



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

CHARLINE BONATTO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO
UTILIZANDO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA
PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO EM BIORREATOR**

ERECHIM – RS

2018

CHARLINE BONATTO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO
UTILIZANDO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA
PRESENÇA DE ÁCIDO ACÉTICO EM BIORREATOR**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* de Erechim – RS, como requisito para obtenção do título Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Dra. Helen Treichel
Coorientadora: Ma. Suzana Fátima Bazoti.

ERECHIM - RS

2018

AGRADECIMENTOS

- ♥ À professora Helen Treichel, pela oportunidade, confiança, apoio, auxílio e conhecimentos repassados no decorrer da graduação e durante esta pesquisa.
- ♥ À Suzana F. Bazoti, pela orientação e conhecimentos repassados nesta pesquisa, pela amizade, convivência, conselhos e apoio durante a graduação.
- ♥ Ao professor Sérgio L. Alves Jr., por gentilmente ceder as leveduras utilizadas durante a pesquisa e pelas valorosas contribuições e sugestões durante a pesquisa.
- ♥ Ao Diego Alex Mayer pela colaboração na pesquisa ao desenvolver a modelagem matemática.
- ♥ À toda minha família, pelo incentivo, paciência, apoio e compreensão.
- ♥ Ao Votan, por seu amor, carinho e compreensão pelos momentos de ausência.
- ♥ Aos colegas e amigos Lucimara e Elvis, pelo companheirismo e amizade.
- ♥ À todos os colegas do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, pela convivência e auxílio durante a pesquisa, especialmente ao Bruno, por toda ajuda e conhecimento compartilhado.
- ♥ Aos técnicos de laboratório: Flávia, Diego, Suzana e Izabele, pela ajuda.
- ♥ À todos os professores da graduação, pelo conhecimento repassado.
- ♥ À todos que de certa forma contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Diante da possibilidade de escassez dos combustíveis fósseis, pesquisadores têm voltado suas pesquisas para produção de biocombustíveis alternativos. Porém, para garantir um aumento da matriz energética é preciso garantir que o processo possa ser ampliado em escala até chegar a nível comercial. Nesse sentido, este estudo avaliou a ampliação de escala da produção de etanol de segunda geração, utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar industrial (com presença de inibidores), fermentado por *Wickerhamomyces* sp. UFFS-C.E-3.1.2, em biorreator. Foram realizadas duas fermentações, uma com hidrolisado sem controle de pH e outra com pH controlado e mantido em 7,00. A fermentação conduzida com pH ajustado favoreceu o consumo de xilose, além da glicose e levou a uma produção de etanol 10% maior (9,25 g/L) se comparada com a produção obtida na fermentação sem controle de pH (8,35 g/L). Os resultados apontam que o efeito inibitório do ácido acético pode ser reduzido com o aumento do pH, favorecendo o consumo dessa pentose pela levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-C.E-3.1.2. O aumento de escala em biorreator obteve resultados similares aos obtidos na fermentação conduzida em Erlenmeyer, indicando a possibilidade da ampliação do sistema a nível comercial.

Palavras-chave: Degradação de furfural e HMF. Consumo de xilose. Ampliação de escala. Controle de pH.

ABSTRACT

Faced with the possibility of shortage of fossil fuels, researchers have focused their research for alternative production of biofuels. However, to ensure an increase in the energy matrix, we need to ensure that the process can be expanded in scale until you reach the level of trade. In this sense, this study evaluated the expansion of scale in the production of second generation ethanol, using hydrolyzed sugarcane bagasse industrial (with presence of inhibitors), fermented to *Wickerhamomyces* sp. UFFS-C.E-3.1.2, in the bioreactor. Two fermentations were performed, one without pH control and another with a pH controlled at 7.00. The fermentation conducted at pH adjusted favored xylose consumption in addition to glucose and led to a 10% higher ethanol production (9.25 g / L) when compared to the fermentation production without pH control (8.35 g / L). The results indicate that the inhibitory effect of acetic acid can be reduced with the increase in pH, favoring the consumption of pentose levels by the yeast *Wickerhamomyces* sp. UFFS-C.E-3.1.2. The increase of scale in bioreactor obtained results similar to those obtained in the fermentation process conducted in erlenmeyer, indicating the possibility of enlarging the system to commercial level.

Keywords: Degradation of furfural and HMF Consumption of xylose. Expansion of scale. pH control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Configuração experimental para produção de etanol de segunda geração.....	22
Figura 2. Comportamento da xilose, celobiose e arabinose durante a fermentação sem ajuste de pH.....	25
Figura 3. Consumo de glicose, comportamento do ácido acético, pH e produção de etanol na fermentação sem ajuste de pH.....	26
Figura 4. Consumo de glicose, xilose e celobiose, comportamento do ácido acético, pH e produção de etanol na fermentação com pH controlado em 7,00.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fontes de biomassa lignocelulósica utilizadas para produção de etanol de segunda geração.....	14
Tabela 2. Composição de alguns materiais lignocelulósicos relatados na literatura.....	15
Tabela 3. Microrganismos descritos na literatura para a produção de etanol de segunda geração.....	20
Tabela 4. Comportamento dos inibidores (furfural e HMF) durante a fermentação sem ajuste de pH.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HMF – Hidroximetilfurfural

HPLC - High performance liquid chromatography

PDA – 10 A - Photo Diode Array Detector

PTFE - Politetrafluoretileno

RID – 10 A - Refractive Index Detector

YPD –Yeast extract – Peptone – Dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	O ETANOL	12
3.2	ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO	12
3.3	ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	13
3.3.1	Composição básica da biomassa lignocelulósica	14
3.3.2	Processo de produção de etanol de segunda geração	16
3.3.2.1	Pré-tratamento e formação de inibidores	16
3.3.2.2	Hidrólise	17
3.3.2.3	Processo de fermentação	18
4	METODOLOGIA	21
4.1	HIDROLISADO	21
4.2	MICROORGANISMO	21
4.3	PREPARO DO INÓCULO	21
4.4	PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BIORREATOR	22
4.5	METODOLOGIA ANALÍTICA	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	ANÁLISE COMPOSICIONAL DO HIDROLISADO	24
5.2	FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO SEM CONTROLE DE PH	24
5.3	FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO COM CONTROLE DE PH	27
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A economia mundial é altamente dependente de várias fontes de combustíveis fósseis, como petróleo, carvão, gás natural, que são recursos não renováveis. Esta demanda está aumentando gradualmente devido ao crescimento populacional e industrial, o que acaba reduzindo a disponibilidade desses combustíveis, agravando problemas ambientais e afetando a saúde pública devido a poluição ocasionada pela emissão de gases na atmosfera (CANABARRO et al., 2017; SARKAR et al., 2012).

Por este motivo, pesquisadores têm voltado sua atenção para produção de combustíveis renováveis a partir de fontes de energia alternativas, como a biomassa, a fim de aumentar a contribuição na matriz energética e diminuir a dependência por combustíveis fósseis (BALAT, 2011).

O etanol produzido através da biomassa lignocelulósica, chamado de etanol de segunda geração, pode ser produzido a partir de diversos resíduos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e trigo, palha e casca de arroz (NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016) e resíduos florestais, subprodutos da silvicultura e culturas energéticas (PARSONS; MCMANUS; TAYLOR, 2018). Entre eles, o bagaço de cana-de-açúcar apresentou maiores vantagens devido a grande disponibilidade em países como Brasil, Índia e outros (VARMA; MONDAL, 2017).

