



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL E BIOBUTANOL A PARTIR
DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

BRUNA PRATTO

SÃO CARLOS - SP

2019

BRUNA PRATTO

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL E BIOBUTANOL A PARTIR
DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz


Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr

SÃO CARLOS - SP

2019

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE BRUNA PRATTO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 18 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:



Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, UFSCar



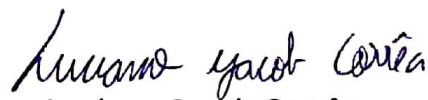
Alberto Colli Badino Júnior
UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
UFSCar



Marcel Otávio Cerri
UNESP



Luciano Jacob Corrêa
UFLA

*Dedico este trabalho ao meu bem mais precioso:
Meus pais, Edson e Elizete, e meus irmãos Isabella, Pedro e Matheus.*

Agradecimentos

Este trabalho não foi construído sozinho. Várias pessoas que cruzaram meu caminho ao longo desses 4 anos merecem um agradecimento especial.

Primeiramente agradeço a Deus, por jamais deixar de cuidar de mim, sempre me protegendo e guiando meus passos.

Ao meu alicerce, minha família! Eles, que independente de qualquer coisa, estão sempre por mim. Aquele amor incondicional que é só de vocês. Se estou onde estou hoje é porque vocês me proporcionaram uma boa educação e estudo. Obrigada pai e mãe! Meus irmãos queridos que tanto amo, obrigada por serem a melhor parte de mim.

Ao meu namorado Felipe, como você me ajudou neste doutorado hein!!! Apesar de não ter formação na mesma área, sempre esteve a par de tudo que acontecia nos meus experimentos, sugerindo mudanças quando os experimentos não iam bem, além das inúmeras vezes que me acompanhou nas amostras de final de semana e incansáveis leituras de artigos para melhorar o inglês. Obrigada pelo seu companheirismo e apoio constante na minha vida.

À Martha Santos Rocha, ou melhor, Martita. Minha amiga querida e companheira de laboratório!! Estar com você nessa jornada foi maravilhoso. Nossas trocas de ajudas no laboratório, conselhos, sugestões uma no trabalho da outra sempre foram essenciais para eu chegar até aqui. Mas, meu agradecimento especial é por ter tanta paciência em me ouvir e aguentar meu jeito ansioso e estressado hahaha! Sua amizade é um dos maiores presentes que eu ganhei no doutorado.

Aos meus orientadores, Professor Antonio e Professor Ruy, meu muito obrigada pela oportunidade de ser orientada de vocês desde o mestrado. Quero levar para a minha vida profissional todos os ensinamentos e experiências que vocês compartilharam.

Ao professor Sandip Bankar que desde o primeiro contato por e-mail foi muito atencioso e receptivo comigo. Obrigada por me receber tão bem na Finlândia e dar todo o suporte necessário durante o doutorado sanduíche.

Ao Professor Alberto Colli, por participar como banca avaliadora durante todas as etapas: exame de acompanhamento, qualificação e defesa. Muito obrigada por sua rica contribuição no meu trabalho!

Ao Gustavo Batista, colega do DEQ, obrigada por me ajudar nos experimentos finais!!

Às minhas companheiras de apartamento, Juu e Preta. Obrigada pelo companheirismo diário, conversas e inúmeras ajudas que me deram sempre que eu precisei!

Ao grupo “Fubazada”. Sem vocês, Alan, Ana Isabela, Edi, Juu, Laís e Preta, não teria tido os melhores momentos da minha vida em São Carlos. Desde um simples almoço de domingo até um simples TUSCA hahaha!

As “meninas da Bioquímica”: Cí, Lê e Martita. Vocês são maravilhosas, cada uma com seu jeitinho especial. Obrigada pela amizade sempre!

Aos amigos do grupo bioquímica DEQ, que sempre me ajudaram quando eu precisei. Obrigada em especial para Carlota, Cí, Juu, Letícia, Gilson, Martha, Murilo, Thiago, Valdemir e Vitor.

Ao técnico Amadeus, que sempre esteve disposto a me ajudar nas análises de HPLC.

A Capes e ao projeto temático FAPESP (Processo #2016/10636-8), pelo apoio financeiro nessa pesquisa.

A Agência Nacional Finlandesa de Educação (EDUFI fellowship) pelo apoio financeiro durante a realização do doutorado sanduíche.

Ao PPGEQ - UFSCar pela infraestrutura concedida para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho... meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Na presente tese foram estudadas as etapas de hidrólise e fermentação do processo de produção de bioetanol e biobutanol a partir da palha de cana-de-açúcar (fração celulósica) pré-tratada hidrotermicamente. Na etapa de hidrólise é de suma importância obter altas concentrações de glicose para uma produção viável de bioetanol. Por outro lado, o desafio está em encontrar um processo otimizado, atendendo a critérios por vezes conflitantes, como rendimento e produtividade. Desse modo, um método de otimização multi-critério foi aplicado a fim de se obter um equilíbrio entre rendimento e produtividade na produção de etanol de segunda geração, por meio de pré-sacarificação (PS) seguida de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Experimentos de PS foram realizados avaliando os efeitos da concentração de enzima e biomassa e tempo de PS. Após cada ensaio de PS, a etapa de SSF foi executada durante 24 h. O desempenho de todo o processo (PS + SSF) foi avaliado com base na eficiência e produtividade global em etanol. Sob condições otimizadas, operando em uma concentração elevada de biomassa (19,3 % m/v), foi possível obter uma concentração de etanol de 5,6 % v/v, o que corresponde a aproximadamente 290 L de etanol por tonelada de palha de cana pré-tratada, em um tempo de processamento total (hidrólise + fermentação) de 45 h. Ainda, na etapa de hidrólise enzimática, e como alternativa ao processo PS em batelada, estudou-se também a operação em batelada alimentada de substrato e enzima, com processamento de carga de substrato similar (21 % m/v). A estratégia de alimentação levou em consideração a alimentação do substrato e da enzima de forma que a concentração do substrato fosse mantida constante e a taxa de reação mantida igual ou superior a 70 % da velocidade inicial de reação de hidrólise. Com a determinação de um perfil ótimo de alimentação, foi possível atingir concentrações de glicose em torno de 160 g/L, que correspondeu a 80 % de conversão de celulose a glicose. Adicionalmente, verificou-se que a incompleta conversão está associada à adsorção não produtiva das enzimas, bem como a presença de celulose recalcitrante. Por fim, a tese também avaliou o potencial de produção de biobutanol por meio de fermentação ABE (acetona-butanol-etanol) a partir da mesma biomassa. Duas estratégias de hidrólise e fermentação (SHF, hidrólise e fermentação separadas e PSSSF, pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas) e duas concentrações de biomassa (10 e 15 % m/v) foram avaliadas. Para ambas as estratégias, a concentração de 10 % m/v se mostrou mais favorável (~ 4 vezes maior) uma vez que não houve a necessidade de detoxificação do hidrolisado para obter produção de ABE satisfatória. Para a concentração de 10 % m/v, o processo PSSSF alcançou uma produção de ABE ligeiramente maior (10,5 g/L para 13,5 g/L) e produtividade 60% mais elevada. Na melhor condição (10 % m/v - PSSSF) seria possível estimar um rendimento de 170 L de ABE por tonelada de palha de cana-de-açúcar pré-tratada, sendo 65 L de acetona, 95 L de butanol e 10 L de etanol.

PALAVRAS-CHAVE: Bioetanol; biobutanol; palha de cana-de-açúcar; sacarificação e fermentação simultâneas; otimização multi-critérios; batelada alimentada.

ABSTRACT

The present thesis studied the hydrolysis and fermentation steps of the hydrothermally pretreated sugarcane straw (cellulosic fraction), aiming bioethanol and biobutanol production. In regards to the hydrolysis step, it is of paramount importance obtaining high glucose concentrations for a feasible bioethanol production. On the other hand, finding an overall efficient process may be challenging since criteria as yield and productivity, may be conflicting sometimes. Thus, a multi-criteria optimization was applied in order to find a balance between yield and productivity in the bioethanol production via pre-saccharification (PS) followed by saccharification and simultaneous fermentation (SSF). PS experiments were carried out evaluating effects of enzymatic dosage, biomass loading, and PS time. After each PS assay, SSF step was run for 24 h. The performance of the whole process (PS + SSF) was evaluated based on overall ethanol yield and productivity. Under optimized conditions, operating in a high solid loading (19.3% w/v), it was possible to obtain an ethanol concentration of 5.6% v/v in a short total processing time of 45 h (hydrolysis + fermentation), which corresponds to approximately 290 L of ethanol per tonne of pretreated sugarcane straw. Also, in the enzymatic hydrolysis step, and as an alternative to the batch PS process, it was studied the fed-batch operation feeding substrate and enzyme, with a total of 21 % w/v of solid load. The suggested feeding policy in this study took into account feeding of substrate and enzyme in a way that the substrate concentration was maintained constant and the reaction rate was maintained equal to or higher than 70 % of the initial hydrolysis reaction rate. In the optimum feeding profile, it was possible to achieve a glucose concentration of 160 g/L, which corresponds to 80 % of cellulose-to-glucose conversion. In addition, it was verified that the non-complete conversion is associated with the non-productive enzyme adsorption, as well as the presence of recalcitrant cellulose. Finally, the thesis also evaluated the potential of biobutanol production by means of ABE (acetone-butanol-ethanol) fermentation using the same biomass. Two hydrolysis-fermentation strategies (SHF - separated hydrolysis and fermentation and PSSSF - pre-saccharification followed by simultaneous saccharification and fermentation), and two biomass concentrations (10 and 15 % w/v) were evaluated. For both strategies, the 10 % w/v concentration was more favorable (~ 4 times higher) with respect to the ABE production, once there was no need to include a detoxification step. Comparing both strategies, the PSSSF achieved a slightly higher ABE production (10.5 g/L to 13.5 g/L) and 60 % higher productivity. In the best condition (10 % w/v - PSSSF), it would be possible to estimate an yield of 170 L of ABE per tonne of pretreated sugarcane straw, corresponding to 65 L of acetone, 95 L of butanol and 10 L of ethanol.

KEY-WORDS: Bioethanol; biobutanol; sugarcane straw; simultaneous saccharification and fermentation; multi-criteria optimization; fed-batch process.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 – Esquema representativo da estrutura de uma biomassa lignocelulósica..... | 37 |
| Figura 2.2 – Etapas do processo de produção de biobutanol e bioetanol..... | 39 |
| Figura 2.3 – Efeito do pré-tratamento na matriz lignocelulósica..... | 40 |
| Figura 2.4 – Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose..... | 44 |
| Figura 4.1 – Valores experimentais e valores previstos para a eficiência global em etanol (a) e produtividade global em etanol (b)..... | 75 |
| Figura 4.2 – Superfícies de resposta ((a), (c)) e curvas de nível ((b), (d)) para eficiência global em etanol em função da concentração de enzima e concentração de biomassa ((a) e (b)); concentração de biomassa e tempo de pré-hidrólise ((c) e (d))..... | 77 |
| Figura 4.3 – Superfícies de resposta ((a), (c)) e curvas de nível ((b), (d)) para produtividade global de etanol em função da concentração de enzima e concentração de biomassa ((a) e (b)); concentração de enzima e tempo de pré-hidrólise ((c) e (d)). | 78 |
| Figura 4.4 – Perfis das respostas previstas pelo modelo (1ª linha, eficiência global em etanol, e 2ª linha, produtividade global de etanol) e perfis de desejabilidade global (3ª linha) em função das variáveis independentes (cada uma das colunas, respectivamente). | 80 |
| Figura 4.5 – Curvas de nível de desejabilidade global em função das variáveis operacionais. (a) Efeito da concentração de biomassa enzima; (b) Efeito da concentração de enzima e tempo de PS; (c) Efeito da concentração da biomassa e tempo de PS. | 81 |
| Figura 4.6 – Concentração de glicose e etanol obtida no teste de validação..... | 82 |
| Figura 5.1 – Simulações para cada componente do vetor (r_{set}): (a) Perfil de alimentação de substrato em função do tempo; (b) Perfil de concentração de produto em função do tempo; (c) Perfil de velocidade de reação em função do tempo; (d) enzima acumulada no reator em função do tempo; (e) Perfil do volume de reação em função do tempo. | 93 |
| Figura 5.2 – Simulações para $r = 0,7.r_{inicial}$: (a) Concentração de substrato em função do tempo; (b) Massa de palha alimentada no reator em função do tempo; (c) Enzima alimentada e acumulada no reator em função do tempo; (d) Volume de reação em função do tempo; (e) Velocidade de reação em função do tempo; (f) Concentração de produto em função do tempo. | 96 |
| Figura 5.3 – Concentração de glicose experimental e simulado em função do tempo de reação..... | 98 |

