As rotas mais conhecidas são a hidrólise catalisada por um ácido, denominada de hidrólise ácida, e a por enzimas, isto é, hidrólise enzimática. A hidrólise com ácido diluído pode diminuir o rendimento em etanol devido à presença de inibidores para a etapa posterior de fermentação, tais como ácidos orgânicos fracos, derivados furânicos e compostos fenólicos gerados durante a hidrólise da lignocelulose<sup>12</sup>. A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar é necessária para a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, para posterior fermentação e produção de bioetanol<sup>13</sup>.

O meio ácido, na hidrólise, quebra os polissacarídeos, além de gerar produtos de decomposição dos monossacarídeos, como o furfural e o hidroximetilfurfural, provenientes da degradação de pentoses e de hexoses, respectivamente<sup>14</sup>. Os hidrolisados ácidos devem ser neutralizados antes de serem utilizados em meios de fermentação. O ácido mais utilizado é o sulfúrico, o qual pode ser neutralizado com carbonato de cálcio, formando sulfato de cálcio. Outro ácido que também pode ser utilizado para hidrolisar materiais lignocelulósicos é o ácido fosfórico. Este pode ser neutralizado com NaOH, formando o sal fosfato de sódio. Este sal pode permanecer no hidrolisado, visto que o mesmo é utilizado como nutriente por microrganismos<sup>14</sup>. Os ácidos são tóxicos, corrosivos e perigosos e exigem reatores que são resistentes à

corrosão. Além disso, o ácido concentrado deve ser recuperado após a hidrólise para tornar o processo economicamente viável<sup>15</sup>.

O último passo para obtenção de bioetanol é a fermentação que pode ser otimizada usando-se microrganismos capazes de fermentar tanto glicose como xilose, o que é necessário para uma eficiente conversão de bagaço em etanol e para a redução do custo de produção<sup>16</sup>.

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e CO<sub>2</sub><sup>17</sup>.

Anaerobicamente, o metabolismo do açúcar pela levedura gera uma forma de energia (adenosina trifosfato – ATP) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO<sub>2</sub> resultantes constituem produtos de excreção para a célula na ausência de oxigênio<sup>18</sup>.

O aspecto mais importante da fermentação do bioetanol é o rendimento em etanol, ou mais geral, o rendimento industrial. Ele é dependente, entre muitos fatores da capacidade fermentativa da população de leveduras<sup>19</sup> e a resistência dessas células industriais a condições de estresse<sup>20, 21</sup>. Depois de terem sido expostas a diferentes tipos de stress, células de leveduras constroem uma rápida resposta celular que tem como objetivo proteger os componentes celulares contra possíveis danos, que envolvem a produção de proteínas protetoras, como proteínas de choque térmico, síntese e degradação ou de metabólitos, como a glutatona e a trealose<sup>22, 23, 24</sup>.

## OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto foi estudar o desempenho fermentativo de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio à base de melaço e hidrolisado ácido do bagaço de cana-de-açúcar.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aplicar um pré-tratamento hidrotérmico no bagaço de cana de açúcar *in natura*.
2. Obter hidrolisados ácidos do bagaço de cana-de-açúcar;
3. Quantificar os inibidores presentes no hidrolisado ácido.
4. Produzir etanol utilizando hidrolisados ácidos utilizando cinco leveduras industriais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bagaço de cana-de-açúcar

O material utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar, cedido pela Usina Japungu Agroindustrial na Paraíba.

### Extrativos

Para a determinação dos extrativos, foram pesados aproximadamente 5 g do bagaço *in natura*, os quais foram submetidos a um tratamento em um aparelho de Soxhlet, utilizando-se etanol 95 % v/v como solvente extrator, por um período de 8 horas.