No entanto, o bagaço da cana-de-açúcar, assim como qualquer outro material lignocelulósico, apresenta estrutura recalcitrante, dificultando o acesso dos microrganismos às frações de carboidratos disponíveis na planta (ANTUNES et al., 2017). Assim, o primeiro passo para a produção do etanol de segunda geração é o pré-tratamento da biomassa para que ocorra disponibilização das estruturas celulósicas e hemicelulose.

Porém, nessa etapa também são formados produtos inibitórios como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF) devido à degradação da pentose e hexose, respectivamente, e o ácido acético da hidrólise do radical acetila, presente na hemicelulose (SRITRAKUL; NITISINPRASERT; KEAWSOMPONG, 2018).

Esses compostos inibitórios afetam o processo de fermentação, pois podem inibir completamente o metabolismo do microrganismo, dependendo da espécie utilizada e da concentração presente no hidrolisado (MUPONDWA et al., 2017).

Um recente estudo publicado por Bazoti et al. (2017) mostrou alternativas para essa questão, apresentando uma produção de etanol de até 11 g/L de etanol, ao utilizar uma nova

espécie de *Wickerhamomyces*, na fermentação com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar industrial na presença de inibidores (furfural, HMF e ácido acético).

No entanto, ainda são necessárias atividades de investigação e desenvolvimento para melhorar os processos operacionais, a eficiência do processo e a aumentar a viabilidade econômica, reduzindo custos e etapas em processos com remoção de inibidores no hidrolisado bruto, a fim de viabilizar o processo proposto pelos autores em escala industrial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir etanol de segunda geração a partir de hidrolisado industrial de bagaço de cana-de-açúcar na presença de inibidores de fermentação (ácido acético, HMF e furfural) em biorreator.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a viabilidade da ampliação de escala das condições de fermentação propostas por Bazoti et al. (2017).
- Avaliar o efeito do pH na produção de etanol de segunda geração em biorreator.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O ETANOL

O etanol é composto líquido incolor, volátil, inflamável, possui temperatura de ebulição de 78,3 °C, densidade de 0,789 g/cm³ e é altamente solúvel em água (BARBOSA, 2011). Ele é utilizado para fins farmacêuticos, produção de produtos químicos, para bebidas e principalmente como combustível (LIMA et al., 2001). O etanol é o biocombustível mais utilizado em veículos a motor e meios de transporte (BALAT, 2011).

Esse composto pode ser produzido por processos químicos ou biotecnológicos. A produção pela via química é baseada pela hidratação do etileno, hidratação direta (gás enriquecido com etileno reage com H₂O) ou a partir do acetileno, enquanto o processo biotecnológico é realizado através da fermentação de um substrato, rico em açúcares fermentescíveis, por microrganismos (LOPES et al., 2016). As vias biotecnológicas são responsáveis por 90% da produção do etanol no mundo (FUGITA, 2010).

Um dos fatores que torna a produção pela via biotecnológica muito empregada para a obtenção do etanol é o grande número de matérias-primas naturais que podem ser utilizadas para obter o caldo fermentativo. Qualquer matéria-prima que tenha açúcar ou outro carboidrato pode ser utilizada para obtenção do etanol (LIMA et al., 2001).

A cana-de-açúcar e o milho, matérias-primas utilizadas para a produção de etanol, são plantas C₄, portanto, conseguem converter o dióxido de carbono (CO₂) atmosférico e água em açúcar e polímeros através da fotossíntese. Esse processo utiliza a luz solar para fixar carbono e liberar oxigênio no ar. Então, todo CO₂ resultante da queima de etanol é reciclado através da fotossíntese (LOPES et al., 2016). Assim, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar pode reduzir as emissões de gases poluentes em 40-62% e 19-48%, respectivamente (WANG et al., 2012).

3.2 ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

O etanol produzido a partir de culturas de cana-de-açúcar, cereais e sementes é chamado de etanol de primeira geração. No processo de produção de etanol de primeira geração, apenas açúcares simples são utilizados para a fermentação, justamente por serem diretamente metabolizados por microrganismos (RAELE et al., 2014).

O Brasil e os EUA são líderes na produção de etanol a partir de matérias-primas de primeira geração, responsáveis por 62% da produção mundial (KIM; DALE, 2004). No Brasil, a produção está baseada na fermentação da sacarose da cana-de-açúcar e nos EUA, na fermentação do amido, principalmente do milho.

O primeiro passo para a produção de etanol a partir de sementes é a moagem do substrato e a liquefação do amido. A liquefação é seguida pela hidrólise ou sacarificação, que libera açúcares (glicose) na solução (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014). Já para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, basta realizar o esmagamento da cana em moendas para obter o caldo de fermentação, que já possui os açúcares (sacarose, glicose e frutose) liberados. Embora se possa fazer a fermentação com o caldo bruto, é comum realizar um processo de clarificação por meio de aquecimento, decantação e filtração antes de iniciar a fermentação (LIMA et al., 2001). Durante a fermentação os açúcares são convertidos em etanol e CO₂. O líquido de fermentação é então destilado para que ocorra a separação e purificação do etanol (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014).

3.3 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A utilização de milho e cana-de-açúcar para produção de etanol tem sido questionada por serem fontes alimentares. Diante disso, a biomassa lignocelulósica tem sido considerada como a matéria-prima ideal para produção de biocombustíveis, já que não compete com recursos alimentares, pois pode ser obtido a partir de resíduos, não sendo necessário ampliar áreas produtivas para aumentar a produção. Os materiais lignocelulósicos, como os apresentados na Tabela 1, são ricos em polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares fermentáveis e conseqüentemente convertidos à biocombustíveis (NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016). Além disso, a biomassa lignocelulósica está disponível em abundância, são renováveis e ainda contribuem positivamente na redução das emissões de dióxido de carbono (SARKAR et al., 2012).

O etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos é chamado de etanol de segunda geração. Ele é resultante da desagregação de açúcares complexos, como os polissacarídeos, em açúcares simples para posterior fermentação e destilação, por meio de um complexo processo biotecnológico envolvendo pré-tratamento e hidrólise (RAELE et al., 2014).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa com maior potencial para ser utilizada como matéria-prima para produção de etanol de segunda geração, já que cada tonelada de cana-de-açúcar triturada produz cerca de 250 kg de bagaço (RABELO; FILHO; COSTA, 2013). Somente o Centro-Sul do Brasil processou aproximadamente 135 milhões de toneladas de cana-de-açúcar até início de junho de 2018 (UNICA, 2018).

Tabela 1. Fontes de biomassa lignocelulósica utilizadas para produção de etanol de segunda geração.

Fonte de biomassa lignocelulósica	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Canabarro et al. (2017); Dias et al. (2012a); Dias et al. (2012b); Jonker et al. (2016); Rabelo, Filho e Costa (2013); Reis et al. (2016)
Palha de milho	Soam et al. (2016)
Palha de trigo	Saha et al. (2015)
Sorgo	Barcelos et al. (2016); Deesuth, Laopaiboon e Laopaiboon (2016); Guigou et al. (2011)
Cevada	García-Aparicio et al. (2011)
Palha e casca de arroz	Soam et al. (2016)
Resíduos de frutas e legumes	Aramrueang, Zicari e Zhang (2017); Kamoldeen et al. (2017)
Resíduos florestais	Parsons, McManus e Taylor (2018)
Resíduos de sorgo doce	Reis et al. (2016)
Capim elefante	Montipó et al. (2017)

Fonte: a autora.

3.3.1 Composição básica da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes (BALAT, 2011; NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016; SZCZERBOWSKI et al., 2014). A proporção desses constituintes varia com a espécie lignocelulósica (Tabela 2), o bagaço da cana-de-açúcar, por exemplo, é constituído por 30-60% de celulose, 20-40% de hemicelulose e 15-25% de lignina (BALAT, 2011).