| | |
|--|-----|
| Figura 5.4 – Comparação entre perfis experimentais para palha de cana-de-açúcar, utilizando a política de controle ótimo (P1) e a política de alimentação de substrato e enzima (P2)..... | 100 |
| Figura 5.5 – Efeito da adição de proteína isolada de soja na hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. | 102 |
| Figura 6.1 – Diagrama esquemático do bioprocesso PSSSF para a produção de produtos ABE a partir de palha de cana-de-açúcar..... | 108 |
| Figura 6.2 – Diagrama esquemático do bioprocesso SHF para a produção de produtos ABE a partir de palha de cana-de-açúcar..... | 109 |
| Figura 6.3 – Diagrama esquemático do bioprocesso SHF para a produção de produtos ABE a partir de palha de cana-de-açúcar, com a inclusão da etapa de detoxificação. | 109 |
| Figura 6.4 – Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas de pré-hidrolisado em concentrações de 10 (a) e 15 (b) % m/v de palha de cana-de-açúcar. | 112 |
| Figura 6.5 – Consumo de açúcar e produção de metabólitos ao longo da fermentação ABE de palha de cana-de-açúcar (10 % m/v) pelos processos SHF (a-b) e PSSSF (c-d)..... | 119 |
| Figura 6.6 – Acetona-Butanol-Etanol obtidos da palha de cana-de-açúcar pré-tratada através do processo SHF e PSSSF conduzido em reator de 2L. | 120 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 2.1 – Comparação entre o processo SHF e SSF na produção de bioetanol e biobutanol reportados na literatura | 50 |
| Tabela 3.1 – Composição química da palha in natura e pré-tratada hidrotermicamente..... | 64 |
| Tabela 4.1 – Níveis das variáveis independentes do processo de pré-hidrólise utilizados no planejamento DCCR..... | 68 |
| Tabela 4.2 – Resultados do planejamento DCCR no estudo da etapa de pré-sacarificação com as variáveis-resposta. | 72 |
| Tabela 4.3 – Análise de variância (ANOVA) do modelo predito para a eficiência e produtividade global em etanol, considerando um intervalo de confiança de 95 % (p-valor < 0,05)..... | 74 |
| Tabela 4.4 – Condições operacionais do processo PSSSF que maximiza cada variável-resposta. | 79 |
| Tabela 4.5 – Comparação entre os valores preditos e experimentais do processo PSSSF conduzido sob condições operacionais definidas pela função de desejabilidade..... | 82 |
| Tabela 5.1 – Composição química da palha de cana-de-açúcar deslignificada..... | 92 |
| Tabela 5.2 – Comparação das produtividades e enzima consumida no reator para que se atinja 90 % da concentração final de glicose..... | 94 |
| Tabela 6.1 – Efeito da carga de sólidos inicial na produção ABE usando após 96 h de fermentação usando a estratégia PSSSF..... | 113 |
| Tabela 6.2 – Efeito da concentração de glicose inicial em meio hidrolisado não detoxificado e detoxificado na produção ABE após 96 h de fermentação..... | 116 |

LISTA DE NOMENCLATURAS

Abreviações

| | |
|---------|--|
| ABE | Acetona-Butanol-Etanol |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| DCCR | Delineamento composto central rotacional |
| FPU | <i>Filter paper unit</i> |
| PS | Pré-sacarificação |
| PSSF ou | Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação |
| PSSSF | simultâneas |
| SHF | Hidrólise e fermentação separadas |
| SSF | Sacarificação e fermentação simultâneas |
| 2G | Segunda geração |

Símbolos

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| C_{ABE} | Concentração de produtos ABE | [g/L] |
| $C_{açúcares}$ | Concentração de açúcares (glicose + xilose) | [g/L] |
| C_B | Concentração de biomassa | [g/L] |
| C_{EtOH} | Concentração de etanol | [g/L] |
| C_G | Concentração de glicose | [g/L] |
| C_S | Concentração de substrato | [g/L] |
| $C_{S,0}$ | Concentração de substrato inicial | [g/L] |
| $C_{S,alim}$ | Concentração de substrato na alimentação | [g/L] |
| e_{alim} | Enzima adicionada ao reator | [FPU] |
| $e_{acumulada}$ | Enzima acumulada dentro do reator | [FPU] |
| $E_{fermentação}$ | Eficiência de fermentação | [%] |
| E_{global} | Eficiência global em etanol | [%] |
| $E_{hidrólise}$ | Eficiência de hidrólise | [%] |
| $F_{S,alim}$ | Vazão de substrato na alimentação | [L/min] |
| P_{EtOH} | Produtividade volumétrica em etanol | [g/L.h] |
| r | Velocidade de reação | [g/L.min] |
| r_0 | Velocidade inicial de reação | [g/L.min] |

| | | |
|-------------|--|-----|
| t_{PS} | Tempo de pré-sacarificação | [h] |
| t_{SSF} | Tempo de sacarificação e fermentação simultâneas | [h] |
| t_{total} | Tempo total de processo | [h] |
| V | Volume reacional | [L] |

Sumário

| | |
|---|----|
| Capítulo 1: INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1 Objetivos | 30 |
| 1.1.1 Objetivos específicos | 30 |
| 1.2 Estrutura da tese | 30 |
| Capítulo 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 33 |
| 2.1 O etanol | 33 |
| 2.2 O butanol | 34 |
| 2.3 Biomassas lignocelulósicas como fonte de energia | 35 |
| 2.3.1 Palha de cana-de-açúcar: potencialidades deste resíduo | 36 |
| 2.3.2 Estrutura dos materiais lignocelulósicos | 37 |
| 2.4 Processo de produção de bioetanol e biobutanol a partir de resíduos lignocelulósicos | 38 |
| 2.4.1 Pré-tratamento | 39 |
| 2.4.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico | 41 |
| 2.4.1.2 Pré-tratamento alcalino | 42 |
| 2.4.2 Hidrólise enzimática | 43 |
| 2.4.3 Fermentação | 45 |
| 2.4.3.1 Fermentação visando à produção de etanol | 45 |
| 2.4.3.2 Fermentação visando à produção de butanol | 46 |
| 2.4.3.3 Destilação | 47 |
| 2.5 Estratégias e configurações de processo para a produção de bioálcoois | 47 |
| 2.5.1 Hidrólise e Fermentação separadas | 47 |
| 2.5.2 Sacarificação e Fermentação Simultâneas | 48 |
| 2.5.3 Pré-sacarificação seguida de Sacarificação e Fermentação Simultâneas | 51 |
| 2.5.4 Bioprocesso Consolidado | 52 |

| | | |
|---|--|----|
| 2.5.5 | Operação em modo batelada alimentada | 53 |
| 2.6 | Considerações finais | 54 |
| Capítulo 3: MATERIAL E MÉTODOS | | 57 |
| 3.1 | Enzima | 57 |
| 3.1.1 | Determinação da atividade enzimática das celulases | 57 |
| 3.2 | Substrato | 58 |
| 3.2.1 | Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i> | 58 |
| 3.2.2 | Caracterização química da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratada | 59 |
| 3.2.2.1 | Determinação dos teores de celulose e hemicelulose | 60 |
| 3.2.2.2 | Determinação do teor de lignina solúvel | 61 |
| 3.2.2.3 | Determinação do teor de lignina insolúvel | 61 |
| 3.2.2.4 | Determinação do teor de cinzas totais..... | 62 |
| 3.2.2.5 | Determinação do teor de extrativos | 63 |
| 3.3 | Quantificação dos compostos produzidos nas etapas de hidrólise e/ou fermentação | 64 |
| Capítulo 4: PRÉ-SACARIFICAÇÃO SEGUIDA DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA: OTIMIZAÇÃO MULTI-CRITÉRIO | | 65 |
| 4.1 | Introdução | 65 |
| 4.2 | Material e métodos | 66 |
| 4.2.1 | Substrato e complexo enzimático..... | 66 |
| 4.2.2 | Microrganismo e preparo do inóculo | 67 |
| 4.2.3 | Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultânea | 67 |
| 4.2.4 | Planejamento experimental..... | 67 |
| 4.2.5 | Análise estatística..... | 68 |
| 4.2.6 | Otimização multicritérios..... | 69 |
| 4.2.7 | Quantificação de glicose e etanol | 70 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 4.2.8 | Procedimento de cálculos | 70 |
| 4.2.8.1 | Eficiência de hidrólise ($E_{f_{hidrólise}}$)..... | 70 |
| 4.2.8.2 | Eficiência de fermentação ($E_{f_{fermentação}}$) | 71 |
| 4.2.8.3 | Eficiência global em etanol ($E_{f_{global}}$) | 71 |
| 4.2.8.4 | Produtividade volumétrica em etanol (P_{EtOH}) | 71 |
| 4.3 | Resultados e discussão | 71 |
| 4.3.1 | Análise estatística e modelagem matemática..... | 73 |
| 4.3.2 | Decisão multicritérios aplicado ao processo PSSSF..... | 79 |
| 4.3.3 | Teste de validação | 81 |
| 4.4 | Conclusões | 84 |
| Capítulo 5: ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E/OU ENZIMA EM REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA | | 85 |
| 5.1 | Introdução | 85 |
| 5.2 | Material e métodos | 86 |
| 5.2.1 | Modelo matemático de hidrólise enzimática em batelada alimentada | 86 |
| 5.2.2 | Definição do perfil de alimentação de substrato e enzima..... | 88 |
| 5.2.3 | Simulações do perfil de alimentação de substrato e enzima ao reator de hidrólise enzimática | 89 |
| 5.2.4 | Algoritmo de simulação: perfil de alimentação de substrato e enzima | 89 |
| 5.2.5 | Validação experimental | 90 |
| 5.2.5.1 | Substrato e complexo enzimático | 91 |
| 5.2.5.2 | Deslignificação alcalina da palha pré-tratada hidrotermicamente | 91 |
| 5.2.5.3 | Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: aplicação da estratégia de alimentação de substrato e enzima | 91 |
| 5.3 | Resultados e discussão | 92 |
| 5.3.1 | Caracterização química da palha de cana-de-açúcar deslignificada..... | 92 |

| | | |
|---|---|------------|
| 5.3.2 | Simulações para diferentes porcentagens mínimas de r inicial a serem mantidas no processo | 92 |
| 5.3.3 | Simulação para manter $r \geq 0,7.r_{inicial}$ | 95 |
| 5.3.4 | Validação experimental | 98 |
| 5.3.5 | Comparação das estratégias de alimentação P1 e P2 | 99 |
| 5.3.6 | Fatores que afetam a hidrólise enzimática de lignocelulósicos | 101 |
| 5.4 | Conclusões | 103 |
| Capítulo 6: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOBUTANOL AVALIANDO DOIS MODOS DE OPERAÇÃO: SHF E SSF | | |
| 6.1 Introdução | | 105 |
| 6.2 Material e métodos | | 107 |
| 6.2.1 | Substrato e complexo enzimático | 107 |
| 6.2.2 | Microrganismo e preparo do inóculo | 107 |
| 6.2.3 | Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação ABE simultâneas | 107 |
| 6.2.4 | Hidrólise e fermentação ABE separadas | 108 |
| 6.2.4.1 | Detoxificação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar | 109 |
| 6.2.5 | Aumento de escala dos melhores ensaios obtidos para a estratégia SHF e PSSSF | 110 |
| 6.2.6 | Análise de açúcares, solventes, ácidos e compostos fenólicos | 110 |
| 6.2.7 | Procedimentos de cálculos e análise estatística dos resultados | 111 |
| 6.3 Resultados e discussão | | 112 |
| 6.3.1 | Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultânea | 112 |
| 6.3.2 | Hidrólise e fermentação ABE separadas | 115 |
| 6.3.3 | Aumento de escala e comparação dos processos SHF e PSSSF | 118 |
| 6.4 Conclusões | | 121 |
| Capítulo 7: CONCLUSÕES DA TESE | | 123 |

| | |
|--|------------|
| Capítulo 8: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 125 |
| Referências bibliográficas..... | 127 |
| Apêndice..... | 136 |

Capítulo 1: INTRODUÇÃO

Ainda que exista um grande interesse no desenvolvimento de energias limpas e renováveis, o petróleo continua a suprir a maior parte da matriz energética mundial, contribuindo significativamente para o desenvolvimento da sociedade. No entanto, preocupações ambientais aliadas à instabilidade de preço das reservas de petróleo têm estimulado o desenvolvimento de novas políticas energéticas voltadas às fontes renováveis (ÖZDENKÇI et al., 2017).