O material lignocelulósico foi colocado em um cartucho de papel de filtro, previamente seco e tarado. A parte superior do cartucho foi fechada com um pouco de algodão. Ao final do processo extrativo, o cartucho com o material foi seco em estufa a 105°C até peso constante. A percentagem de extrativos foi calculada com base na diferença de massa, conforme a Equação (1).

$$\% Ext = \frac{M_i - M_f}{M_f} * 100 \quad (1)$$

Onde:

% Ext: percentual de extrativos

M<sub>i</sub>: massa seca não extraída

M<sub>f</sub>: massa seca extraída

## Pré-tratamento hidrotérmico

O bagaço foi pré-tratado com vapor em reator tipo autoclave a 186°C por 8 minutos, sendo utilizada uma carga de sólidos de 500 g em 10 L de água. A porcentagem de massa recuperada após o tratamento foi quantificada utilizando-se o valor da umidade do bagaço.

$$\%Mrec = \frac{M_i.U_i}{M_f.U_f} * 100 \quad (2)$$

Onde:

Mrec – Massa recuperada

M<sub>i</sub> – Massa antes do pré-tratamento

M<sub>f</sub> – Massa após o pré-tratamento

U<sub>i</sub> – Umidade antes do pré-tratamento

U<sub>f</sub> – Umidade após o pré-tratamento

## Caracterização química do material

O material pré-tratado foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, conforme metodologia recentemente validada por Gouveia *et al.* (2009)<sup>25</sup>.

Amostras de 2g (moída a 20 mesh em moinho Wiley) de bagaço pré-tratado com vapor, foram pesadas com precisão de 0,1 mg foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostaticado (Fisatom) a 45° C por 7 min. As amostras foram transferidas quantitativamente para frascos de erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Para a hidrólise dos oligômeros restantes, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados até a temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida será transferida para balão volumétrico de 500 mL, o

qual tee o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel.

Lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klasson modificado por Rocha *et al.*(1997)<sup>26</sup>. O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100° C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a Equação (3):

$$\% L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (3)$$

Onde:

$L_{Ki}$  – Lignina Klason insolúvel

$M_k$  – massa de lignina insolúvel seca

$M_C$  – massa de cinzas

$M_A$  – massa da amostra seca

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro<sup>26</sup>. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação (4).

$$C_{lig} = 4,97*10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 4,74*10^{-3} \quad (4)$$

Onde:

$C_{lig}$  - concentração de lignina solúvel, em g/L.

$A_T$  - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm.

$A_{pd} = c_1\varepsilon_1 + c_2\varepsilon_2 =$  absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações  $c_1$  e  $c_2$  foram determinadas previamente por CLAE e  $\varepsilon_1$  e  $\varepsilon_2$  são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L/g.cm.

Antes da determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida  $C_{18}$ , num sistema manifold conectado a uma bomba de vácuo. Para as análises de furfural e de hidroximetilfurfural, uma amostra do hidrolisado foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, o papel de filtro foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente pesado. A amostra foi calcinada lentamente até 300°C e mais 2 horas a 800°C, em uma mufla (FORNITEC MODELO MDS 15X15X30). Na determinação das cinzas totais, foram pesados 2 g do bagaço em cadinho de porcelana previamente pesado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação (5).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (5)$$

Onde:

% Cinzas – Percentual em massa de cinzas;

$M_c$  – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);

$M_a$  – massa da amostra base seca.

### Hidrólises ácidas do bagaço de cana-de-açúcar

As hidrólises ácidas do material pré-tratado foram realizadas com ácido fosfórico (1,72 mol/L) e ácido sulfúrico (1,87 mol/L) que correspondem a 10% v/v de acordo com resultados prévios obtidos<sup>27</sup>. Os experimentos foram enumerados de 1 à 10, sendo os de 1 à 5 realizados com ácido sulfúrico e os de 6 à 10 com ácido fosfórico. A

porcentagem de bagaço utilizada foi de 2, 4, 6, 8 e 10% para ambos os ácidos. Estas hidrólises foram conduzidas em autoclave, durante 30 minutos.

Todas as amostras foram centrifugadas, sendo os sobrenadantes utilizados para a quantificação de Açúcares Redutores Totais (ART's), pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS).

## Fermentações

Para a fermentação do hidrolisado ácido foram utilizadas cinco linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: UFPEDA 1238, UFPEDA 1324, UFPEDA 1326, UFPEDA 1333 e UFPEDA 1337, pertencentes à Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE. O meio de cultura utilizado para a conservação da levedura, em tubo de ensaio inclinado, continha: glicose (20 g/L), extrato de levedura (4 g/L), peptona (3 g/L) e Agar (1,5 % m/v). Na preparação do inóculo, também foi utilizado este meio, porém sem adição de ágar.