Tabela 2. Composição de alguns materiais lignocelulósicos relatados na literatura.

Fonte de biomassa	Principais componentes (%)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Palha de trigo	34-45	20-30	8-15	Saha et al. (2015)
Palha de canola	42,39	16,41	14,15	Adapa, Tabil e Schoenau (2009)
Palha de cevada	33,25	20,36	16,41	Adapa, Tabil e Schoenau (2009)
Palha de aveia	37,60	23,34	12,85	Adapa, Tabil e Schoenau (2009)
Palha de mostarda	33,40	14,68	18,38	Pronyk e Mazza (2012)

Fonte: a autora.

A celulose, principal constituinte dos materiais lignocelulósicos, é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose. Quimicamente, a molécula da celulose é formada por anéis de β -D-glicopiranosose (glicose) unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas (ADITIYA et al., 2016). Na celulose as moléculas de glicose são unidas por forças de Van der Waals e por ligações de hidrogênio na estrutura cristalina. Essa região apresenta maior nível de ordenamento e tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (RABELO, 2010). Intercaladas às estruturas cristalinas estão as regiões amorfas, que são menos ordenadas e apresentam maior grau de flexibilidade (BALAT, 2011). Este alto nível de ordenamento caracteriza a recalcitrância da matriz de celulose para conversão por meios biológicos (SILVEIRA et al., 2015). A partir da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com terminais redutores e não redutores que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se em celobiose e glicose (RABELO, 2010).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos que podem conter diferentes unidades de açúcares ramificadas, como pentoses (xilose e anarabiose), hexose (glicose, manose e galactose), ácidos hexourônicos (β -D-glucurônico, α -D-4-O-metilglucurônico e α -D-galacturônico) e desoxi-hexoses (α -L-rammose e α -L-fucose) em sua composição. A hemicelulose é mais facilmente hidrolisada pela ação microbiana (enzimas), se comparada com a celulose, devido sua estrutura ramificada e totalmente amorfa (BALAT, 2011; NEVES;

PITARELO; RAMOS, 2016; RABELO, 2010). Porém, devido sua heterogeneidade, uma grande variedade de enzimas devem ser utilizadas para hidrólise completa em açúcares solúveis (SILVEIRA et al., 2015).

A celulose e a hemicelulose, portanto, são polissacarídeos que podem ser convertidos a açúcares fermentescíveis e fermentados a etanol (BALAT, 2011).

Diferentemente da celulose e da hemicelulose, a lignina não pode ser utilizada para produção de etanol, porém sua natureza química é um fator-chave na eficiência da hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos (SILVEIRA et al., 2015). Esse componente é um material polifenólico complexo composto por monômeros, como o p-cumaril, álcool sinapílico e coniferílico. A lignina é a substância que confere rigidez à parede celular, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Além disso, é um componente resistente à degradação química e biológica (NEVES; PITARELO; RAMOS, 2016; RABELO, 2010).

3.3.2 Processo de produção de etanol de segunda geração

3.3.2.1 Pré-tratamento e formação de inibidores

Devido à alta associação dos componentes da biomassa lignocelulósica, é necessário fazer um pré-tratamento a fim de desestruturar a organização da parede celular da planta e facilitar o acesso microbiano aos polissacarídeos que devem ser convertidos em açúcares fermentescíveis (SILVERA et al., 2015).

A escolha do tipo de pré-tratamento depende das propriedades do material lignocelulósico. Porém, um bom pré-tratamento também deve minimizar a geração de compostos inibitórios para a hidrólise enzimática e fermentação e evitar perdas das frações de açúcares (SILVEIRA et al., 2015). Se o pré-tratamento não for suficientemente eficiente, o produto resultante não é facilmente hidrolisável pela enzima celulase e pode conter compostos tóxicos em concentrações que inibem o metabolismo microbiano (BALAT, 2011). Por este motivo, essa etapa é considerada como um passo chave para a produção eficiente de etanol de segunda geração (SILVEIRA et al., 2015).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos, como os pré-tratamentos físicos (moagem e pirólise), químicos (pré-tratamento ácido, alcalino, utilização ácido diluído, agentes oxidantes, solventes e ozônio), físico-químico (explosão a vapor e explosão de fibra de amônia) e pré-

tratamentos biológicos, utilizando microrganismos como fungos, são usados para degradar a lignina e solubilizar a hemicelulose (BALAT, 2011).

Dentre esses métodos, a explosão a vapor é o método mais utilizado para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. A biomassa lignocelulósica, nesse caso, é tratada com alta pressão de vapor saturado, e em seguida, o sistema é submetido a uma depressurização repentina, o que leva a biomassa sofrer uma decomposição explosiva (BALAT, 2011).

Dois fatores principais influenciam a eficiência do pré-tratamento por explosão a vapor: um deles é o tempo de retenção e o outro é a pressão. O alto tempo de retenção está relacionado com a formação de compostos inibitórios, devido a hidrólise completa da fração hemicelulósica. Isso porque o aumento do tempo de retenção pode levar os mono e oligossacarídeos a sofrerem reações adicionais, como desidratação, fragmentação e condensação, que geram uma variedade de produtos como o furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácidos e compostos aromáticos, que são compostos inibitórios de fermentação (JACQUET et al., 2015). A liberação dos compostos furânicos, como o hidroximetilfurfural (HMF) e furfural ocorre devido a desidratação das hexoses e pentoses, respectivamente (AZHAR et al., 2017). A formação do ácido acético se deve a hidrólise dos grupos acetil presentes na hemicelulose (ADITIYA et al., 2016). A pressão, por sua vez, tem impacto sobre a hidrólise da celulose e na cinética de produção de produtos de degradação. Além disso, a diferença de pressão entre a pressão do sistema e a pressão atmosférica é proporcional à intensidade das forças de cisalhamento aplicáveis a biomassa lignocelulósica durante a explosão (JACQUET et al., 2015).

Em comparação com outros métodos, a explosão a vapor, é considerada a opção mais econômica para resíduos de madeira e agrícolas. Esse pré-tratamento promove a cristalização das partes amorfas, assim aumenta a cristalinidade da celulose, promove a hidrólise da hemicelulose mais facilmente, oferece a recuperação completa de açúcares e ainda há evidências de que promove a deslignificação (BALAT, 2011).

3.3.2.2 Hidrólise

O processo de hidrólise envolve a despolimerização da celulose à glicose, que é utilizada na fermentação alcoólica juntamente com os açúcares liberados durante a etapa de pré-tratamento devido a hidrólise de hemicelulose (MUPONDWA et al., 2017).

Vários métodos para a hidrólise de materiais lignocelulósicos são descritos na literatura. Dentre eles, os comumente aplicados podem ser classificados em dois grupos: hidrólise química (ácido concentrado e diluído) e hidrólise enzimática (BALAT, 2011).

Na hidrólise química, o material lignocelulósico é exposto a uma substância química, geralmente ácidos, durante um período de tempo e uma temperatura específica, o que resulta na degradação da celulose e hemicelulose em monômeros e polímeros. Esse método permite que o pré-tratamento e a hidrólise sejam realizados como uma única etapa (BALAT, 2011).

A hidrólise enzimática envolve o uso de enzimas (celulases e hemicelulases) para hidrolisar o material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis (MUPONDWA et al., 2017). Nesse caso, a celulose é hidrolisada através da ação da enzima celulase através de reações sinérgicas envolvendo endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celulose em celobiose solúvel ou glicose. A hidrólise da estrutura hemicelulósica é complexa e envolve um sistema multi-enzimático incluindo endoxilanase, exoxilanase, β -xilanase, α -arabinofuranosidase, α -glucoronidase, acetil xilana esterase e ácido ferúlico esterase, que são enzimas específicas. A hemicelulose é mais facilmente hidrolisável, se comparada com a celulose, devido sua propriedade amorfa. Dentre os produtos da hidrólise da hemicelulose destaca-se a xilose, galactose, manose e xiloligossacarídeos (ADITIYA et al., 2016; BALAT, 2011).