Nesse contexto, os biocombustíveis como os bioálcoois (etanol, isopropanol, butanol), biodiesel e o biogás vêm ganhando destaque mundial como fontes de energia alternativas, principalmente por apresentarem caráter renovável e por contribuírem para a redução das emissões de dióxido de carbono e outros gases do efeito estufa (GUO; SONG; BUHAIN, 2015).

Dentre os biocombustíveis, o etanol, indiscutivelmente, desempenha um papel significativo como opção de uso veicular. Suas vantagens vão do aspecto ambiental, ao técnico e econômico, por vezes sendo mais barato por energia fornecida do que a gasolina (NOVACANA, 2018), podendo criar relativa independência do país em relação ao mercado de petróleo.

O butanol apresenta algumas vantagens técnicas frente ao etanol. O estudo de sua produção a partir de biomassas de baixo custo pode ser também de grande importância para o país. Segundo estudos realizados por Pereira et al. (2015), a introdução do butanol no portfólio de produtos de biorrefinarias resultaria em maiores receitas em relação aos cenários base, onde somente etanol é produzido. Neste contexto, o desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de butanol torna-se também um importante campo de pesquisa que pode contribuir com a ampliação do conhecimento científico na área de bioprocessos, seguindo para impactos na economia e desenvolvimento da matriz energética mundial.

O setor energético brasileiro é altamente competitivo frente a outros países. O Brasil ocupa posição privilegiada para liderar a produção de biocombustíveis a partir de biomassas renováveis. Condições climáticas favoráveis, biodiversidade de matérias-primas renováveis e culturas agrícolas de grande extensão tornam o país promissor para o desenvolvimento de biorrefinarias capazes de aproveitar integralmente recursos renováveis para a produção de combustíveis.

Das biomassas disponíveis para a produção de combustíveis, os materiais lignocelulósicos compostos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, apresentam-se como uma fonte interessante de matéria-prima renovável, de baixo custo e de alto teor de carboidratos passíveis à fermentação alcoólica (SHAHZADI et al., 2014). Os benefícios relacionados ao seu uso incluem incrementos na oferta de combustíveis sem que haja a expansão de culturas agrícolas, além de uma maior segurança energética para o país.

Santos-Rocha; Almeida; Cruz (2017) avaliaram o potencial energético de resíduos lignocelulósicos (bagaço e palha de cana-de-açúcar, milho, arroz, soja, trigo e coco) de diferentes regiões brasileiras. Das biomassas avaliadas, a palha de cana-de-açúcar apresentou o maior potencial para produção de etanol (aproximadamente 290 L/tonelada de resíduo – considerando a fração celulósica e hemicelulósica). Diante desta motivação, a palha de cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para o estudo da tese.

Apesar das vantagens destacadas, os materiais lignocelulósicos apresentam características estruturais recalcitrantes, tornando sua bioconversão em combustíveis um processo dispendioso (KUHAD et al., 2011). Basicamente, a conversão de resíduos lignocelulósicos em álcool, pela rota bioquímica, envolve as seguintes etapas: pré-tratamento, a fim de remover a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a acessibilidade da enzima ao seu substrato; hidrólise enzimática, para obter açúcares fermentescíveis dos polissacarídeos (GUPTA; VERMA, 2015); fermentação dos açúcares a álcool; e destilação.

Para cada uma dessas etapas, diferentes formas de processamento têm sido propostas na literatura. O grande desafio, porém, encontra-se na seleção da técnica mais adequada visando conversões eficientes para obtenção do produto de interesse final, sem apresentar altos custos de processo.

Com relação à etapa de pré-tratamento, buscam-se aquelas que façam o uso mínimo (ou até mesmo a ausência) de solventes químicos, evitem a perda de polissacarídeos e minimizem a formação de produtos de degradação, os quais têm efeito negativo na etapa de hidrólise e fermentação (SUN; CHENG, 2002). Seguindo este caminho, vale destacar o pré-tratamento hidrotérmico. Este apresenta algumas vantagens em relação aos demais pré-tratamentos, pois não faz o uso de solventes químicos além da água, não requer o emprego de reatores altamente resistentes a corrosão e leva à formação mínima de produtos de degradação (RUIZ et al., 2012; VARGAS et al., 2015). Entretanto, uma das principais desvantagens do pré-tratamento hidrotérmico é a possível recondensação de compostos solúveis oriundos da degradação da lignina (ALVIRA et al., 2010).

Na etapa de hidrólise enzimática, processar altas cargas de biomassa é importante do ponto de vista técnico-econômico, isso porque altas concentrações de açúcares fermentescíveis se traduzem em maiores concentrações de biocombustíveis, o que poderia reduzir o uso de energia e os custos associados ao processo de destilação (MODENBACH; NOKES, 2013). No entanto, processar altas cargas de sólidos resultam em níveis mais elevados de inibidores para os processos de hidrólise e fermentação, além de aumentar a viscosidade do meio reacional dificultando o processo de mistura (CORRÊA; BADINO; CRUZ, 2016).

Várias abordagens têm sido propostas a fim de amenizar tais problemas. Com relação aos efeitos de inibição, uma das maneiras é realizar a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) em um único reator. Enquanto as enzimas hidrolisam celulose e hemicelulose em glicose e xilose, respectivamente, os microrganismos rapidamente os consomem convertendo-os a álcool, o que pode reduzir significativamente a inibição das enzimas pelos substratos (MANZANARES et al., 2011). Por outro lado, a principal desvantagem do processo SSF é operar em uma temperatura não ideal para a etapa de hidrólise, uma vez que a temperatura geralmente é ajustada na condição ideal para a fermentação. Assim, outra possibilidade para esta abordagem é inclusão de uma etapa de pré-sacarificação (PS) anterior à etapa de SSF.

Com relação aos problemas associados à ineficiência de mistura, uma alternativa seria operar o reator no modo batelada alimentada, onde a biomassa é adicionada gradativamente com o propósito de manter a viscosidade do meio reacional baixa, de forma a possibilitar reações de hidrólise mais eficientes, a fim de se atingir níveis de glicose industrialmente desejáveis e manter o baixo consumo de potência.

Considerando os problemas mencionados, observa-se que existem desafios a serem superados na rota enzimática de produção de etanol e butanol. Neste sentido, esta tese se propôs a estudar a produção de bioetanol e biobutanol avaliando maneiras pelas quais os processos de produção possam ser melhorados, quais sejam, processos simultâneos de hidrólise e fermentação antecedidos por uma etapa de pré-sacarificação, e operação da etapa de hidrólise no modo batelada alimentada.

A proposta desta tese inseri-se no contexto do projeto temático FAPESP (nº 2016/10636-8) vinculado ao programa BIOEN (Bioenergia), o qual tem como título: “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas”. Dentro deste temática, a tese se

encaixa no subprojeto: “Etanol 2G a partir de biomassa de cana de açúcar: processamento da fração C6. Integração e otimização dos reatores de pré-tratamento, hidrólise e fermentação”.

1.1 *Objetivos*

O principal objetivo desta tese de doutorado foi o estudo das etapas de hidrólise e fermentação da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente visando à produção eficiente de bioetanol e biobutanol.

1.1.1 *Objetivos específicos*

- Realizar o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar;
- Estudar o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) com a inclusão da etapa de pré-sacarificação (PS) avaliando diferentes concentrações de biomassa, concentrações de enzima e tempos de pré-hidrólise, para operação em batelada, por meio de um planejamento experimental DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) visando à produção de etanol de segunda geração;
- Estudar diferentes estratégias de alimentação de substrato e/ou enzima em batelada alimentada do processo de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar deslignificada com o objetivo de obter níveis satisfatórios de conversão e concentração de glicose;
- Estudar o potencial de produção de biobutanol a partir de palha de cana-de-açúcar por meio das estratégias de Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF) e de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF).

1.2 *Estrutura da tese*

A tese está estruturada em oito capítulos, assim divididos:

- Capítulo 1: apresenta uma contextualização do tema abordado, motivação e objetivos da tese;

- Capítulo 2: contém uma revisão da literatura, abordando as características das biomassas lignocelulósicas, uma explicação detalhada sobre pré-tratamento, focando principalmente no pré-tratamento hidrotérmico e alcalino, bem como uma revisão sobre os principais conceitos de hidrólise enzimática e fermentação. São apresentadas diferentes configurações de hidrólise e fermentação para a produção de bioetanol e biobutanol;
- Capítulo 3: descreve os procedimentos experimentais e metodologias empregadas na realização dos experimentos desenvolvidos nos capítulos subsequentes. Além disso, são apresentados resultados da caracterização química da palha *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente, bem como a caracterização da enzima utilizada nos ensaios de hidrólise;
- Capítulo 4: refere-se ao estudo de otimização do processo de pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas da palha pré-tratada hidrotermicamente;
- Capítulo 5: estuda diferentes estratégias de alimentação de substrato e/ou enzima ao reator de hidrólise enzimática em batelada alimentada.
- Capítulo 6: apresenta os resultados da avaliação de diferentes estratégias de hidrólise e fermentação visando à produção de biobutanol a partir da palha de cana-de-açúcar;
- Capítulo 7: apresenta as principais conclusões obtidas na tese, e por fim;
- Capítulo 8: propõe algumas sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ao longo das últimas duas décadas, vários combustíveis líquidos alternativos têm sido investigados, os quais podem substituir os combustíveis derivados de petróleo (como a gasolina e o diesel) ou ser misturado com combustíveis de petróleo em alguma proporção, sem modificar os motores veiculares (BANKAR et al., 2013).

O Brasil tem sido protagonista no que diz a respeito à produção de combustíveis renováveis. Um dos compromissos do país em relação as questões de produção e demanda de energias é alcançar uma participação de 45 % de energias renováveis na composição da matriz energética até 2030, o que inclui o incremento na participação de biomassas (MME, 2017).

Nesse contexto, biomassas lignocelulósicas apresentam-se como uma opção de matéria-prima bastante atrativa e viável para alavancar a produção de biocombustíveis líquidos, entre eles o etanol e o butanol.

2.1 *O etanol*

Etanol, também conhecido como álcool etílico, pode ser utilizado para diferentes aplicações, entre elas: preparações farmacêuticas, perfumes, solventes, componentes preservativos ou antissépticos.

Sua aplicação mais expressiva é como biocombustível, sendo utilizado para esta finalidade desde o início do século passado. Porém, foi a partir da década de 70, decorrente da adoção de políticas públicas em resposta às duas grandes crises do petróleo (1973 e 1979), que a sua produção em larga escala foi concretizada mundialmente. Desde então, o etanol desempenha um papel significativo como opção de biocombustível veicular. As vantagens do uso do etanol vão do aspecto ambiental, como o não agravamento do efeito estufa com sua queima, ao técnico e econômico, por vezes sendo mais barato por energia fornecida do que a gasolina (NOVACANA, 2018), podendo criar relativa independência do país em relação ao mercado de petróleo.

A forma mais simples e comum de produzi-lo é por meio da rota fermentativa, na qual a levedura *Saccharomyces cerevisiae* converte os açúcares fermentescíveis em etanol.

Quando produzido por rota bioquímica, o etanol recebe duas denominações: etanol de primeira geração (1G), obtido a partir de matérias-primas sacarídeas ou amiláceas; e etanol de segunda geração (2G), obtido a partir de matérias-primas lignocelulósicas.

Os principais países produtores de etanol fermentado são atualmente o Brasil e os Estados Unidos, sendo o primeiro o maior produtor de etanol a partir da cana-de-açúcar e o segundo o maior produtor a partir do milho. Nos últimos 5 anos, foi mantida uma produção média por safra de 28 bilhões de litros de etanol no Brasil (UNICA, 2018), já nos EUA, a produção está mantida acima de 63 bilhões de litros de etanol (EIA, 2018), juntos, compondo 85 % da produção mundial de etanol.

2.2 O butanol

Butanol ou álcool butílico é uma molécula de quatro carbonos, a qual possui quatro isômeros estruturais: n-butanol, isobutanol, terc-butanol e sec-butanol.

Recentemente, o n-butanol, também chamado de biobutanol quando produzido a partir de biomassa renovável, foi proposto como biocombustível da próxima geração. Suas propriedades se assemelham às da gasolina e, quando comparado ao etanol, apresenta várias vantagens, tais como: maior poder calorífico, menor volatilidade e menor corrosividade. Além disso, o butanol pode ser utilizado como aditivo na gasolina e no diesel, como também aditivo oxigenado permitindo uma combustão mais completa, fazendo do n-butanol um excelente substituto “verde” para a gasolina (SASAKI et al., 2014; GUAN et al., 2016).