O meio de fermentação à base de hidrolisado ácido e melão (173 g/L), além destes, continha: 1 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,75 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 4 g/L de extrato de levedura. O melão foi quantificado quanto a concentração de ART (açúcares redutores totais), e este continha 865 g/L de ART. O pH do meio de fermentação foi ajustado para 5,0.

Inicialmente, as linhagens industriais de *Saccharomyces* foram repicadas em tubo de ensaio contendo o meio de manutenção (pH = 7,0), o qual foi mantido a 30°C durante 24 horas. Após esse período, o inóculo de cada linhagem foi preparado através de outro repique em frasco de erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio de manutenção (pH = 7,0), o qual foi acondicionado a 250 rpm e a 30°C, em mesa incubadora rotativa. Após 12 horas, 10 mL da suspensão de biomassa foram transferidos para o meio de fermentação em erlenmeyers de 250 mL que continham 5 mL (10 %) do hidrolisado ácido neutralizado com NaOH à 7,5 mol/L. A concentração inicial de biomassa foi de 4 g/L. Todas as fermentações foram realizadas em triplicata.

## Métodos Analíticos

### Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

As determinações das concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo líquido da Agilent HP 1100. As condições cromatográficas foram: coluna Aminex HPX 87H<sup>+</sup>, ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, detecção por índice de refração, vazão de 0,6 mL/min e temperatura de 50<sup>o</sup>C.

### Determinação de etanol

As determinações das concentrações de etanol nas amostras das fermentações foram realizadas da seguinte forma. Primeiramente, foram levadas a destilação num Micro-destilador de álcool da Tecnal, onde se separou por destilação em pratos os demais componentes da amostra do etanol produzido pela levedura. Após destiladas as amostras foram levadas a um Densímetro laboratorial, onde foram quantificadas em g/L.

### Determinação de hidroximetilfurfural e de furfural

A determinação de hidroximetilfurfural (HMF) e de furfural também foi realizada por CLAE em cromatógrafo líquido da Agilent HP 1100. Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna C-18 (Beckman), acetonitrila 11,2% V/V e ácido acético (1%) 88,8% V/V como fase móvel, detecção UV em 274 nm, vazão de 0,8 mL/min e 25<sup>o</sup>C.

### Quantificação de açúcares redutores totais

Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido dinitrossalicílico, onde o reagente composto pelo ácido dinitrossalicílico (DNS), NaOH 2N e tartarato duplo de Sódio e Potássio (Sal de Rochelle) foi posto em contato com a

amostra glicosada numa alta temperatura, o produto da reação foi medido em espectrofotômetro a 540 nm<sup>28</sup>.

Para a quantificação de ART no melão foi colocado em um balão volumétrico (10 mL) 0,5 mL de melão diluído 50 vezes e adicionado a este 0,5 mL de HCL concentrado. O balão volumétrico foi posto em banho à 67° C por um período de 7 minutos e logo após resfriado em banho de gelo. A esta mistura reacional foram adicionadas duas gotas de fenolftaleína e gotejado NaOH 6 N até a neutralização. O balão foi aferido com água destilada e foi medido ART como descrito acima.

#### Quantificação de fenóis totais

Os fenóis totais foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu<sup>29</sup>. O reagente de folin se baseia numa mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup> porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras. Através deste método, a 0,5 mL do hidrolisado diluído adicionaram-se 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10% V/V) e 2,0 mL de carbonato de sódio (7,5% P/V), incubando-se em banho termostatizado a 50° C, durante 5 minutos. Para a preparação do branco, o mesmo procedimento foi utilizado, com a substituição de 0,5 mL de água destilada em vez de amostra.

#### Parâmetros cinéticos

##### Conversão em glicose

$$Conversão = \frac{Glicose\ do\ ensaio * 0,9}{Cel.\ do\ bagaço} \quad Eq. (6)$$

\*0,9 = Fator de conversão da glicose em celulose.