A hidrólise enzimática é considerada inviável para utilização a nível comercial devido ao alto custo das enzimas. No entanto, em comparação com a hidrólise ácida as enzimas funcionam em um ambiente ameno (pH 4,8; temperatura de 318-323 K e não tem problema com corrosão), assim os custos operacionais e de manutenção de equipamentos são menores. O problema da hidrólise ácida é a capacidade do ácido degradar gradualmente os monômeros de açúcares, o que não é desejável porque isso leva a formação de compostos inibitórios, além da redução da concentração de açúcares, o que afeta negativamente na produção de etanol (ADITIYA et al., 2016; BALAT, 2011).

3.3.2.3 Processo de fermentação

O etanol pode ser produzido a partir de três processos que são a hidrólise e fermentação separadas (SHF), a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF). Tanto o processo de SSF e SSCF são preferidos, se comparados com o SHF, porque a operação pode ser realizada no mesmo tanque, os custos são menores e o rendimento de etanol é maior. Porém, o processo de SSF

com materiais lignocelulósicos é difícil porque os resíduos lignocelulósicos permanecem no meio de fermentação e o uso de células microbianas livres reduz a concentração celular, o que resulta em menor produção de etanol (AZHAR et al., 2017).

A separação da hidrólise e da fermentação, permite que se utilize condições mais brandas (altas temperaturas) no processo de hidrólise para um melhor desempenho na liberação de açúcares, enquanto no processo de fermentação pode ser operado em condições de temperatura mais moderada para otimizar a utilização de açúcar (AZHAR et al., 2017). Isso significa que cada etapa pode ser realizada em condições ótimas de operação, especialmente temperatura e pH (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

O sobrenadante da hidrólise do material lignocelulósico pode conter hexoses e pentoses. Em geral, os hidrolisados são compostos de glicose, xilose, arabinose, celobiose, galactose, fucose, manose e ramnose (BALAT, 2011).

O processo de fermentação para a conversão desses açúcares liberados no hidrolisado em etanol e subprodutos por meio de microrganismos (MUPONDWA et al., 2017). A *Tabela 3* mostra alguns microrganismos que são utilizados para produção de etanol de segunda geração.

Tradicionalmente, a *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* são os microrganismos mais utilizados para a produção de etanol. Eles são capazes de fermentar glicose em etanol eficientemente, porém não são capazes de fermentar xilose, segundo açúcar mais abundante em hidrolisados derivados de materiais lignocelulósicos (BALAT, 2011).

Alguns microrganismos selvagens, como a *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, e *Candida parapsilosis* foram apontados como consumidores de xilose. Eles metabolizam a xilose através da ação da xilose redutase (XR) para converter a xilose em xilitol e da xilitol desidrogenase (XDH) para converter xilitol em xilulose (KATAHIRA et al., 2006).

Porém, a fermentação de pentoses ainda tem rendimentos muito menores do que a hexose, revelando assim um espaço para novas investigações para aumentar a produtividade de etanol de segunda geração (NETO; GUIMARÃES; FREIRE, 2018).

Vários fatores influenciam o processo de fermentação e produção de etanol, como a temperatura, concentração de substrato, pH, tempo de fermentação, agitação e quantidade de inóculo. A temperatura, por exemplo, afeta diretamente a taxa de crescimento microbiano. Temperaturas variando de 20 a 35 °C são consideradas ideias para microrganismos produtores de etanol. Altas concentrações de substrato no meio pode levar a inibição celular por excesso de substrato e afetar a produção de etanol. O pH do caldo de fermentação também afeta a produção de etanol, uma vez que influencia o crescimento da levedura, a taxa de fermentação

e formação de subprodutos. A permeabilidade de nutrientes na célula são influenciados pela concentração de H^+ no caldo de fermentação (AZHAR et al., 2017). A faixa ótima de pH para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é de 4,0 a 5,0, sendo que pH superiores a 5,0 levam à redução na produção de etanol (LIN et al., 2012). Porém, isso varia com o microrganismo utilizado no processo de fermentação. Fermentações conduzidas com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, tem mostrado que o aumento pH do caldo de fermentação para 6,50 melhorou a produção de etanol (DÚSSAN et al., 2016).

Tabela 3. Microrganismos descritos na literatura para a produção de etanol de segunda geração.

Microrganismo	Tipo	Referência
<i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2	Levedura	Antunes et al. (2017)
<i>Pichia stipitis</i>	Levedura	Wang et al. (2017)
<i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	Levedura	Dússan et al. (2016); Gutiérrez-Rivera et al. (2015); Hilares et al. (2018)
<i>Escherichia coli</i> LY180	Bactéria	Geddes, Shanmugam e Ingram (2015)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Bactéria	Hunter e Manter (2014)
<i>Aspergillus niger</i> ADH-11	Fungo	Patel, Chapla e Shah (2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM 3521	Levedura	Patel, Chapla e Shah (2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura	Casey et al., (2010); Geng, Zhang e Shi (2017); Giannattasio et al.(2013); Rabelo et al.(2014); Swinnen et al. (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01	Levedura	Gutiérrez-Rivera et al. (2015)
<i>Pichia stipitis</i> JCM 10742	Levedura	Sritrakul, Nitisinprasert e Keawsompong (2018)
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Fungo	Zhang et al. (2010)
<i>Wickerhamomyces</i> sp. UFFS-CE-3.1.2	Levedura	Bazoti et al.(2017)

Fonte: a autora.

4 METODOLOGIA

4.1 HIDROLISADO

O hidrolisado celulósico, utilizado como substrato no processo de fermentação alcoólica, foi gentilmente doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), localizado em São Paulo, Brasil. O caldo foi obtido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por meio de explosão a vapor, seguido de hidrólise enzimática pela enzima Cellic CTec3 (Novozymes).

4.2 MICRORGANISMO

A levedura, UFFS-CE-3.1.2, utilizada nesse trabalho, foi recentemente isolada do ecossistema Brasileiro (Parque Nacional de Chapecó e Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó) e foi identificada por Bazoti et al. (2017) como uma nova espécie de *Wickerhamomyces* (número de acesso GenBank MF538579 e MF538580).

4.3 PREPARO DO INÓCULO

O preparo do inóculo e o repique das leveduras foi realizado em meio extrato de levedura dextrose (YPD), composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar-ágar. O repique ocorreu em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio YPD sólido e o crescimento ocorreu por 72 horas em estufa bacteriológica a 30 °C. Após, a estirpe foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio YPD líquido e mantida em estufa bacteriológica por 24 horas a 30 °C. Posteriormente, esses 10 mL de YPD líquido foram transferidos para um frasco erlenmeyer contendo 90 mL YPD, que foi mantido em agitador orbital por 24 horas, a 30 °C e 120 RPM. Decorridas 24 horas, o inóculo foi vertido no vaso de fermentação do biorreator por meio de frasco específico.

Todos os materiais utilizados no preparo do inóculo foram previamente esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm por 15 min.

4.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BIORREATOR

As fermentações foram conduzidas em biorreator (BIO-TEC, Tecnal) com adição de 3 L de hidrolisado diluído 1:3 (v/v) com água ultrapura, condição otimizada por Bazoti et al. (2017) e adição de 10% (v/v) de inóculo da levedura UFFS-CE-3.1.2, após a esterilização do biorreator em autoclave a 120 °C e 1 atm, por 40 min. A Figura 1 mostra a configuração experimental.