Além de ser utilizado como combustível, o n-butanol também é um intermediário importante na indústria química, sendo usado na produção de tintas, solventes e plastificantes, na extração de ativos farmacêuticos e cosméticos, entre outros. O mercado global de n-butanol cresceu significativamente nos últimos anos e deverá crescer em ritmo mais acelerado nos próximos cinco anos, impulsionado principalmente pela crescente demanda na região Ásia-Pacífico (PEREIRA et al., 2015a).

Butanol pode ser produzido tanto por rota bioquímica quanto por rota petroquímica. Pela via bioquímica, o n-butanol é naturalmente produzido por bactérias do gênero *Clostridium* por meio do bioprocesso conhecido como fermentação ABE a qual produz acetona-butanol-etanol na proporção de 3:6:1 em termos mássicos. Pela via petroquímica utiliza-se o processo oxo, em que n-butanol é obtido pela reação de

hidroformilação do propileno, e consecutivamente hidrogenado a n-butanol e isobutanol (KOLESINSKA et al., 2019).

O processo bioquímico foi descoberto na década de 10 por Charles Weizmann. A produção em escala industrial foi usada até a década de 60, quando o preço da matéria-prima aumentou e a produção via rota petroquímica alavancou (NIEMISTÖ, 2014). Atualmente, a produção mundial de n-butanol se dá principalmente pela rota petroquímica. No entanto, devido às instabilidades no preço do petróleo, processos bioquímicos para a produção de butanol voltaram a receber atenção (KARIMI et al., 2015).

A mudança gradual dos combustíveis de transporte à base de petróleo para recursos renováveis bem como a demanda energética mundial cada vez mais crescente têm sido a grande motivação para pesquisas relacionadas à produção de bioálcoois a partir de recursos renováveis, principalmente de biomassas lignocelulósicas.

2.3 Biomassas lignocelulósicas como fonte de energia

Biomassa lignocelulósica é o termo utilizado para se referir à matéria prima renovável e de origem vegetal, proveniente de muitas atividades agrícolas e florestais. Apresenta-se como insumo de baixo custo, tendo em sua composição três grandes frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina, sendo as duas primeiras passíveis a fermentação alcoólica para a produção de bioálcoois (SHAHZADI et al., 2014).

Materiais lignocelulósicos incluem resíduos agrícolas (bagaço da cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, casca de soja, casca de arroz, palha de trigo, etc), resíduos florestais (madeira, eucalipto) e resíduos industriais (indústria de papel) (BALAT, 2011).

A seleção de substratos lignocelulósicos adequados desempenha um papel fundamental para a produção econômica de combustíveis líquidos. Fatores como disponibilidade de matéria-prima, presença de grande quantidade de carboidratos e custos de logística são fundamentais para a produção de biocombustíveis viável em larga escala (DA SILVA et al., 2012).

Uma análise comparativa foi realizada considerando as três principais fontes de etanol de primeira geração utilizadas no Brasil (cana-de-açúcar), EUA (milho) e Europa (beterraba) (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010). De acordo com o estudo, a cana-de-açúcar é a opção de biomassa energética com maior rendimento de etanol (6470 L/ha contra 4180 L/ha e 5500 L/ha para o milho e beterraba, respectivamente) por área plantada. Além

disso, a cultura de cana reduz as emissões de gases do efeito estufa em até 84 %, enquanto que etanol de milho e beterraba reduzem até 30 % e 40 % das emissões, respectivamente. O custo de produção de etanol à base de cana-de-açúcar é 60 % menor que a do milho e 75 % menor que a beterraba. Isso se traduz em um melhor balanço energético da cana (de 8 a 10) comparado às outras duas culturas (1,4 para milho e 2 para beterraba), o que confere ao Brasil uma grande vantagem de expansão da produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar e seus resíduos.

Tendo em vista também que o Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir de cana-de-açúcar, pode-se dizer que o Brasil encontra-se em um cenário favorável no que tange a produção de etanol lignocelulósico a partir dos resíduos do processamento da cana-de-açúcar (bagaço e palha). Além disso, o país possui ampla biodiversidade de matérias-primas renováveis, culturas agrícolas de grande extensão, condições climáticas adequadas, possibilitando a diversificação na sua matriz energética.

2.3.1 Palha de cana-de-açúcar: potencialidades deste resíduo

A palha de cana-de-açúcar é um resíduo encontrado nos canaviais, composta por folhas verdes, secas e ponteiros, resultado do processo de colheita da cana-de-açúcar. É uma biomassa altamente promissora para a produção de etanol 2G (CARVALHO et al., 2016; SANTOS-ROCHA; ALMEIDA; CRUZ, 2017), geração de energia (SANTOS-ROCHA; ALMEIDA; CRUZ, 2017), fabricação de polpa de celulose, nanocelulose, celulases e lignina, sendo dessa forma uma biomassa atrativa para ser incorporada nas biorrefinarias.

Com o aumento da mecanização da colheita de cana-de-açúcar e a diminuição gradativa de sua queima (Decreto Federal nº 2.661/98), houve um crescimento significativo da quantidade de palha disponível no campo. Na safra brasileira de 2017/2018, foram processadas 641,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (UNICA, 2018). É estimado que a cada tonelada de cana processada, geram-se em média 140 kg de palha e 140 kg de bagaço (MACEDO, 2001; SAAD et al., 2008), em base seca, o que equivale a aproximadamente 91 milhões de toneladas de palha. Considerando que o bagaço seja utilizado para geração de energia em caldeiras, que metade da palha gerada fique no campo para proteção do solo e a outra metade seja destinada à produção de etanol, estima-se um incremento de 7,5 bilhões de litros de etanol na produção anual, ou seja, 25 %, do que geralmente já vêm sendo produzido nas últimas safras (PRATTO, 2015).

Santos-Rocha; Almeida; Cruz (2017) avaliaram o potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes do cultivo da cana-de-açúcar, milho, arroz, soja, trigo e coco de diferentes regiões brasileiras. Das biomassas avaliadas, a palha e bagaço de cana-de-açúcar apresentam os maiores poderes caloríficos, podendo contribuir significativamente para o aumento da geração de energia elétrica. Com relação à produção de bioetanol, a palha de cana-de-açúcar apresentou o maior potencial de produção (aproximadamente 290 L/tonelada de resíduo – considerando a fração celulósica e hemicelulósica).

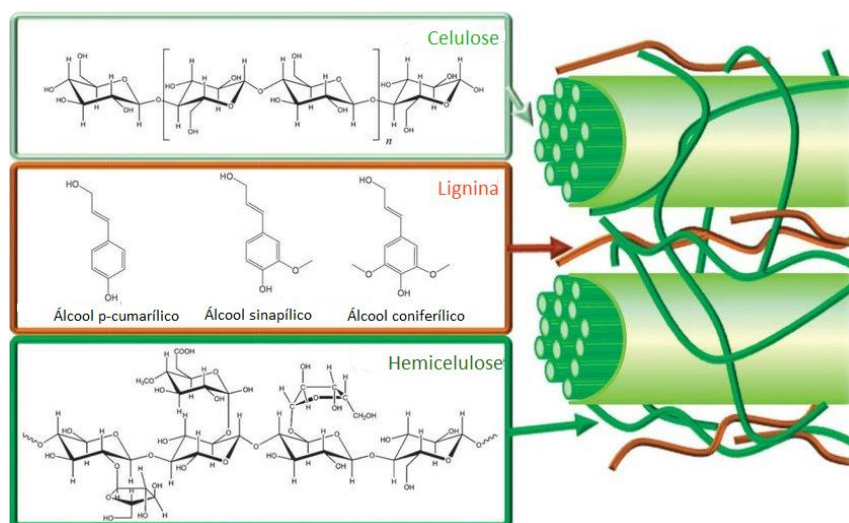
Diante do exposto, fica evidente o grande potencial da palha de cana-de-açúcar como fonte energética, podendo vir a contribuir com um aumento expressivo de bioetanol, sem a necessidade de aumentar a área plantada, bem como a possibilidade de seu uso para a produção de outros bioálcoois.

2.3.2 Estrutura dos materiais lignocelulósicos

De maneira geral, materiais lignocelulósicos são constituídos, principalmente, por três componentes: celulose (30-50 %), hemicelulose (15-35 %) e lignina (10-25 %) (LIMAYEM; RICKE, 2012), podendo variar a proporção de cada constituinte de acordo com a espécie vegetal, aspectos climáticos e solo onde foi cultivada.

Uma representação esquemática de como estão organizadas a celulose, hemicelulose e lignina é mostrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Esquema representativo da estrutura de uma biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de Alonso; Wettstein; Dumesic (2012).

Celulose é um polissacarídeo constituído por cadeias monoméricas de glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, as quais se ligam pelos seus grupos hidroxilas através da eliminação de uma molécula de água (PITARELO, 2007). Grande parte da estrutura da celulose apresenta-se altamente ordenada, devido à presença de ligações de pontes de hidrogênio intra e intermolecular, sendo chamada de região cristalina. Esta configuração confere rigidez e resistência às cadeias de celulose (DING; HIMMEL, 2006).

As hemiceluloses, diferentemente das celuloses, são formadas pela combinação de diversos tipos monossacarídeos, chamados então de heteropolissacarídeos. São compostas por pentoses (D-xilose, L-arabinose) e hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose), acompanhados de algumas ramificações de ácidos D-glucurônico e 4-O-metilglucurônico. Em relação à celulose, as hemiceluloses apresentam maior solubilidade em água (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina, depois da celulose, é o polímero mais abundante de origem natural. É localizada na parte mais externa da parede celular de uma planta, o que confere à planta rigidez, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano. É sintetizada pela polimerização radicalar de três unidades diferentes de fenil-propano: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (ZENG et al., 2014).

Celulose e hemicelulose são polissacarídeos passíveis de fermentação alcoólica, já a lignina, por não ser formada por monômeros de açúcares, não pode ser convertida em bioálcoois. Desta maneira, um dos maiores desafios do aproveitamento de carboidratos para a produção de biocombustíveis vem do fato da lignina apresentar uma configuração difícil de ser desestruturada, dificultando o processo de acessibilidade e conversão dos polissacarídeos.

2.4 Processo de produção de bioetanol e biobutanol a partir de resíduos lignocelulósicos

Para que os processos de produção de biocombustíveis de segunda geração sejam concretizados, é fundamental que os açúcares fermentescíveis estejam disponíveis e de fácil acesso aos microrganismos de fermentação, uma vez que influenciará no rendimento global e concentração do produto final produzido.

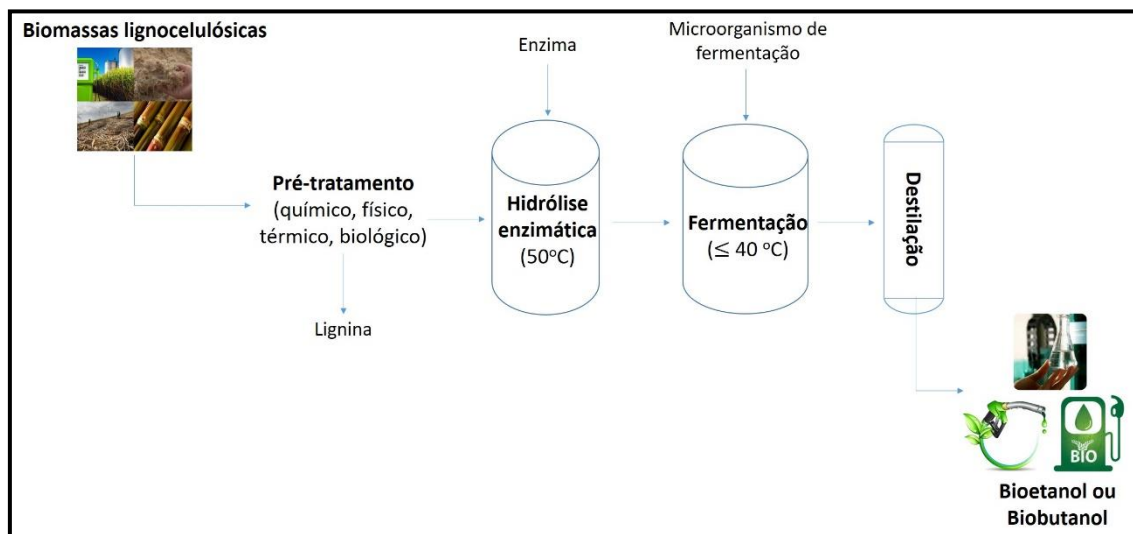
Tendo em vista que as biomassas são formadas por uma matriz complexa e difícil de ser desestruturada, torna-se crucial uma etapa de pré-tratamento com a finalidade de desmembrar a parede celular, separando a lignina da celulose e hemicelulose, bem como

aumentar a acessibilidade dos polissacarídeos. No entanto, os polissacarídeos liberados no pré-tratamento não são sintetizados por microrganismos convencionais de fermentação alcoólica. Deste modo, faz-se necessário também uma etapa de hidrólise (ou quebra) dessas moléculas, transformando-as em açúcares fermentescíveis.