Rendimento em etanol ( $Y_{P/S}$ )

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta E}{\Delta S} \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde:

$\Delta E$  - ( $E_i - E_f$ ) – Variação da concentração de etanol (g/L)

$\Delta S$  - ( $S_i - S_f$ ) – Variação da concentração de glicose (g/L)

Eficiência da fermentação ( $E_f$ )

$$E_f = \frac{(Y_{P/S})_r}{(Y_{P/S})_t} \cdot 100 \quad \text{Eq. (8)}$$

Onde:

$(Y_{P/S})_r$  - rendimento real

$(Y_{P/S})_t$  - rendimento teórico = 0,511

Produtividade volumétrica máxima em produto ( $Q_P$ )

$$Q_P = \frac{E_{\max}}{t_{\max}} \quad \text{Eq. (9)}$$

Onde:

$E_{\max}$  - concentração máxima de etanol;

$t_{\max}$  - tempo referente à concentração máxima de etanol.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bagaço utilizado apresentou 8 % de extrativos após 8 horas de tratamento em um aparelho de Soxhlet, utilizando-se etanol 95 %. Os extrativos dos materiais lignocelulósicos são compostos que ocorrem nos materiais da planta sem fazer parte dos elementos estruturais. Os extrativos interagem com reagentes utilizados nos processos de hidrólise e deslignificação da biomassa, bem como na quantificação da lignina presente na mesma, acarretando resultados errôneos na caracterização do material<sup>30</sup>.

A massa total recuperada após o pré-tratamento hidrotérmico foi 373,03 g, que corresponde a 74,68% da massa utilizada no pré-tratamento considerando a umidade do material. Os teores de celulose, hemicelulose e lignina, antes e após o pré-tratamento hidrotérmico são apresentados na Tabela 1.

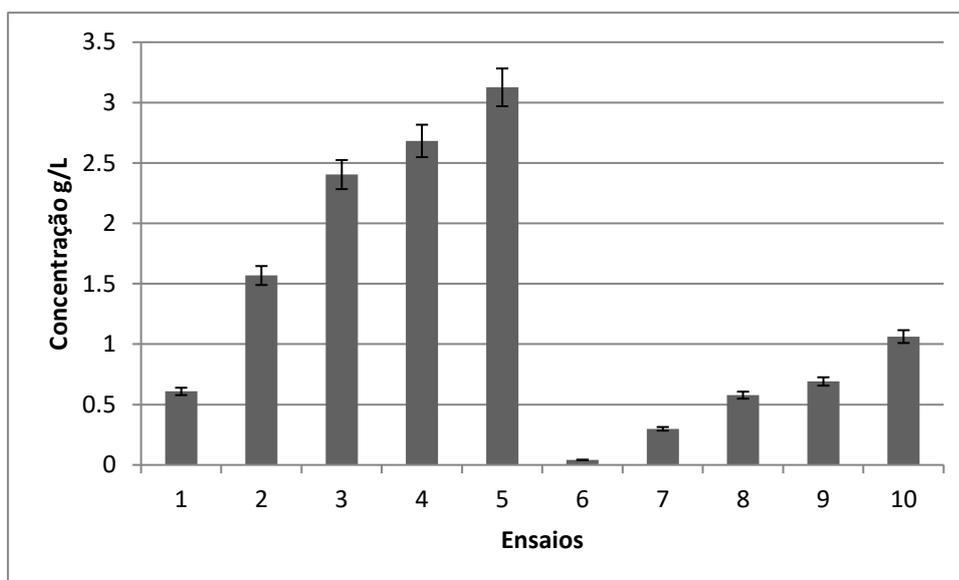
**Tabela 1.** Composição química do bagaço in natura e pré-tratado.

<b>Bagaço In natura</b>	<b>CELULOSE (%)</b>	<b>HEMICELULOSE (%)</b>	<b>LIGNINA TOTAL (%)</b>
Média	50,03	30,82	18,57
Desvio padrão	1,70	1,02	1,09
Coefficiente de variação	3,40	3,32	5,90
<b>Bagaço Pré-tratado</b>			
Média	46,48	13,02	40,13
Desvio padrão	0,80	1,64	2,13
Coefficiente de variação	1,72	12,60	5,32

O teor de hemicelulose diminuiu com o pré-tratamento hidrotérmico. A água sob alta pressão penetra na biomassa, hidrata a celulose e remove parte da hemicelulose. Diferentemente, a lignina, que é altamente solúvel em meio básico, teve seu teor aumentado no bagaço pré-tratado, já que o processo realizado se utilizou apenas de água como solvente.