Foram avaliadas condições de fermentação sem ajuste de pH do hidrolisado e com pH continuamente controlado em $7,00 \pm 0,10$, utilizando o sistema de controle de pH do biorreator, com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 3 mol/L e ácido clorídrico (HCl) 1 mol/L.

As fermentações foram mantidas em condições anaeróbias, agitação de 80 RPM e temperatura de 30 °C.

As medições da concentração de oxigênio dissolvido no meio foram realizadas através do sensor de oxigênio dissolvido acoplado no biorreator e mostraram que a condição anaeróbia foi obtida dentro de 40 minutos do início da fermentação.

O meio de fermentação foi amostrado a cada 24 horas e o crescimento da levedura, determinada pelo método gravimétrico, foi avaliado somente ao final da fermentação.

Figura 1. Configuração experimental para produção de etanol de segunda geração.



Fonte: a autora.

4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

O hidrolisado, substrato utilizado na fermentação, foi caracterizado em relação a quantidade de carboidratos (glicose, xilose, celobiose e arabinose) e inibidores (HMF, furfural e ácido acético) existentes. Além desses componentes, durante a fermentação, foi monitorado também a concentração de etanol.

As concentrações de glicose, xilose, celobiose, arabinose, ácido acético e etanol foram determinadas por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando um cromatógrafo (Shimadzu), equipado com detector RID-10 A, operado com coluna AMINEX[®] BIORAD HPX87H. Amostras de 20 µL foram quantificadas a 45 °C, com 0,005 M de H₂SO₄ como eluente e taxa de fluxo de 0,6 mL/min. Antes disso, as amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro de 45 µm de acetato de celulose (BAZOTI et al., 2017).

A quantificação dos compostos furfural e HMF foi realizada por HPLC equipado com detector PDA, operado com coluna C18 utilizando como eluente acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1 % (em relação ao volume de acetonitrila e água) de ácido acético (Glacial PA, teor mínimo 99,7%) a temperatura de 30 °C, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 0,8 mL/min. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro de 45 µm de politetrafluoretileno (PTFE) (BAZOTI et al., 2017).

Antes das análises por HPLC, o eluente foi filtrado a vácuo com membrana de 0,45 µm Millipore[®] e degaseificado em banho de ultrassom por 15 minutos, e as amostras foram pré-filtradas e diluídas apropriadamente. A concentração dos compostos foi determinada usando curvas de calibração para cada composto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE COMPOSICIONAL DO HIDROLISADO

O hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, utilizado como substrato no processo de fermentação, apresentou 53,17 g/L de glicose, 49,40 g/L de xilose, 6,57 g/L de celobiose, 1,14 g/L de arabinose e pH inicial variando entre 4,84 – 5,00. Esses resultados são similares aos apresentados na literatura, quando o hidrolisado é obtido através do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por meio da explosão a vapor, seguido de hidrólise enzimática, processo semelhante realizado para obtenção do hidrolisado utilizado nesse estudo (ANDRADE et al., 2017).

Além das concentrações de açúcares, foram identificadas, no hidrolisado, concentrações de produtos inibidores de fermentação como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que apresentaram concentração de 0,42 g/L e 0,19 g/L, respectivamente, o que não influencia significativamente na fermentação dependendo do microrganismo utilizado (TOQUERO; BOLADO, 2014; WANG et al., 2016). Por outro lado, foi detectado 10,78 g/L de ácido acético, quantidade que pode diminuir a eficiência do processo de fermentação e inibir o metabolismo das leveduras, dependendo da linhagem da levedura utilizada (BELLIDO et al., 2011). Diáz et al. (2009), por exemplo, verificaram que o ácido acético, mesmo na concentração mais baixa testada (3 g/L), provocou inibição completa da *Pichia stipitis*, quando utilizado em conjunto com furfural ou ácido fórmico.

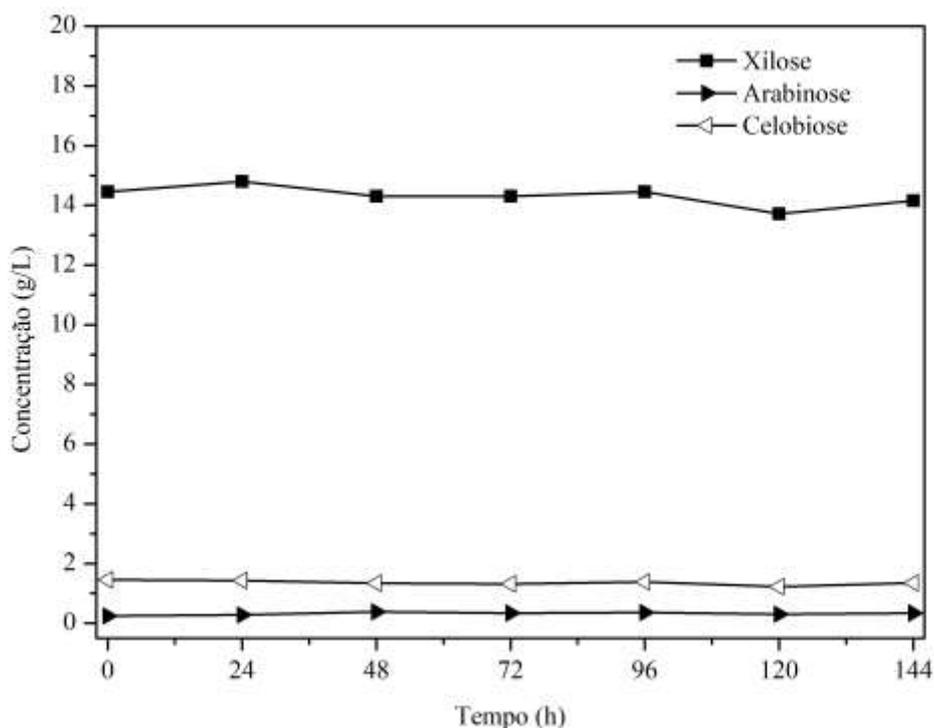
5.2 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO SEM CONTROLE DE pH

A partir dos resultados da fermentação, foi possível avaliar a produção de etanol e consumo dos componentes do substrato, das condições de fermentação propostas por Bazoti et al. (2017), em biorreator. Salienta-se que os compostos de fermentação foram quantificados após esterilização do biorreator e hidrolisado, fator que pode ter levado a degradação de alguns compostos presentes no hidrolisado. Foi verificado que a glicose é a fonte preferencial de carbono da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 em fermentações conduzidas em pH variando entre 4,84 e 4,98, já que decorridas 72 horas de fermentação, esse açúcar estava completamente esgotado (Figura 3), enquanto açúcares como a xilose, arabinose e celobiose permaneceram inutilizadas no caldo de fermentação (Figura 2), o que também foi observado por Patel, Chapla e Shah (2017). Casey et al. (2010) verificaram que as taxas de

consumo de xilose foram afetadas pela presença do ácido acético em concentrações de 3 g/L, o que também pode ter ocorrido neste estudo devido à presença do ácido acético no hidrolisado. Porém, por se tratar de um hidrolisado industrial outros carboidratos, que não foram analisados nesse trabalho, podem estar presentes.

Há poucos relatos sobre a produção de etanol usando a levedura UFFS-CE-3.1.2, já que esse microrganismo foi recentemente isolado do ecossistema brasileiro. Porém, a concentração de etanol de 8,35 g/L obtida após 96 horas de fermentação (Figura 3), representa uma produção promissora, em comparação com outras leveduras. Por exemplo, Antunes et al. (2017) alcançaram $5,57 \pm 0,71$ g/L de etanol utilizando a levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em uma fermentação conduzida em reator de leito fluidizado. Já Dússan et al. (2016) produziram 1,2 g/L de etanol a partir da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 com hidrolisado bagaço de cana-de-açúcar em pH inicial de 4,50 e 2,62 g/L de ácido acético, após 72 horas de fermentação em biorreator descontínuo.