Os grandes desafios da conversão de lignocelulósicos à bioálcoois podem ser listados em: natureza resistente da biomassa à degradação; variedade de açúcares que são liberados durante a hidrólise e microrganismos que sejam capazes de fermentar esses açúcares de forma eficiente (BALAT, 2011).

De maneira simplificada, as etapas do processo de produção de bioetanol e biobutanol, por rota enzimática, podem ser visualizadas na Figura 2.2. Basicamente, a diferença entre o processo de produção de bioetanol comparado à produção de biobutanol é o microrganismo utilizado na etapa de fermentação. Esta etapa será abordada separadamente para cada um dos produtos.

Figura 2.2 – Etapas do processo de produção de biobutanol e bioetanol.



Fonte: Acervo pessoal (2018)

2.4.1 Pré-tratamento

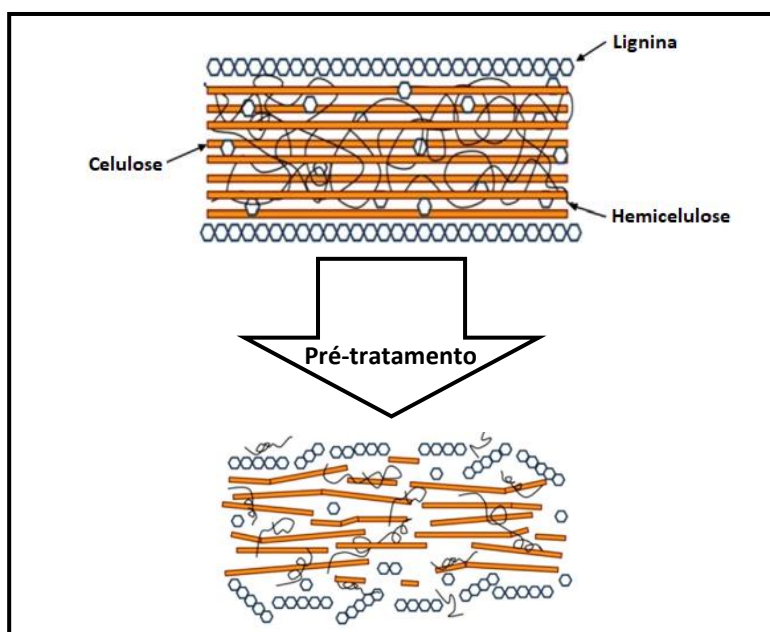
De modo geral, o pré-tratamento tem por finalidade remover a lignina e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, de maneira que os polissacarídeos estejam mais acessíveis às enzimas na etapa de hidrólise. É importante que o pré-tratamento apresente baixa demanda energética e baixo custo operacional (WYMAN et al., 2005; XU; HUANG, 2014).

A Figura 2.3 representa o efeito do pré-tratamento nas mudanças estruturais da matriz lignocelulósica.

Diferentes pré-tratamentos vêm sendo utilizados para o tratamento de biomassas lignocelulósicas. Estes podem ser classificados em quatro grandes grupos: pré-tratamento físico (moagem, extrusão e etc), físico-químico (explosão a vapor, hidrotérmico, explosão com amônia e etc), químico (alcalino, ácidos, organosolve, AFEX, líquidos iônicos e etc) ou biológico (MOOD et al., 2013).

A escolha do pré-tratamento adequado depende da composição da biomassa empregada e das características finais desejáveis para esta biomassa. Cada pré-tratamento tem sua especificidade, vantagens e desvantagens, alterando de modo diferente a estrutura da biomassa. Por exemplo, pré-tratamentos ácido, explosão a vapor e hidrotérmico geralmente removem grande parte da hemicelulose (MOOD et al., 2013). Já os pré-tratamentos alcalinos e organosolve removem lignina, deixando a biomassa composta majoritariamente por celulose e hemicelulose (XU; HUANG, 2014). Em geral, deve-se escolher aquele que atenda aos requisitos cruciais em termos de rendimento e funcionalidade, bem como não ser um processo dispendioso. Se o pré-tratamento não for suficientemente eficiente, a biomassa não será facilmente hidrolisável e, por outro lado, se for muito severo, a geração de compostos inibitórios que inibem o metabolismo microbiano na etapa de fermentação pode ser significativa (BALAT, 2011).

Figura 2.3 – Efeito do pré-tratamento na matriz lignocelulósica



Fonte: Adaptado de Mood et al. (2013)

Para um pré-tratamento ser considerado eficiente e economicamente viável, visando à produção de bioálcoois deverá apresentar algumas características (LYND et al, 1999; SUN; CHENG, 2002; MOOD et al, 2013):

- Evitar a degradação dos carboidratos;
- Evitar a formação de produtos inibitórios prejudiciais aos microrganismos de fermentação;
- Remover a lignina da matriz lignocelulósica;
- Tornar a celulose altamente digerível aos agentes hidrolíticos na etapa de hidrólise.

Nesta tese foram estudados os pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino visando remover grande parte da hemicelulose e da lignina da biomassa empregada, uma vez que o objetivo é a produção de etanol e butanol da fração celulósica da palha de cana-de-açúcar.

2.4.1.1 Pré-tratamento hidrotérmico

Pré-tratamento hidrotérmico, ou também chamado autohidrólise, consiste em aplicar altas pressões e temperaturas (160 – 220 °C) para manter a água no estado líquido em contato com a biomassa por cerca de 5 a 20 minutos. A água penetra na biomassa, clivando os grupos acetil da cadeia de hemicelulose a ácido acético, que por sua vez atua como catalisador da reação (processo autocatalítico), promovendo a solubilização de grande parte das hemiceluloses e o rompimento das ligações glicosídicas dos polissacarídeos (XU; HUANG, 2014). Parte da lignina é solubilizada durante o pré-tratamento hidrotérmico, entretanto, uma das desvantagens é a recondensação de compostos solúveis da degradação da lignina na fração sólida da biomassa (ALVIRA et al., 2010).

As principais vantagens deste método são: não necessita do uso reagentes químicos e de reatores altamente resistentes a corrosão, sendo interessante do ponto de vista ambiental e econômico; aumenta a susceptibilidade da celulose durante a hidrólise enzimática e leva à mínima formação de produtos de degradação (MOSIER et al., 2005; PÉREZ et al., 2007). Por outro lado, uma das desvantagens é a baixa remoção de lignina.

Santos-Rocha et al. (2017) avaliaram o efeito diferentes condições de temperatura (180, 195 e 200 °C) e tempo (0 a 40 min) durante o pré-tratamento hidrotérmico na remoção de celulose, hemicelulose e lignina de palha de cana-de-açúcar. Sob as melhores condições

(195 °C e 15 min), foi obtida remoção significativa de hemicelulose (85 %) com baixa perda de celulose (21 %). Resultado similar foi obtido por Zakaria et al. (2016) que alcançaram remoção de 80 % de hemicelulose da fibra de óleo de palma quando submetida ao pré-tratamento hidrotérmico a 190 °C e 20 min. Além disso, foi observado que a dissolução da hemicelulose é mais pronunciada pelo aumento da temperatura do que por tempos de reação mais longos.

2.4.1.2 Pré-tratamento alcalino

Pré-tratamentos alcalinos são baseados na utilização de reagentes químicos com caráter básico, tais como: NaOH, Ca(OH)₂, KOH e amônia. São mais eficazes na remoção de lignina (deslignificação), exibindo menor solubilização de celulose em hemicelulose em relação aos processos ácidos e hidrotérmicos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; ALVIRA et al., 2010). Este pré-tratamento causa o inchaço das fibras lignocelulósicas e o rompimento da estrutura da lignina, levando a um aumento da área superficial total, diminuição do grau de polimerização dos polissacarídeos, além da separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos (XU; HUANG, 2014; KIM; LEE; KIM, 2016).

Com relação à outros pré-tratamento, o pré-tratamento alcalino opera em temperaturas e pressões mais amenas e, não requer reatores robustos ou resiste à corrosão (KIM; LEE; KIM, 2016). Por outro lado, umas das maiores desvantagens é a necessidade de neutralização do material deslignificado, recuperação do solvente químico utilizado, o que envolvem custos para o processo, além do inconveniente de alguns reagentes alcalinos serem convertidos em sais não recuperáveis ou incorporados como sais na biomassa (MOSIER et al., 2005).

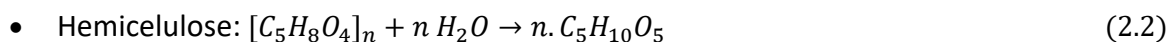
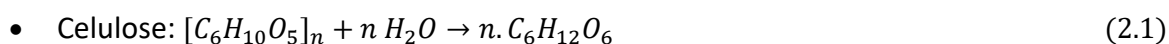
Pihlajaniemi et al. (2015) alcançaram em seus estudos com palha de trigo 80 % de remoção de lignina, após realização de pré-tratamento alcalino. O pré-tratamento alcalino foi conduzido com NaOH 12 % m/v, 10 % m/v de biomassa, a 140 °C por 1 hora. Sudiyani et al. (2016) também empregaram o pré-tratamento alcalino (NaOH 10 % m/v, 130 °C por 30 min), mas para o bagaço de sorgo. Ao fim do pré-tratamento, foi possível remover cerca de 77 % de lignina.

Pratto (2015) empregou o pré-tratamento hidrotérmico seguido de alcalino em palha de cana-de-açúcar. Foi reportado uma remoção total de lignina de quase 92 %. O pré-

tratamento hidrotérmico foi conduzido a 195 °C por 10 min e o pré-tratamento alcalino com NaOH 4 % m/v, a 121°C por 30 min.

2.4.2 Hidrólise enzimática

Hidrólise é referido à reação química de quebra de uma molécula liberando uma molécula de água. No caso da hidrólise das celuloses e hemiceluloses em açúcares fermentescíveis, a reação é representada pelas equações 2.1 e 2.2, respectivamente:



Os processos de hidrólise podem ser ácidos ou enzimáticos. O primeiro, ocorrem em velocidades mais rápidas que as reações enzimáticas. No entanto, a hidrólise ácida não é seletiva uma vez que os açúcares podem ser convertidos a produtos de degradação conforme a reação procede. Reações enzimáticas, por outro lado, tendem a ser mais eficientes devido à elevada especificidade, favorecendo a conversão de celulose em açúcares sem degradá-los. Em comparação com a hidrólise ácida, reações enzimáticas operam em condições mais brandas de pH e temperatura, além de não formar subprodutos tóxicos e inibitórios aos microrganismos da fermentação (BALAT, 2011; SUN; CHENG, 2002).

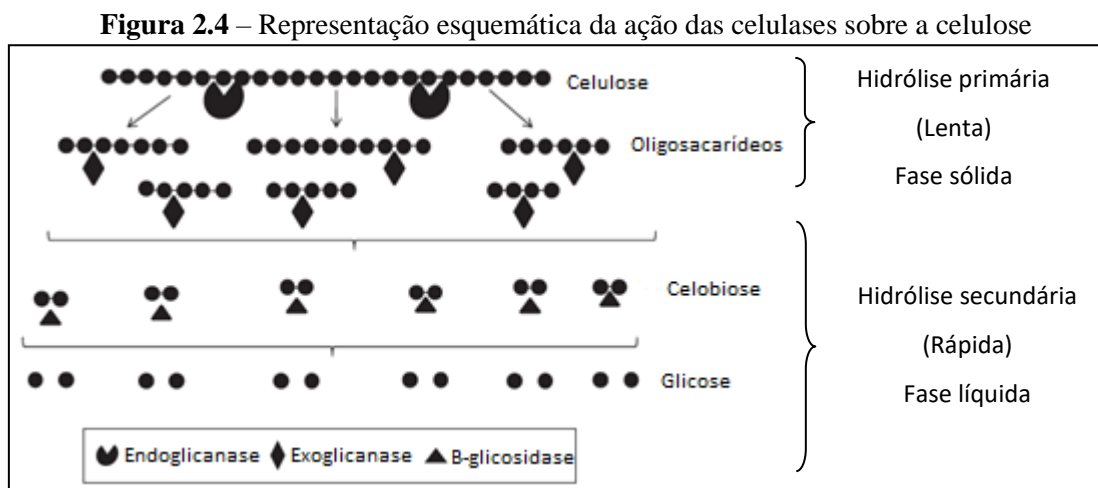
A hidrólise enzimática da celulose é realizada mediante a presença de enzimas altamente específicas, chamadas celulasas, que operam em condições amenas de pH (4,5 - 5) e temperatura (50 - 60 °C) (SUN; CHENG, 2002).