A Figura 1 apresenta as concentrações médias de glicose obtidas nos experimentos de hidrólise ácida.

**Figura 1.** Concentração de glicose nas hidrólises ácidas. Ensaios 1 a 5 (com ácido sulfúrico). Ensaios 6 a 10 (com ácido fosfórico).

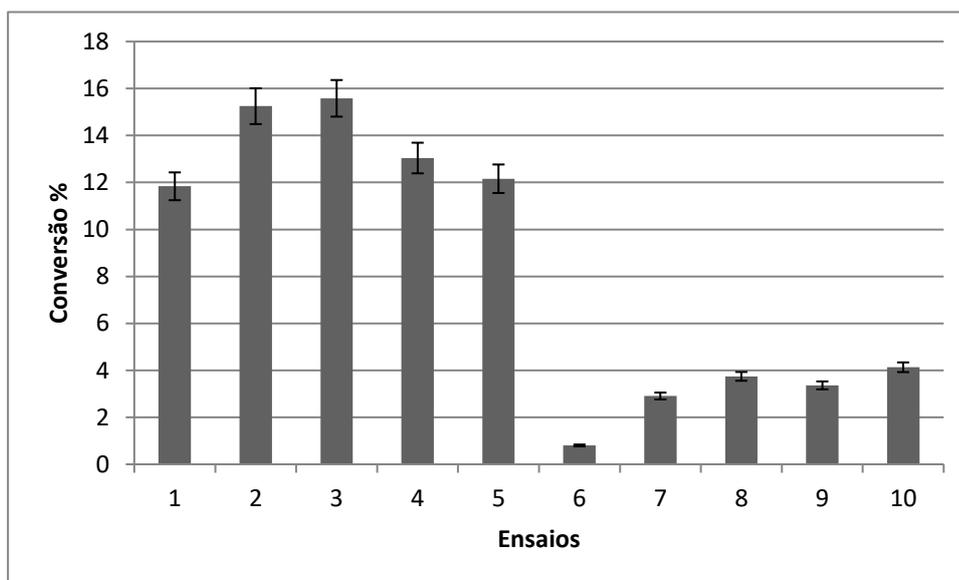


Os experimentos de 1 à 5 foram os que apresentaram maior concentração de glicose, sendo estes realizados com ácido sulfúrico. Por outro lado, os experimentos de 6 à 10, realizados com ácido fosfórico, tiveram as menores concentrações de glicose.

Observando-se o experimento 1 que utilizou apenas 1 g de bagaço e foi realizado com  $H_2SO_4$ , o mesmo apresentou aproximadamente 0,6 g/L de glicose. Enquanto em um experimento realizado com  $H_3PO_4$ , para que a concentração de glicose se aproximasse deste valor foram necessários de 3 a 4 g de bagaço (experimentos 8 e 9).

A Figura 2 apresenta as conversões médias de glicose obtidas nos experimentos de hidrólise ácida.

**Figura 2.** Conversão de glicose nas hidrólises ácidas. Ensaios 1 a 5 (com ácido sulfúrico). Ensaios 6 a 10 (com ácido fosfórico).



Apesar de na Figura 1 o experimento 5 ter apresentado a maior concentração de glicose (por possuir uma massa maior de bagaço - 5 g), esse mesmo experimento não apresentou a maior conversão (Figura 2). O experimento que teve maior conversão foi o 3, uma vez que, com apenas 30 minutos de hidrólise, apresentou aproximadamente 16 % de conversão.

Comparando-se a conversão obtida no experimento 1 com a hidrólise enzimática realizada com a mesma carga de sólidos em experimentos anteriores<sup>31</sup>, observa-se que em 30 minutos de experimento, foram obtidos cerca de 2,5 g/L de glicose no primeiro caso, contra apenas 0,6 g/L em 6 horas no segundo.