Figura 2. Comportamento da xilose, celobiose e arabinose durante a fermentação sem ajuste de pH.

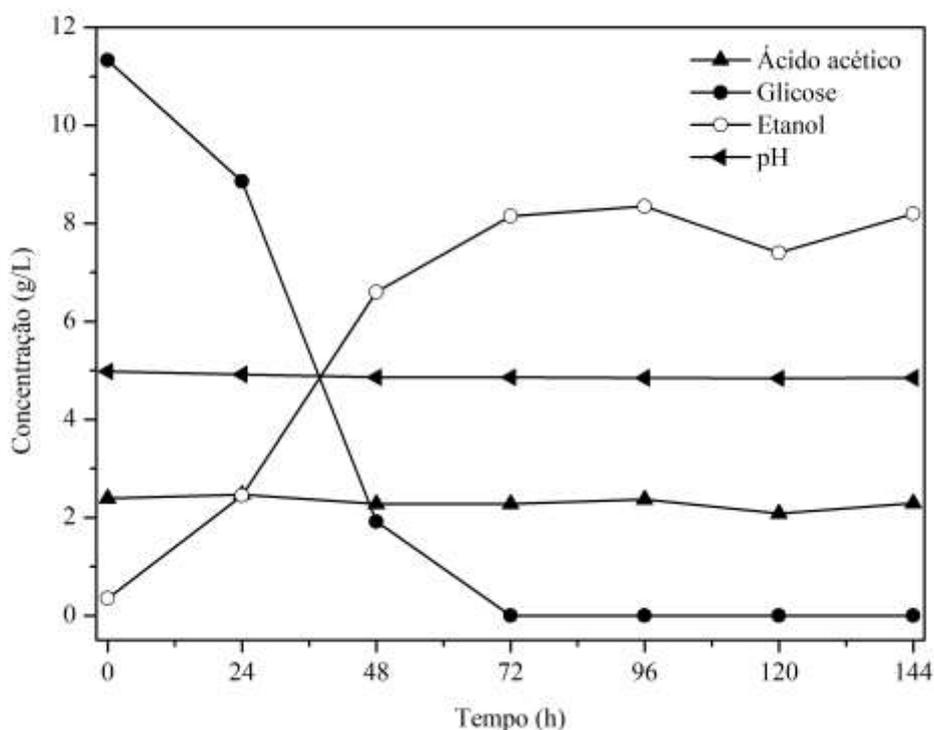


Fonte: a autora.

Em relação aos compostos inibitórios, o ácido acético manteve valores constantes e as concentrações de furfural e HMF diminuíram desde o início da fermentação, sendo que o HMF foi totalmente degradado em 72 horas de fermentação e a concentração do furfural ficou abaixo do limite de detecção do equipamento decorridas 24 horas de fermentação (Tabela 4).

Esses resultados, corroboram com estudos realizados por outros autores, utilizando diferentes microrganismos. Matos et al. (2016) verificaram uma degradação total do furfural em 96 horas de fermentação por *Geotrichum* sp. KP276644. A partir da caracterização dos produtos da degradação do furfural, os autores observaram que os microrganismos converteram o furfural em ácido furóico ou álcool furfurílico, o que também foi observado no estudo realizado por Hunter e Manter (2014), ao analisarem os produtos que se acumularam durante a degradação do furfural pelas estirpes de *L. mesenteroides* e *L. pseudomesenteroides*. Zhang et al. (2010) observaram que tanto o furfural quanto o HMF foram completamente degradados na fermentação conduzida por *Amorphotheca resinae* ZN1.

Figura 3. Consumo de glicose, comportamento do ácido acético, pH e produção de etanol na fermentação sem ajuste de pH.



Fonte: a autora.

Tabela 4. Comportamento dos inibidores (furfural e HMF) durante a fermentação sem ajuste de pH.

Tempo (horas)	HMF(g/L)	Furfural (g/L)
0	0.04	0.09
24	0.01	*
48	0.01	*
72	0.00	*
96	*	*
120	*	*

* Abaixo do limite de detecção do equipamento

Fonte: a autora.

Essas respostas também foram obtidas por Bazoti et al. (2017) ao produzir etanol, com as mesmas condições deste trabalho, a partir da fermentação conduzida em erlenmeyer com volume total de 100 mL. Este é um resultado desejável, porque as respostas obtidas durante a produção de etanol em erlenmeyer (100 mL) foram repetidas na produção em biorreator (3 L), indicando a possibilidade da ampliação de escala da produção de etanol, utilizando a levedura UFFS-CE-3.1.2 na fermentação de hidrolisados com presença de inibidores de fermentação (HMF, furfural e ácido acético).

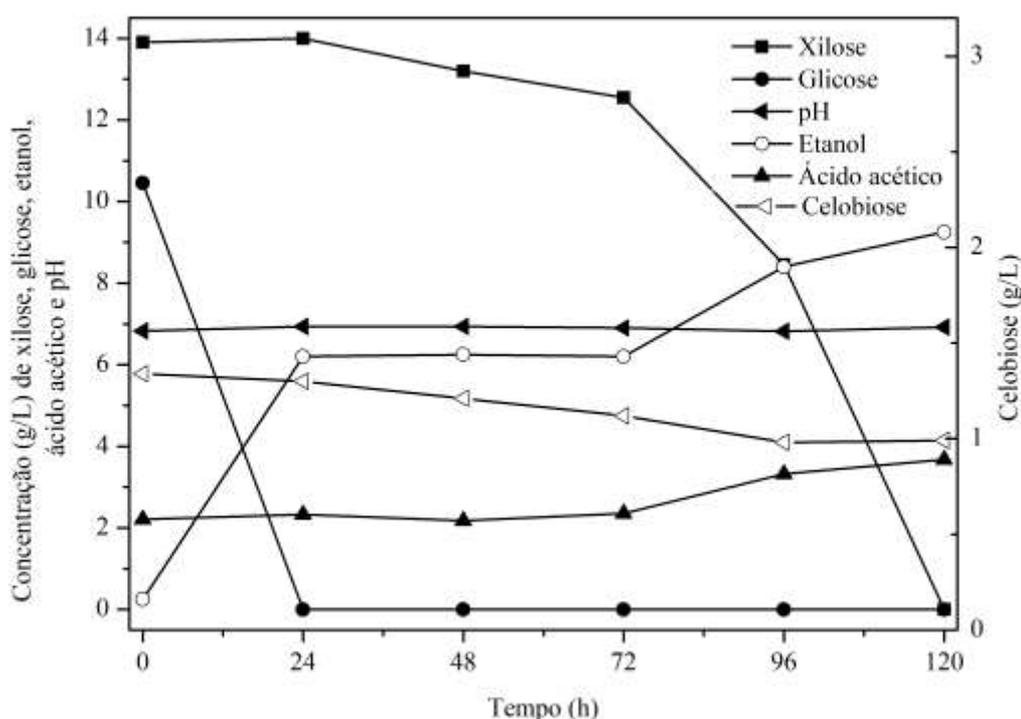
5.3 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO COM CONTROLE DE pH

Dússan et al. (2016) investigaram a fermentação de hidrolisados de bagaço, por *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Scheffersomyces shehatae* UFMG HM 52.2, utilizando diferentes condições de pH (4,50; 5,50 e 6,50) em biorreator e obtiveram produções de etanol superiores (até 15 g/L) nas fermentações com pH ajustado em 6,50, se comparado com fermentações conduzidas em pH 4,50 (até 2,5 g/L). Diante disso, optou-se por realizar uma fermentação com pH do hidrolisado ajustado em 7,00, buscando avaliar a influência do pH na produção de etanol de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, a partir da levedura UFFS-CE-3.1.2.