Embora a celulose seja um homopolímero, é necessário um complexo enzimático, para degradá-la. O complexo enzimático é formado por conjunto de pelo menos três grandes grupos de celulasas: endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases e β-glicosidases (BINOD et al., 2011).

A hidrólise enzimática das celuloses ocorre em duas etapas principais: a hidrólise primária, na fase sólida, envolvendo a ação da endo e exoglicanases e a hidrólise secundária, que ocorre na fase líquida, realizada pela exoglicanase e β-glicosidase. A hidrólise primária, por ser uma reação heterogênea, é considerada a etapa limitante do processo, pois a velocidade de reação é muito menor quando comparada com a hidrólise secundária, a qual ocorre em meio homogêneo (LI et al., 2004).

As endoglicanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise. Atacam randomicamente as regiões amorfas da fibra celulósica, liberando os oligossacarídeos com terminais redutores e não-redutores. Em seguida, as celobiohidrolases hidrolisam os oligossacarídeos liberando unidades de celobiose. São subdivididas em celobiohidrolases I, celobiohidrolases II e glicanohidrolases. Enquanto as celobiohidrolases I e II promovem a liberação de celobiose a partir dos terminais redutores e não-redutores, respectivamente, as glicanohidrolases liberam moléculas de glicose diretamente do polímero (PRATTO, 2015). Por fim, as β -glicosidases são responsáveis por hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis a glicose.

A Figura 2.4 mostra um esquema do mecanismo de ação das celulases na cadeia de celulose.



Fonte: Adaptado de Binod et al. (2011)

Apesar das vantagens apresentadas pela hidrólise enzimática, celulases geralmente sofrem inibição pelos seus produtos de hidrólise. Inibidores são espécies que interagem com as enzimas, tornando-as incapazes de catalisar a reação. Celobiose e glicose inibem as celobiohidrolases, endoglicanases e β -glicosidases (PRATTO, 2015).

Uma das maneiras de mitigar esse efeito é suplementar o complexo enzimático com β -glicosidase, a fim de promover um maior consumo de celobiose no meio reacional. Outra alternativa é a remoção dos açúcares ao passo que é formado durante a hidrólise. Essa estratégia pode ser realizada por meio de hidrólise e fermentação simultâneas, o que reduz significativamente a inibição das enzimas por glicose. Esse processo é abordado com mais detalhes no item 2.5.2.

A hidrólise da hemicelulose é realizada por um grupo de enzimas chamado xilanases. Da mesma forma, que as celulases, as xilanases são compostas por um conjunto de várias xilanases com especificidades diferentes. A completa degradação da hemicelulose requer a ação das seguintes enzimas: endo- β -(1,4)-xilanases clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas da cadeia principal de hemicelulose liberando os xilooligosacarídeos. Em seguida, as β -xilosidases atuam sobre a extremidade não redutora dos xilooligômeros liberando os monômeros de xilose. As enzimas α -arabinofuranosidase, α -glucuronidase e uma série de estereases são responsáveis por remover cadeias laterais de arabinose, ácido metilglucurônico, ácido ferúlico e p-cumárico (BINOD et al., 2011).

2.4.3 Fermentação

Após a etapa de hidrólise, os açúcares fermentescíveis estarão disponíveis para serem convertidos a álcool. O processo biológico que transforma esses açúcares em bioetanol e biobutanol é realizado por microrganismos, por meio da fermentação.

2.4.3.1 Fermentação visando à produção de etanol

A levedura *S. cerevisiae* é atualmente o microrganismo mais utilizado nos processos industriais de produção de etanol uma vez que não exige condições de processo complexas, apresenta elevada eficiência na fermentação das hexoses, tolerâncias ao etanol e a altas concentrações de açúcares e resistência à presença de inibidores (CANILHA et al., 2012). É um microrganismo aeróbio facultativo e sua melhor atuação se dá em temperaturas entre 30 e 34 °C e pH entre 4,5 e 5,5. Em meios aeróbios, o crescimento do microrganismo e a geração de CO₂ e água são favorecidos. Já em meios anaeróbios, a assimilação de açúcar segue uma via metabólica destinada a produção de etanol e CO₂ (REIS et al., 2013).

S. cerevisiae pode crescer facilmente em meios contendo açúcares simples como glicose ou dissacarídeos como maltose a sacarose. No entanto, sua capacidade de assimilar xilose é bastante limitada (QURESHI; HODGE; VERTÉS, 2014). Apesar de não metabolizar xilose, *S. cerevisiae* consegue fermentar seu isômero, a xilulose. Desta forma, o emprego desta levedura no aproveitamento de glicose e xilose presentes em matérias-primas lignocelulósicas deve vir acompanhado da isomerização de xilose, catalisada pela enzima

xilose isomerase, ou então utilizar estratégias de engenharia metabólica para viabilizar a assimilação de xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Algumas leveduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* e o fungo *Fusarium oxysporum* podem metabolizar xilose através da ação da xilose redutase, convertendo xilose em xilitol, e xilitol desidrogenase, convertendo xilitol em xilulose. No entanto, a aplicação desses microrganismos em escala industrial é limitada devido à baixa tolerância à altas concentrações de etanol, baixa velocidade de fermentação e maior sensibilidade a inibidores. Além disso, esses microrganismos não possuem a capacidade de fermentar vários tipos de carboidratos, o que deixa de ser interessante na produção de etanol 2G (OKAMOTO et al., 2014).

2.4.3.2 Fermentação visando à produção de butanol

Biobutanol pode ser produzido por uma variedade de microrganismos do gênero *Clostridium*. As espécies de bactérias *Clostridium* mais utilizadas na produção de biobutanol são *C. acetobutylicum*, *C. Beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* e *C. perbutyl-aceticum* (BANKAR et al., 2013; NDABA; CHIYANZU; MARX, 2015).

Clostridium são bactérias gram-positivas, esporuladas e anaeróbias estritas, atuando em seu melhor desempenho em temperaturas entre 30 e 40 °C e pH inicial de fermentação entre 6,5 e 7 (BANKAR et al., 2013). Esse gênero de bactéria apresenta uma grande vantagem por ser capaz de fermentar uma variedade de monossacarídeos, incluindo muitas hexoses e pentoses presentes em biomassas lignocelulósicas (RAGANATI et al., 2015).

A fermentação ABE ocorre em dois estágios: fase acidogênica, que ocorre durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, seguida pela fase solvatogênica ao final da fase exponencial e início da fase estacionária. Durante a fase acidogênica, as bactérias utilizam açúcares para o seu crescimento e as vias de formação de ácidos são ativadas para a produção de ácidos acéticos e butíricos, juntamente com gases dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂). Nesta etapa, o pH do meio cai de 6,5-7,0 para 4,5-5,0 e, em resposta à essa mudança, a via metabólica é direcionada para a produção de solventes. Na fase solvatogênica os ácidos produzidos são reassimilados para a biossíntese de Acetona-Butanol-Etanol. O ácido acético pode ser convertido a etanol ou acetona, enquanto o ácido butírico é convertido a butanol. O principal produto desta fase é o butanol, juntamente com uma mistura de acetona

e etanol, compondo uma proporção mássica 3:6:1 (considerando uma via metabólica normal) (BANKAR et al., 2013).

A presença dos solventes afeta a fluidez e as funções da membrana celular, assim, um dos desafios na fermentação ABE está em obter altas concentrações de butanol no meio reacional, visto que é um produto tóxico a célula, em que seu acúmulo de apenas 12 g/L já é o suficiente para inibir o crescimento celular bacteriano (KOLESINSKA et al., 2019; NIGAM; SINGH, 2011). Para mitigar este problema, deve-se realizar um processo de remoção do produto à medida que este vai sendo produzido.

Uma variedade de métodos tem sido avaliada para este fim, incluindo sistemas baseados em membrana, tais como pervaporação (O'BRIEN; ROTH; MCALOON, 2000), perstracção (QURESHI; MADDOX; FRIEDL, 1992), osmose reversa (GARCIA; IANNOTTI; FISCHER, 1986), adsorção (CARTÓN et al., 1998), extração líquido-líquido (QURESHI; MADDOX, 1995) e esgotamento com gases.

2.4.3.3 Destilação

Por fim, após a etapa de fermentação, os bioálcoois que se encontram diluídos, precisam ser concentrados através de operações unitárias. A destilação é o processo mais comum para este fim. Ao término da operação, obtém-se concentrações de bioálcoois dentro das especificações para serem comercializadas.

2.5 Estratégias e configurações de processo para a produção de bioálcoois

Diferentes configurações e estratégias de hidrólise enzimática e fermentação têm sido estudadas a fim de encontrar aquela, sob uma perspectiva global, que seja mais eficiente.

2.5.1 Hidrólise e Fermentação separadas

O processo de hidrólise e fermentação separado (SHF – do inglês, *Separated Hydrolysis and Fermentation*) é a configuração de processo mais antiga, sendo amplamente empregada nos dias atuais. No processo SHF, os polissacarídeos são primeiramente hidrolisados a açúcares fermentescíveis e, posteriormente, estes são conduzidos à reatores de fermentação onde o álcool será produzido.

A principal vantagem desta configuração é que cada processo pode ser executado sob suas condições ótimas, isto é, a hidrólise enzimática em torno de 50 °C, enquanto que a maioria dos microrganismos utilizados na produção de bioetanol e biobutanol toleram temperaturas de 30 a 40 °C (BANKAR et al., 2013; PAULOVA et al., 2015).

Por outro lado, as enzimas utilizadas na hidrólise enzimática (celulases e xilanases) são suscetíveis a inibição pelos seus produtos (glicose, xilose, celobiose), de modo que a velocidade de reação de hidrólise é progressivamente reduzida quando esses açúcares acumulam no meio reacional (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Esse efeito acontece principalmente quando é processada alta carga de biomassa uma vez que maiores concentrações de sólidos conduzem a elevadas concentrações de açúcar no hidrolisado. Além disso, no modo SHF, glicose e xilose produzidas durante a hidrólise devem ser separadas da fração sólida, o que normalmente leva à certa perda destes açúcares (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

2.5.2 Sacarificação e Fermentação Simultâneas

Para minimizar problemas relacionados à inibição das enzimas por açúcar, uma alternativa atraente é operar as etapas de hidrólise enzimática e fermentação concomitantemente em um único reator (SUN; CHENG, 2002; PAULOVA et al., 2015). Este processo é comumente denominado sacarificação (ou hidrólise) e fermentação simultâneas (SSF - do inglês, *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Enquanto as enzimas hidrolisam os polissacarídeos, os microrganismos rapidamente consomem os açúcares fermentescíveis e transformando-os em álcool (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008; SUN; CHENG, 2002). Em muitos casos, inibição das celulases por álcool também ocorre, entretanto de forma menos acentuada quando comparada com inibições por açúcar (BINOD et al., 2011).

O aumento da produtividade em produto, devido à diminuição do tempo global reacional (ALFANI et al., 2000; SHEN; AGBLEVOR, 2011) e a redução de custos com equipamentos, já que somente um reator é necessário (BALAT, 2011; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008), são os principais benefícios da estratégia de operação SSF.

No entanto, a principal limitação do processo SSF é operar em temperatura não ideal para a hidrólise enzimática (PAULOVA et al., 2015). A temperatura de hidrólise enzimática é tipicamente superior à da fermentação, de modo que a temperatura SSF é

ajustada em condições ideais para o microrganismo de fermentação. Por esta razão, SSF pode exibir menor teor de açúcares em comparação ao processo SHF (ASK et al., 2012; MESA et al., 2011). Alguns estudos relatam o uso de microrganismos termotolerantes, os quais são capazes de crescer e produzir concentrações satisfatórias de etanol ou butanol em temperaturas entre 40 °C e 50 °C (BEGUM; DAHMAN, 2015; CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2016).