Tendo em vista que o ensaio de número 3 apresentou maior conversão de celulose, este, foi selecionado para ser repetido em sete réplicas nas mesmas condições com o tempo maior de reação (em autoclave), em vez de apenas 30 minutos, 1 hora, em duas rodadas de 30 minutos, as quais foram realizadas em dias diferentes.

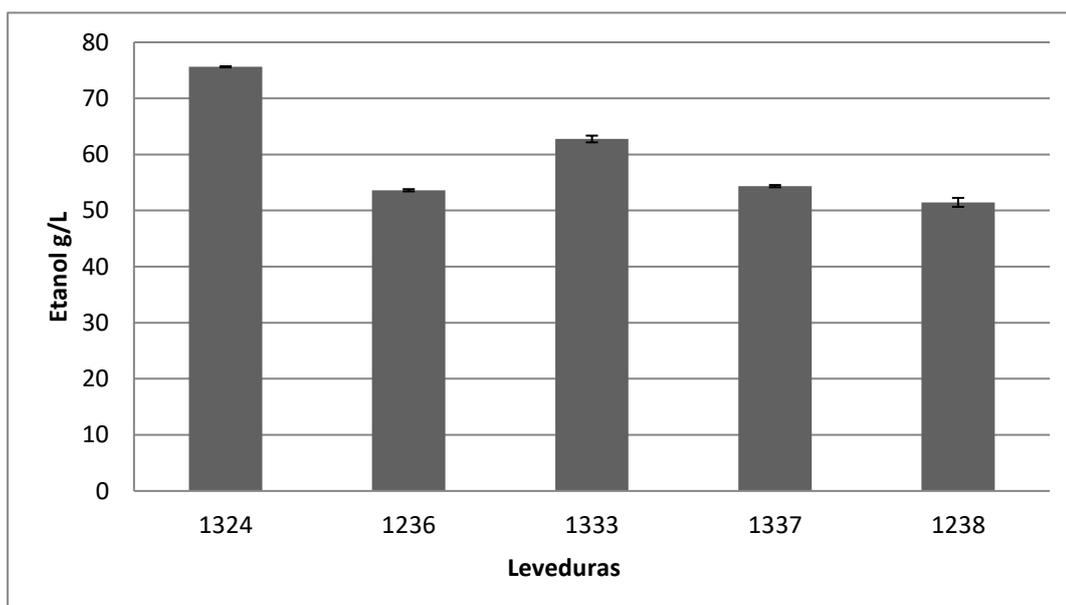
A concentração média de glicose das réplicas foi de 5,09 g/L, a conversão de 33,02 % e o coeficiente de variação foi de 3,56 %. Comparando-se a concentração e a conversão de glicose média deste experimento com 1 hora de duração com o realizado nas mesmas condições mostrado nas Figuras 1 e 2, a concentração e a conversão de glicose, praticamente dobraram, passando de 2,4 g/L para 5,09 g/L e de 16 % para 33 %, respectivamente. Isso mostra que o aumento do tempo nas hidrólises ácidas favoreceu a conversão de celulose em glicose.

A quantificação de inibidores foi baixa em média de 2,12 g/L de ácido acético, 0,026 g/L de HMF (Hidroximetilfurfural), 0,86 g/L de furfural e 33,38 mg/L de fenóis totais. Segundo Palmqvist & Hahn-hagerdal (2000 b)<sup>12</sup>, estas concentrações são consideradas baixas e não inibem a fermentação.

O hidrolisado deste experimento foi utilizado para a realização das fermentações com as leveduras selecionadas: UFPEDA 1324, UFPEDA 1236, UFPEDA 1333, UFPEDA 1337 e UFPEDA 1238.

A Figura 3 mostra a concentração final de etanol com 24 h de experimento com as cinco diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Figura 3.** Concentração final de etanol em 24 h de fermentação com as cinco leveduras.