A fermentação conduzida em pH controlado em $7,00 \pm 0,10$, favoreceu o consumo da xilose pela levedura UFFS-CE-3.1.2, que foi acessada assim que ocorreu um esgotamento da glicose, após 24 horas de fermentação, e foi totalmente consumida decorridas 120 horas de fermentação. Essa fermentação levou a uma produção de etanol de 9,25 g/L, em 120 horas de fermentação (Figura 4).

Estudos anteriores tem mostrado que na presença do ácido acético, a elevação do pH aumenta as taxas de consumo de xilose e glicose, isso porque o efeito inibitório do ácido acético nas taxas de consumo da glicose diminuiu com o aumento do pH (CASEY et al., 2010). Esses autores, verificaram que a taxa de consumo de glicose em fermentação com 7,5 g/L de ácido acético em pH 5 foi cerca da metade, em comparação quando o pH foi aumentado para 6. Fato que justifica o consumo imediato (em 24 horas de fermentação) da glicose na fermentação conduzida em pH 7,00 e o consumo mais lento dessa hexose na fermentação sem pH ajustado.

Figura 4. Consumo de glicose, xilose e celobiose, comportamento do ácido acético, pH e produção de etanol na fermentação com pH controlado em 7,00.



Fonte: a autora.

Com 3,0 g/L de ácido acético, Bellissimi et al. (2009) verificaram que um decréscimo no pH pode inibir significativamente o consumo de xilose. Mais recentemente, Palmqvist e Lidén (2014) demonstraram haver um ganho no consumo de xilose simplesmente aumentando o pH de 5 para 5,5, na presença de 4 g/L de ácido acético. Essa mesma pequena diferença de pH também foi suficiente para demonstrar expressiva diferença no consumo de xilose nos experimentos conduzidos por Sato et al. (2014).

Casey et al. (2010) demonstram que isso ocorre porque o efeito inibidor é decorrente do ácido acético na sua forma indissociada, e não devido a sua base conjugada (acetato).

Por ser uma molécula lipossolúvel, o ácido acético, na sua forma indissociada, difunde-se através da membrana plasmática para o interior da célula. No citosol, os valores de pH mais elevados que no meio externo propiciam a dissociação de espécies do ácido da sua forma molecular para a forma iônica, liberando prótons que provocam a diminuição do pH citosólico, conseqüentemente, podendo trazer danos à célula, causados pela acidificação do citoplasma, que mais tarde serão refletidos diretamente no rendimento da produção de etanol (CASEY et al., 2010; JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Para contornar a acidificação do pH citosólico, ocasionada pela dissociação do ácido no interior da célula, duas proteínas presentes na célula são essenciais: ATPases da membrana plasmática (PM-ATPase) e ATPases vacuolares (V-ATPase), responsáveis por retirar H^+ do citoplasma ao custo da hidrólise de ATP (CASEY et al., 2010; GENG; ZHANG; SHI, 2017). Conseqüentemente, menos moléculas de ATP estarão disponíveis para a formação de biomassa, resultando em menos células aptas a fermentarem, reduzindo assim a produtividade de etanol. Concentrações muito altas de H^+ no interior da célula acabam gerando demandas muito elevadas de ATP o que impossibilita o combate da acidificação do pH citosólico e gera danos celulares subsequentes, incluindo perturbação do gradiente eletroquímico, diminuição da síntese de DNA e RNA e até morte celular programada (GIANNATTASIO et al., 2013; LUDOVICO et al., 2001).

Além dos efeitos nocivos da alteração de pH intracelular (como descrito acima), um excesso de acetato (a base conjugada) também pode interferir negativamente no metabolismo celular, inibindo a atividade da enzima enolase na via glicolítica, aumentando a pressão de turgor e gerando estresse oxidativo (BELLISSIMI et al., 2009; SWINNEN et al., 2014). Com o aumento do pH, ocorre a dissociação dos ácidos fracos, o que leva a diminuição da concentração da forma indissociada do ácido e eleva a concentração da base conjugada. Teoricamente, a toxicidade provocada pelo ácido acético é maior em pH mais baixo, quando o número de moléculas indissociadas é maior, do que em pH alto (HENTGES, 1967). Sendo assim, isso pode explicar o consumo de xilose na fermentação com ajuste de pH, haja vista a presença de ácido acético no meio de fermentação.

A celobiose e arabinose, também foram degradadas na fermentação com ajuste de pH (Figura 4). A celobiose que apresentou concentração inicial de 1,34 g/L, teve sua concentração diminuída para 0,99 g/L, após 120 horas de fermentação e a arabinose teve sua

concentração reduzida de 0,22 g/L, no início da fermentação, para 0,13 g/L, decorridas 120 horas de fermentação. Zhang et al. (2010) também verificaram o consumo de arabinose em fermentação com *Amorphotheca resinae* ZN1. Mais recentemente, Matos et al. (2016) relataram consumo de 92,55% de arabinose em fermentação conduzida por *Geotrichum* sp. KP276644.

A conversão de celobiose a etanol foi observado recentemente por Wu et al. (2018) ao utilizar uma enzima recombinante (BcBgl1A) derivada de um gene de β -glicosidase de *Bacillus cellulosilyticus* expresso em *Escherichia coli* BL21. A busca por microrganismos consumidores de celobiose não é recente, Guo et al. (2011) desenvolveram uma cepa recombinante para consumir celobiose, que utilizou 5,2 g/L de celobiose e produziu 2,3 g/L de etanol, em 48 horas de fermentação. Porém, o uso de cepas geneticamente modificadas eleva o custo operacional, o que pode ser um fator limitante na produção de etanol de segunda geração. Assim, o uso da levedura UFFS-CE-3.1.2 para conversão de celobiose em etanol, a partir de um hidrolisado com pH ajustado, é uma alternativa viável economicamente.

O HMF e o furfural, que apresentaram uma concentração inicial de 0,03 e 0,04 g/L, respectivamente, foram totalmente degradados após 24 horas de fermentação, comportamento semelhante foi verificado na fermentação sem ajuste de pH.

Já o ácido acético, que apresentou concentração inicial de 2,21 g/L teve sua concentração elevada para 3.68 g/L, após 120 horas de fermentação (Figura 4).

6 CONCLUSÃO

O aumento de escala das condições de fermentação propostas por Bazoti et al. (2017) se mostrou eficiente, já que os resultados obtidos na fermentação conduzida em erlenmeyer, com volume total de 100 mL, foram repetidos na fermentação conduzida em biorreator com volume de trabalho de 3 L.

A fermentação pela levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 conduzida com pH controlado em 7,00, mostrou o consumo da pentose xilose, além da glicose, levando a uma produção de etanol maior (9,25 g/L) se comparado com fermentação sem ajuste de pH (8,35 g/L), o que é equivalente a um aumento na produção de etanol de 10%. Fermentações de pentoses apresentam, em geral, rendimento mais baixos, justamente por não serem assimiladas por certos microrganismos. Portanto, este estudo mostra possibilidade para futuros ganhos na produção de etanol de segunda geração a nível comercial.