Na Tabela 2.1 estão reunidos alguns estudos sobre a eficiência e produtividade de etanol e/ou butanol em processos SHF e SSF. Os estudos comparativos indicam que a estratégia SSF apresenta-se bastante promissora visando à produção de bioálcoois.

Tabela 2.1 – Comparação entre o processo SHF e SSF na produção de bioetanol e biobutanol reportados na literatura

| Biomassa | MO | Condições (Temperatura/Tempo) | | Principais resultados | Referência |
|--|---|-------------------------------|---------------|---|------------------------------|
| | | SHF | SSF | | |
| 8 % m/v de palha de trigo pré-tratada com explosão a vapor | 1 g/L de <i>S. cerevisiae</i> | 45 °C (120 h) + 35 °C (24 h) | 35 °C (120 h) | Eficiência global em etanol 59,3% (SHF) e 72,4% (SSF) | (ÖHGREN et al., 2007) |
| 10 % m/v de <i>Arundo donax</i> pré-tratada com explosão a vapor | 4g/L de <i>S. cerevisiae</i> VTT C-10880 | 45 °C (72 h) + 32 °C (24 h) | 32 °C (96 h) | Concentração e rendimento global em etanol 20,6 g/L e 0,27 g/g (SHF) 19 g/L e 0,24 g/g (SSF) | (ASK et al., 2012) |
| 20 % m/v de polpa de mandioca <i>in natura</i> | <i>S. cerevisiae</i> SHY08-3 | 50 °C (72 h) + 37 °C (48 h) | 37 °C (120 h) | Concentração, eficiência e produtividade em etanol 23,51 g/L; 43,13 %; 0,14 g/(L.h) (SHF) 34,67 g/L; 63,6 %; 0,29 g/(L.h) (SSF) | (ZHU et al., 2012) |
| 10 % m/v de espiga de milho | <i>Clostridium acetobutylicum</i> SE-1 | 50 °C (48 h) + 37 °C (72 h) | 37 °C (120 h) | Concentração e produtividade ABE 14,2 g/L e 0,12 g/(L.h) (SHF) 18,2 g/L e 0,15 g/(L.h) (SSF) | (ZHANG et al, 2013) |
| 10 % m/v de palha de milho pré-tratada com explosão a vapor | 2 g/L de <i>S. cerevisiae</i> (panificação) | 50 °C (72 h) + 33 °C (24 h) | 33 °C (96 h) | Concentração, eficiência e produtividade de etanol: 26,8 g/L; 65,33 % e 0,28 g/(L.h) (SHF) 28,4 g/L; 69,21 % e 0,30 g/(L.h) (SSF) | (RANA; ECKARD; AHRING, 2014) |
| 5 % m/v de carvalho <i>Quercus acutissima</i> | <i>Clostridium acetobutylicum</i> NBRC13948 | 50 °C (48 h) + 37 °C (120 h) | 37 °C (144 h) | Concentração ABE 15,45 g/L (SHF) 16,70 g/L (SSF) | (SASAKI et al., 2014) |

2.5.3 Pré-sacarificação seguida de Sacarificação e Fermentação Simultâneas

Uma outra possibilidade para a abordagem de processos simultâneos é a estratégia referida como pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas (PSSSF ou PSSF - do inglês, *Pre-saccharification (PS) followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*) ou semi-SSF (PAULOVA et al., 2015), que se destina a superar a limitação de operar em temperaturas não-ideais às utilizadas em processos SSF, aproveitando os benefícios de ambos os processos SHF e SSF.

O processo PSSSF compreende uma fase pré-hidrolítica, na qual as enzimas e a biomassa são adicionadas atuando sob condições ótimas para sacarificação enzimática e, após um determinado período, a temperatura de reação é reduzida àquela ideal para a etapa de fermentação e o microrganismo é adicionado, convertendo o processo PS em SSF (MESA et al., 2011; LU et al., 2013).

No processo SSF, a velocidade de produção de álcool é controlada pela velocidade de hidrólise da celulose. Sendo assim, realizar uma etapa de pré-hidrólise da biomassa na temperatura ótima de atuação do complexo enzimático pode favorecer o desempenho do processo SSF. Assim, é esperado que no processo PSSSF seja obtido maiores rendimentos de açúcar (taxa de hidrólise enzimática não é reduzida por uma temperatura subótima) (KÁDÁR; SZENGYEL; RÉCZEY, 2004) e maiores concentrações de álcoois (produção de álcool não está limitada por uma baixa concentração de fonte de carbono) (PAULOVA et al., 2015) do que nos processos SSF e SHF, se um tempo de pré-hidrólise adequado for selecionado.

Shen e Agblevor (2011) aplicaram as estratégias SHF, SSF e PSSF empregando celulose microcristalina (Avicel PH101) para produção de etanol. Quatro casos foram estudados: 48 h de hidrólise + 24 h de fermentação (SHF), 72 h de SSF (SSF); 24 h de pré-hidrólise + 48 h SSF (PSSF 24), 12 h de pré-hidrólise + 60 h SSF (PSSF 12). Em ordem decrescente, a eficiência global em etanol e produtividade global em etanol foram as seguintes: PSSF 24 (78,5 % e 0,094 g/(L.h)); SHF (72,1 % e 0,086 g/(L.h)); PSSF 12 (71,7 % e 0,086 g/(L.h)); SSF (69,8 % e 0,084 g/(L.h)).

Lu et al. (2013) verificaram que a inclusão de uma etapa de pré-sacarificação (18 ou 24 h) teve um efeito positivo no rendimento de etanol de junco pré-tratado hidrotermicamente, quando comparado ao SSF sem adição de pré-hidrólise. Neves; Pitarelo; Ramos (2016) observaram que PSSF com 12 h de pré-sacarificação proporcionou melhor

produtividade global de etanol de bagaço de cana-de-açúcar, quando comparada aos processos SHF e SSF. Por outro lado, López-Linares; et al. (2014) destacaram que a adição de 24 h de pré-sacarificação antes do processo SSF não melhorou a eficiência em etanol. Além do mais, a configuração SHF apresentou-se como a mais eficiente.

Assim, encontrar um compromisso entre as vantagens dos processos SHF e SSF requer determinar um tempo ideal de pré-hidrólise antes da etapa SSF, uma vez que sua duração impacta na eficiência, produtividade e concentração final de etanol (PAULOVA et al., 2015).

2.5.4 Bioprocesso Consolidado

O termo Bioprocesso Consolidado integra todas as etapas necessárias de transformação de biomassa em bioálcool. Esta estratégia difere das outras já mencionadas pois é utilizado apenas um tipo de microrganismo ou consórcio de microrganismos capazes de produzir enzimas, hidrolisar a biomassa e produzir álcool em um único reator (ZHANG; ZHANG, 2010).

As vantagens da aplicação do bioprocesso consolidado vão da sua simplicidade de operação até a ausência de custos envolvidos na compra de enzimas, sendo uma estratégia interessante para a produção efetiva de bioálcoois a partir de lignocelulósicos. A seleção de uma cepa microbiana capaz de produzir enzimas hidrolíticas e converter biomassa em altas concentrações de etanol e/ou butanol ainda é um grande desafio (PAULOVA et al., 2015).

Duas alternativas podem ser seguidas para a obtenção de microrganismos adequados: a primeira envolve a adaptação de organismos naturalmente produtores de bioálcoois a fim de torná-los capazes de produzir também celulasas e hemicelulasas; a segunda segue o caminho oposto, ou seja, modifica excelentes produtores de celulasas e hemicelulasas para também serem eficientes produtores de bioálcoois (SILVA, 2010).

Embora um grande número de microrganismos recombinantes tenha sido desenvolvido (WEN; SUN; ZHAO, 2010; CHUNG et al., 2014; AMOAH et al., 2017) na tentativa de exibir expressões genéticas de enzimas celulolíticas para a produção direta de etanol, a produção de etanol é muito baixa (< 5 g/L), o que torna o Bioprocesso Consolidado ainda é um enorme desafio para a engenharia genética e biologia de sistemas.

Os desafios também são os mesmos para a produção ABE, Petitdemange et al. (1983) e Fond et al. (1983) usaram coculturas mesofílicas de cepas *Clostridium* celulolíticas

(*C. cellulolyticum* H10) e glicolíticas (*C. acetobutylicum*) para a fermentação direta de celulose a butanol. No entanto, o principal produto de fermentação formado foi ácido butírico, com uma pequena quantidade de acetona, butanol e etanol.

2.5.5 Operação em modo batelada alimentada

A etapa mais desafiadora na produção de biocombustíveis e que, geralmente, determina a eficiência global do processo, é a hidrólise enzimática. Em processos de hidrólise enzimática com alta carga de biomassa normalmente são geradas concentrações mais elevadas de açúcares durante a reação (o que é desejado). No entanto, os açúcares solúveis se acumulam rapidamente no meio de reação, causando inibição enzimática nos estágios iniciais de hidrólise. Além disso, processar altas cargas iniciais de biomassa leva a uma redução de água livre do sistema, resultando em meios reacionais com alta viscosidade (HUANG et al., 2011; MODENBACH; NOKES, 2013). Alta viscosidade durante a hidrólise representa desafios mecânicos relacionados à mistura e consumo de potência (CORRÊA; BADINO; CRUZ, 2016), ocasionando limitações de transferência de calor e massa que dificultam o desempenho ideal e a distribuição uniforme das enzimas, respectivamente (FOCKINK et al., 2017).

Estratégias que empregam a operação em modo batelada alimentada são bastante interessantes, pois reduzem a carga inicial de substrato e melhoram a transferência de calor e massa, promovendo reações de hidrólise e fermentação mais rápidas e eficientes.

Zhu et al. (2012) compararam modos de operação batelada e batelada alimentada para os processos SHF e SSF para a produção de etanol a partir de polpa de mandioca. Nos processos em batelada (20 % de carga inicial de sólidos), as concentrações finais de etanol foram de 23,51 g/L (SHF) e 34,67 g/L (SSF). Nos processos operando no modo batelada alimentada (12 % de carga de sólidos inicial, mais duas adições de 4 % de sólidos), a produção de etanol do SHF e SSF aumentaram para 29,39 e 43,25 g/L, respectivamente, representando um aumento de 25 % em ambos os processos quando comparados ao modo batelada.

Corrêa; Badino; Cruz (2016) verificaram um aumento de 31 % na concentração final de glicose quando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado a explosão a vapor foi hidrolisado em modo batelada alimentada (4 adições de sólidos ao longo do experimento de 5

% m/v, totalizando 20 % de carga de sólidos) em comparação a estratégia batelada simples realizada com a mesma carga de sólidos.

Estudos de Santos-Rocha et al. (2018) também observaram um aumento na concentração final de glicose quando o reator de hidrólise enzimática, processando palha-de-cana-de-açúcar, foi operado no modo batelada alimentada. Além disso, os autores verificaram que alimentações mais distribuídas de sólidos durante a reação de hidrólise proporcionaram maior conversão de celulose a glicose.

No entanto, para obter resultados satisfatórios em processos operando em batelada alimentada é essencial definir um perfil de alimentação de substrato baseado em critérios racionais. Unrean; Khajeeram; Laoteng (2016) desenvolveram um modelo do processo SSF integrando o fluxo metabólico de *S.cerevisiae* associado às cinéticas de fermentação e hidrólise enzimática para obter respostas dinâmicas do processo SSF. A abordagem foi utilizada para analisar a influência das estratégias de alimentação na eficiência da produção de etanol e para definir um perfil ótimo de alimentação de bagaço pré-tratado. Ao usar o modelo de perfis de alimentação para substratos e células, obteve-se uma produção de etanol de 65 g/L (85 % de rendimento teórico). O processo em batelada alimentada melhorou o rendimento e a produtividade em etanol 47 e 41 %, respectivamente, quando comparado com o processo em batelada.

Cavalcanti-Montão et al. (2013) definiram políticas ótimas de alimentação de substrato e/ou enzima para o reator de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, seguindo modelos cinéticos de Michaelis-Menten com inibição por glicose. O problema de otimização seguiu duas abordagens diferentes: a primeira abordagem aplicou a teoria clássica de controle ótimo. A segunda política foi definida com o objetivo de manter altas velocidades de produção de glicose, adicionando enzima e substrato simultaneamente durante a reação. Com as estratégias implementadas foi possível alcançar concentrações finais de glicose entre 160 e 200 g/L.

2.6 Considerações finais

As biomassas lignocelulósicas têm o potencial para contribuir consideravelmente com a demanda global de energia, superando a excessiva dependência de combustíveis líquidos derivados do petróleo, agregando sustentabilidade sócio-econômico-ambiental.