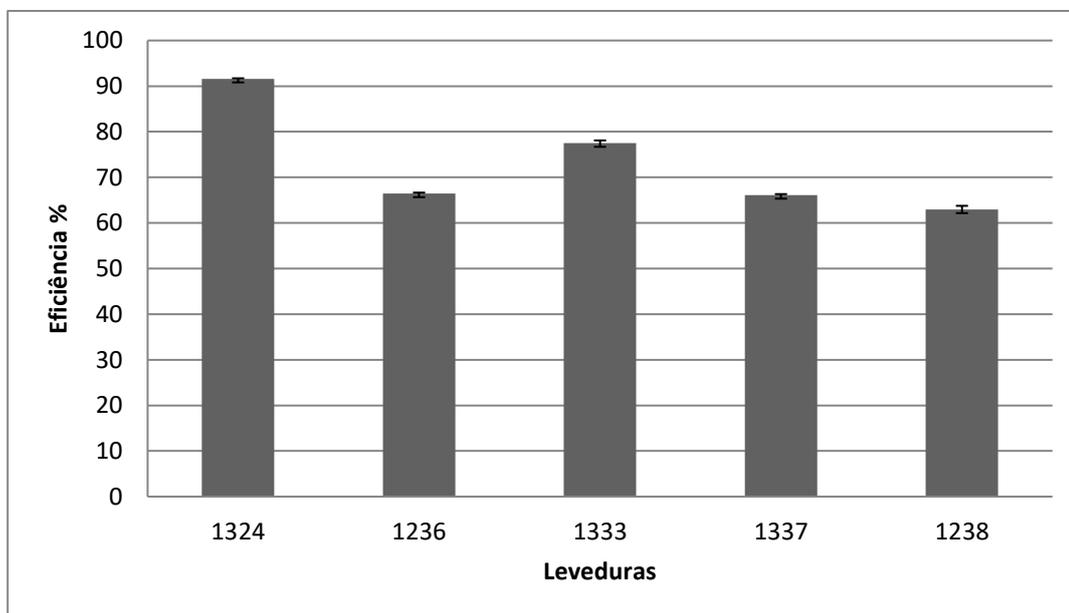


Observando-se a Figura 3, a linhagem que apresentou maior produção de etanol foi a 1324, que obteve em média 76 g/L de etanol em 24 h. A cepa 1238, que foi utilizada em fermentações por SANTOS *et al* (2007)<sup>32</sup>, SANTOS & GOUVEIA (2008)<sup>27</sup> & WANDERLEY *et al* (2011)<sup>33</sup>, apresentou concentração de etanol final de 51,4 g/L, o menor desempenho fermentativo em comparação com as outras utilizadas no estudo.

Uma análise de variância mostrou que as concentrações com 24 horas de fermentação, para as cinco leveduras, foram significativamente diferentes ( $F = 43,31$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Entretanto, na análise de variância da produção de etanol pelas linhagens 1236, 1337 e 1238, não foram significativamente diferentes ( $F = 1,085$ ,  $\alpha = 0,05$ ), mostrando que elas têm o mesmo potencial fermentativo.

A Figura 4 apresenta as eficiências das fermentações das cinco leveduras.

**Figura 4.** Eficiências das fermentações em etanol com as cinco leveduras durante 24 horas de experimento.



Em conformidade com os dados de concentração de etanol obtidos na Figura 3, a levedura que apresentou maior eficiência em etanol com 24 horas de experimento foi a 1324, que obteve em média 91,6 % de eficiência. E a que menos se destacou entre as demais utilizadas no experimento foi a 1238 que obteve 62,95 % em média.

Análises estatísticas demonstraram que as leveduras são significativamente diferentes entre si com base nas suas eficiências em etanol. ( $F = 38,37$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Assim como nos resultados obtidos com as concentrações de etanol, a eficiência das leveduras 1236, 1333 e 1337, também não foram significativamente diferentes ( $F = 1,25$ ,  $\alpha = 0,05$ ).

A levedura 1324 foi a que apresentou maiores rendimento em etanol (0,46 g/g) e produtividade (3,15 g/L.h).

## CONCLUSÕES

- O pré-tratamento hidrotérmico é um excelente meio de se reduzir a quantidade de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar.
- O bagaço de cana-de-açúcar in natura possui uma pequena quantidade de extrativos que não influenciou na sua caracterização química.
- A hidrólise ácida com ácido sulfúrico do bagaço de cana-de-açúcar foi mais eficiente do que a hidrólise com o ácido fosfórico.
- Hidrólises ácidas podem ser realizadas em menos tempo do que as hidrólises enzimáticas.
- O hidrolisado ácido apresentou pequena quantidade de inibidores.
- A levedura 1324, apresentou maior potencial fermentativo, sugerindo-se a sua utilização em experimentos posteriores para uma melhor investigação.