REFERÊNCIAS

- ADAPA, P.; TABIL, L.; SCHOENAU, G. Compaction characteristics of barley , canola , oat and wheat straw. **Biosystems Engineering**, v. 104, p. 335–344, 2009.
- ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol production : A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.
- ANDRADE, L. P. et al. Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 75–81, 2017.
- ANTUNES, F. A. F. et al. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. **Renewable Energy**, p. 6–13, 2017.
- ARAMRUEANG, N.; ZICARI, S. M.; ZHANG, R. Characterization and compositional analysis of agricultural crops and residues for ethanol production in California. **Biomass and Bioenergy**, v. 105, p. 288–297, 2017.
- AZHAR, M. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production : A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway : A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858–875, 2011.
- BARBOSA, L. C. A. **Introdução à química orgânica**. 2º edição. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2011
- BARCELOS, C. A. et al. Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 94, p. 46–56, 2016.
- BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582–587, 2017.
- BELLIDO, C. et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10868–10874, 2011.
- BELLISSIMI, E. et al. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 358–364, 2009.
- CANABARRO, N. I. et al. Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. **Renewable Energy**, v. 102, p. 12–17, 2017.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754–4766, 2010.
- CASEY, E. et al. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 385–393, 2010.
- DEESUTH, O.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. High ethanol production under optimal aeration conditions and yeast composition in a very high gravity fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 263–270, 2016.
- DIAS, M. O. S. et al. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, v. 43, p. 246–252, 2012a.

- DIAS, M. O. S. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 152–161, 2012b.
- DIÁZ, M. . et al. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 891–899, 2009.
- DÚSSAN, K. J. et al. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, v. 87, p. 703–710, 2016.
- FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 2010. 60 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.
- GARCÍA-APARICIO, M. P. et al. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**, v. 90, p. 1624–1630, 2011.
- GEDDES, R.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Combining treatments to improve the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysates by ethanologenic *Escherichia coli* LY180. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 15–22, 2015.
- GENG, P.; ZHANG, L.; SHI, G. Y. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 33, p. 1–8, 2017.
- GIANNATTASIO, S. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.
- GUIGOU, M. et al. Bioethanol production from sweet sorghum: Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 3058–3062, 2011.
- GUO, Z. et al. Development of an industrial ethanol-producing yeast strain for efficient utilization of cellobiose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 105–112, 2011.
- GUTIÉRREZ-RIVERA, B. et al. Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses “B” in a mixed yeast culture. **Renewable Energy**, v. 74, p. 399–405, 2015.
- HENTGES, D. J. Influence of pH on the Inhibitory Activity of Formic and Acetic Acids for *Shigella*. **Journal of bacteriology**, v. 93, n. 6, p. 2029–2030, 1967.
- HILARES, T. R. et al. A new approach for bioethanol production from sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation assisted-pretreatment and column reactors. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 43, p. 219–226, 2018.
- HUNTER, W. J.; MANTER, D. K. Pre-treatment step with *Leuconostoc mesenteroides* or *L. pseudomesenteroides* strains removes furfural from *Zymomonas mobilis* ethanolic fermentation broth. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 162–168, 2014.
- JACQUET, N. et al. Application of the steam explosion as pretreatment on the lignocellulosic material : a review. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, p. 1–21, 2015.
- JONKER, J. G. G. et al. Supply chain optimization of sugarcane first generation and eucalyptus second generation ethanol production in Brazil. **Applied Energy**, v. 173, p. 494–510, 2016.

- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose : inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 16, n. 6, p. 1–10, 2013.
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose : Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.
- KAMOLDEEN, A. A. et al. Enhanced ethanol production from mild alkali-treated oil-palm empty fruit bunches via co-fermentation of glucose and xylose. **Renewable Energy**, v. 107, p. 113–123, 2017.
- KATAHIRA, S. et al. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellobiosaccharide-assimilating yeast strain. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p. 1136–1143, 2006.
- KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361–375, 2004.
- LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 3–8, 2014.
- LIMA, U. A. et al. **Biocologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Volume III. São Paulo: Blücher, 2001.
- LIN, Y. et al. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 395–401, 2012.
- LOPES, M. L. et al. Biotechnology and Industry Microbiology Ethanol production in Brazil : a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47S, p. 64–76, 2016.
- LUDOVICO, P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**, v. 147, p. 2409–2415, 2001.
- MATOS, Í. et al. Xylitol production and furfural consumption by a wild type *Geotrichum* sp . **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 21–25, 2016.
- MONTIPÓ, S. et al. Integrated production of second generation ethanol and lactic acid from steam-exploded elephant grass Sheila. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1017–1024, 2017.
- MUPONDWA, E. et al. Status of Canada’s lignocellulosic ethanol : Part II : Hydrolysis and fermentation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1535–1555, 2017.
- NETO, A. C.; GUIMARÃES, M. J. O. .; FREIRE, E. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. **Journal of Cleaner Production journal**, v. 184, p. 168–178, 2018.
- NEVES, P. V; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion : Effect of extractives content , acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184–194, 2016.
- PALMQVIST, B.; LIDÉN, G. Combining the effects of process design and pH for improved xylose conversion in high solid ethanol production from *Arundo donax*. **AMB Express**, v. 41, n. 4, p. 1–9, 2014.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates . II : inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.

- PARSONS, S.; MCMANUS, M. C.; TAYLOR, C. M. Second-Generation Ethanol from Lignocellulose. In: **Greenhouse Gases Balance of Bioenergy Systems**. 1 st ed. Cambridge, Massachusetts, EUA: Academic Press, 2018. p. 193–206.
- PATEL, H.; CHAPLA, D.; SHAH, A. Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 109, p. 323–331, 2017.
- PRONYK, C.; MAZZA, G. Fractionation of triticale, wheat, barley, oats, canola, and mustard straws for the production of carbohydrates and lignins. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 117–124, 2012.
- RABELO, S. C. **Avaliação e otimização do pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2010.
- RABELO, S. C. et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment , enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 2014.
- RABELO, S. C.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 1696–1712, 2013.
- RAELE, R. et al. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 87, p. 205–223, 2014.
- REIS, A. L. S. et al. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 255–262, 2016.
- SAHA, B. C. et al. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 17–22, 2015.
- SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes : An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19–27, 2012.
- SATO, T. . et al. Harnessing Genetic Diversity in *Saccharomyces cerevisiae* for Fermentation of Xylose in Hydrolysates of Alkaline Hydrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 540–554, 2014.
- SILVEIRA, M. H. L. et al. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. **CHEMSUSCHEM Reviews**, v. 8, p. 3366–3390, 2015.
- SOAM, S. et al. Global warming potential and energy analysis of second generation ethanol production from rice straw in India. **Applied Energy**, v. 184, p. 353–364, 2016.
- SRITRAKUL, N.; NITISINPRASERT, S.; KEAWSOMPONG, S. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. **Agriculture and Natural Resources**, p. 6–13, 2018.
- SWINNEN, S. et al. The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 642–653, 2014.
- SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries : Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95–101, 2014.

TOQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw . Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 68–76, 2014.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Acompanhamento da quinzenal da safra na região Centro-Sul**: Posição até 01/06. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

VARMA, A. K.; MONDAL, P. Pyrolysis of sugarcane bagasse in semi batch reactor : Effects of process parameters on product yields and characterization of products. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 704–717, 2017.

WANG, M. et al. Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn , sugarcane and cellulosic biomass for US use. **Environmental Research Letters**, v. 7, p. 1–13, 2012.

WANG, S. et al. Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 250, n. 9, p. 1–11, 2016.

WANG, X. et al. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1059–1067, 2017.

WU, J. et al. Characterization of cold adapted and ethanol tolerant β -glucosidase from *Bacillus cellulolyticus* and its application for directed hydrolysis of cellobiose to ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 872–879, 2018.

ZHANG, J. et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 26, n. 3, p. 1–15, 2010.