## REFERÊNCIAS

1. Shuler, M. K; Margi, G. (2002) *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall PTR. 2ª. Ed.
2. Amorim, H. V. (2005) *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*. São Paulo. Fermentec, 448p.
3. Martín, C.; Galbe, M.; Wahlbom, C. F.; Hahn-Hägerdal, B.; Jönsson, I. J. (2002) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 274–282.
4. Bai, F. W.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M. (2008) Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26 : 89-105.
5. Menezes, T. J. B. (1980) *Etanol, o combustível do Brasil*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 141-178.
6. Martín, C.; Klinke, H. B.; Thomsen, A. B. (2007) Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 : 426-432.
7. Pandey, A.; Soccol, C. R. (2000). Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. *Journal Scientific Industrial Research* 59: 12–22.
8. Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100:10–18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027.
9. Ohgren, K.; Bura, R.; Saddler, J.; Zacchi, G.; Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. (2007) *Bioresource Technology*. 98, 2503-2510.

10. Himmel, M. E., Ding, S., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., Foust, T. D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315:804–807. doi:10.1126/science.1137016.
11. Silva, V. F. N.; Arruda, P. V.; Felipe Maria G. A. Felipe; Adilson R. Gonçalves; George J. M. Rocha - *J Ind Microbiol Biotechnol* (2010) Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing.
12. Palmqvist, E.; Hahn-Hagerdal, B.(2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25-33.
13. Martín, C.; Marcet, M.; Almazán, O.; Jönsson, L. J. (2006). Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology* 98, 1767-1773.
14. Gámez, S.; González-Cabriales, J. J.; Ramírez, J. A.; Garrote, G. (2006), Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, v. 74, p.78-88.
15. Sivers, M.V., Zacchi, G., 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour.Technol.* 51, 43–52.
16. Lima, A. F.(2008). Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar variando o tipo de substrato e a dosagem enzimática. (Monografia) Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas.
17. Lima, L. R.; Marcondes, A. A. (2002) *Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira*. Curitiba: Editora UFPR, 248p.

18. Lima, U. A.; Basso, L. C.; Amorim, H. V. (2001) In: Lima, U. A. (Coord.) *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, p.1-43.
19. Hack, C. J., Marchant R. (1998); Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:323–327.
20. Banat, I. M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., Mchale, A. P. (1998). Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I—Yeast in general. *World J Microbiol Biotechnol* 13:809–821.
21. Brosnan, M. P., Donnelly, D., James, T. C., Bond, U. (2000). The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J Appl Microbiol* 88:746–755.
22. Swan, T. M., Watson, K. (1998) Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett* 169:191–197.
23. Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factor, stressinduced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 24:469–486.
24. Mager, W. H., Siderius, M. (2002) Novel insights into osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res* 2:251–257.
25. Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. M. (2009). Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-Açúcar. *Química Nova* 32 (6): 1500-1503.
26. Rocha, G. J. M.; Silva, F. T.; Curvelo, A. A. S; Araújo, G. T.; Resumos do 5th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, Paraná, Brasil, 1997.

27. Santos, J. R. A.; Gouveia, E. R. Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar utilizando ácido fosfórico e ácido sulfúrico. In: I Workshop Internacional em Biotecnologia, Recife-PE, (2008).
28. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. (1959). *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
29. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 20, n. 2, p. 144-158, 1965.
30. Taherzadeh, M. J.; Karimi, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651, 2008.
31. Oliveira, V. S. Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar em Batelada Alimentada. Projeto de Iniciação Científica – FACEPE (BIC – 0170 – 3.06/10), 2011.
32. Santos, J. R. A.; Souza, V. S. B.; Pinheiro, I .O.; Souto-Maior, A. M.; Gouveia, E. R. Produção de bioetanol utilizando-se melão e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar. In XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba-PR, (2007).
33. Wanderley, M. C. A.; Souza, R. B; Santos, J. R. A.; Gouveia, E. R. Effect of inoculum size on the ethanol production. In: *XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Porto Alegre-RS, 2011.