No entanto, apesar das intensas pesquisas voltadas à produção de biocombustíveis por meio de resíduos lignocelulósicos, ainda persistem desafios técnico-econômicos que tornam os processos de produção de etanol 2G e biobutanol não viáveis em larga escala até o presente momento, o que é típico de processos inovadores.

Diante de algumas lacunas relacionadas às etapas de hidrólise e fermentação, a concepção deste trabalho surgiu da motivação em contribuir com os processos de produção de etanol 2G e biobutanol na tentativa de aumentar a eficiência do processo sob uma perspectiva global, seja aumentando a concentração final de produto e/ou diminuindo o consumo de enzima, tornando as relações enzima:substrato:produto mais favoráveis.

Capítulo 3: MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção está descrito todo o material e metodologias empregados nos estudos apresentados nos capítulos 4, 5 e 6. Serão apresentadas as metodologias de análise da biomassa, preparação da biomassa antes de ser submetida aos experimentos de hidrólise e fermentação, caracterização da atividade enzimática das celulasas e metodologia de quantificação dos compostos de interesse produzidos nas etapas de hidrólise e/ou fermentação. Resultados relacionados a caracterização e pré-tratamento da biomassa, e caracterização da enzima também são apresentados neste capítulo.

3.1 Enzima

Utilizou-se o complexo enzimático comercial de celulasas Cellic®CTec2 doado pela Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil). De acordo com o catálogo do fabricante, o extrato enzimático é formado por uma mistura de celulasas (endocelulasas e celobiohidrolases), com alta carga de β -glicosidase, além de apresentar também hemicelulasas. Esse complexo enzimático possui maior atividade em uma faixa de temperatura de 45 a 50 °C e pH 5,0 a 5,5.

3.1.1 Determinação da atividade enzimática das celulasas

A atividade enzimática da Cellic®CTec2 foi determinada de acordo com o procedimento analítico de Ghose (1987), descrito em detalhes por Pratto (2015).

O procedimento baseia-se em encontrar a concentração de uma solução de enzima de interesse que libere 2,0 mg de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise de 50 mg de papel filtro de celulose Whatmann n° 1 durante 60 minutos de reação usando uma alíquota de 0,5 mL da solução de enzima. A atividade enzimática das celulasas é expressa em unidades de papel filtro – FPU (*Filter Paper Units*) por mL do extrato de enzima. O complexo enzimático empregado nos experimentos apresentou atividade enzimática de 241 FPU/mL. Valor correspondente aos encontrados por Mendes; Rocha; Grac, (2014) e Rodrigues et al. (2015).

Este valor foi adotado para todos os experimentos envolvendo hidrólise enzimática e, com ele, foi possível calcular o volume necessário de enzima a ser adicionada em cada experimento.

3.2 *Substrato*

A palha de cana-de-açúcar utilizada neste trabalho foi proveniente da Usina Ipiranga, localizada na cidade de Descalvado-SP (Brasil). O material, depois de seco em temperatura ambiente, foi moído a 5 mesh (4 mm), separado em sacos plásticos e armazenado em freezer para evitar possíveis contaminações.

Neste trabalho considera-se palha como sendo uma mistura de folhas verdes, secas e ponteiros do cultivo da cana-de-açúcar.

Inicialmente, a biomassa foi submetida a uma etapa de pré-tratamento hidrotérmico antes de ser utilizada nos experimentos de hidrólise e fermentação. Esse pré-tratamento foi padrão para todos os experimentos dos capítulos 4 e 6. Nos ensaios realizados no capítulo 5, além de submetida ao pré-tratamento hidrotérmico, a biomassa passou por deslignificação utilizando pré-tratamento alcalino com NaOH. A descrição do procedimento experimental do pré-tratamento alcalino, bem como a composição química da biomassa deslignificada são apresentadas no capítulo 5.

3.2.1 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar *in natura*

A palha de cana-de-açúcar *in natura* foi submetida a um pré-tratamento antes de ser utilizada nos experimentos de hidrólise e fermentação. Foi utilizado o pré-tratamento hidrotérmico que teve por objetivo remover parte da fração hemicelulósica e lignina.

O pré-tratamento foi realizado em um reator de aço inoxidável de 5,5 L (modelo 4584, Parr Instrument Company, Moline, IL, EUA) equipado com agitador, aquecedor e controlador de temperatura. Amostras de palha seca (4 mm de tamanho de partícula) foram adicionadas ao reator e misturadas com água destilada na proporção 1:10 ($m_{\text{palha seca}}/V_{\text{água}}$) no interior do reator. O sistema foi aquecido até 195 °C e agitado a 200 rpm por 10 minutos. Depois de completar o processo, o reator foi resfriado até 40 °C. O sólido foi então separado da fração líquida por filtração. Finalmente, a fração sólida foi lavada com água a temperatura ambiente para remover o conteúdo solubilizado, até se atingir pH próximo de neutro.

As condições operacionais utilizadas para a realização do pré-tratamento foram determinadas previamente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (LaDABio-DEQ/UFSCar), sendo elas consideradas como as melhores condições de trabalho para o pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar (BATISTA et al., 2019; SANTOS-ROCHA et al., 2017).

Para determinar a porcentagem de palha que foi solubilizada após o pré-tratamento, calculou-se o rendimento mássico através da equação (3.1).

$$R = \left(\frac{m_{final}}{m_{inicial}} \right) * 100 \quad (3.1)$$

onde: $m_{inicial}$ é a massa inicial seca de material lignocelulósico, em (g);

m_{final} é a massa final seca de material lignocelulósico, em (g);

R é o rendimento mássico (%)

Depois de realizado o pré-tratamento, amostras de palha pré-tratada foram coletadas para a caracterização química.

3.2.2 Caracterização química da palha de cana-de-açúcar in natura e pré-tratada

A palha de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada foram caracterizadas, quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, seguindo os procedimentos analíticos descritos por Rocha et al., (1997) e validados por Gouveia et al., (2009). A caracterização química foi realizada em triplicata.

Inicialmente, amostras de 1 g (massa seca) de palha *in natura* sem extrativos e palha pré-tratada (ambas moídas a 20 mesh) foram transferidas para béqueres de 100 mL. Em seguida, adicionou-se à cada béquer 10 mL de ácido sulfúrico 72 % (v/v) previamente aquecido a 45 °C. A mistura de palha com ácido foi então misturada vigorosamente durante 7 min, sob temperatura de 45 °C.

Ao término da reação de hidrólise ácida, o conteúdo foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 500 mL com a adição de 275 mL de água destilada. Por fim, os frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121 °C, a fim de hidrolisar os oligômeros remanescentes.

Após a finalização do processo de autoclavagem, os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro qualitativo (previamente, pesado e seco em estufa a 100°C) diretamente em um balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume completado com água destilada de lavagem do material retido no filtro. A solução contida no balão volumétrico foi armazenada para posteriores análises de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel.

A fração sólida retida no papel filtro foi lavada exaustivamente com aproximadamente 2,0 L de água destilada para posterior determinação de lignina insolúvel e cinzas da lignina.

3.2.2.1 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose

O teor de celulose e hemicelulose foi determinado através da quantificação dos compostos presentes no hidrolisado – glicose, celobiose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetilfurfural – por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a identificação de açúcares e ácidos orgânicos, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, equipado com um detector de índice de refração RID-10A e coluna Aminex HPX-87H, sob as seguintes condições: fase móvel H₂SO₄ 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min e temperatura do forno de 65 °C.

Na determinação de furfural e hidroximetilfurfural foi utilizada uma coluna μ -Bondapak C-18 (5 μ m). O cromatógrafo foi equipado com um detector UV-visível Shimadzu SPD-10 (276 nm), sob as seguintes condições de operação: fase móvel ACN: H₂O na proporção 1:8 e 1 % de ácido acético, em vazão de 0,8 mL/min e temperatura do forno de 25 °C.

A quantificação de cada composto foi efetuada por meio da construção de curvas de calibração construídas para cada um dos componentes analisados.

Para a determinação do teor de celulose e hemicelulose presentes nas amostras, utilizaram-se das equações 3.3 e 3.4, respectivamente.

$$\% \text{ Celulose} = \% \text{ Gli} * 0,9 + \% \text{ Cel} * 0,95 + \% \text{ A. F} * 3,09 + \% \text{ HMF} * 1,29 \quad (3.3)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \% \text{ Xil} * 0,88 + \% \text{ Ara} * 0,88 + \% \text{ A. A} * 0,7 + \% \text{ Fur} * 1,38 \quad (3.4)$$

onde: Gli: glicose; Cel: celobiose; A.F: ácido fórmico; HMF: hidroximetilfurfural; Xil: xilose; Ara: arabinose; A.A: ácido acético; Fur: furfural.

Os fatores de conversão se referem à relação entre a massa molar de cada componente e seu respectivo polissacarídeo (celulose ou hemicelulose).

3.2.2.2 Determinação do teor de lignina solúvel

A quantidade de lignina presente no hidrolisado foi analisada por espectrometria na região UV do espectrofotômetro.

Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e adicionados 1,5 mL de NaOH 6,5 N. O volume do balão foi devidamente aferido com água destilada e homogeneizado. Por fim, a quantidade de lignina presente no hidrolisado foi analisada por espectrometria na região UV espectrofotômetro (UV-visível Ultrospec-2000), fazendo leituras de absorvância a 280 nm.

O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a equação 3.2 (ROCHA et al., 2012).

$$\text{Lignina solúvel (g/L)} = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (3.2)$$

onde:

A_T : absorvância da amostra;

$A_{pd} = C_1 \cdot \epsilon_1 + C_2 \cdot \epsilon_2$ – absorvância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações C_1 e C_2 foram determinadas previamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L/(g.cm).

3.2.2.3 Determinação do teor de lignina insolúvel

O teor de lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason, modificado por Rocha et al. (1997).

O papel filtro contendo a fração sólida foi transferido para um pesa filtro previamente tarado e colocado em estufa a 105 °C até massa constante.

A porcentagem de lignina insolúvel foi calculada conforme equação 3.5.

$$\% Lig_{insol} = \frac{M_{lig\ insol} - M_{cinzas\ da\ lignina}}{M_{amostra\ seca}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

onde: $M_{lig\ insol}$: massa de lignina insolúvel seca (g); $M_{cinzas\ da\ lignina}$: massa de cinzas contida na lignina insolúvel (g); $M_{amostra\ seca}$: massa da amostra de palha seca (g).

A metodologia para quantificação das cinzas da lignina é encontrada no item 3.2.2.3.1.

3.2.2.3.1 Determinação do teor de cinzas presentes na lignina

Após a determinação da lignina insolúvel, o papel filtro contendo amostra seca, foi transferido para um cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi calcinada a 300 °C por 30 minutos e, em seguida, a 800 °C por 2 horas.

Por diferença de massa, o teor de cinzas presentes na lignina insolúvel foi determinado conforme a equação 3.6.

$$\% Cinzas = \frac{M_{cinzas\ da\ lignina}}{M_{amostra\ seca}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

onde: % cinzas: percentual em massa de cinzas na lignina; $M_{cinzas\ da\ lignina}$: massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio).

3.2.2.4 *Determinação do teor de cinzas totais*

Para a determinação do teor de cinzas totais, pesou-se 1 g de palha seca em cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi calcinada a 300 °C por 30 minutos e, em seguida, a 800 °C por 2 horas. Por diferença de massa, o teor de cinzas totais foi determinado conforme a equação 3.7.

$$\% Cinzas_{totais} = \frac{M_{cinzas\ totais}}{M_{amostra\ seca}} \cdot 100 \quad (3.7)$$

onde: $M_{cinzas\ totais}$ é diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio.

3.2.2.5 Determinação do teor de extrativos

A determinação do teor de extrativos foi realizada somente para amostras de palha *in natura*, visto que durante o pré-tratamento os extrativos são solubilizados.

O procedimento de determinação de extrativos foi baseado no protocolo proposto pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), “*Determination of Extractives in Biomass*” (SLUITER et al., 2008). Além da quantificação dos extrativos, esta etapa tem como finalidade remover os componentes não estruturais (ceras, clorofila, nitratos/nitritos e proteínas) da biomassa antes da quantificação de lignina e dos carboidratos, para que não haja interferência nessas etapas analíticas.

Uma quantidade conhecida de palha *in natura* foi adicionada em um cartucho e colocada em um sistema de extração (Soxhlet – Diogolab). Em um balão extrator foram adicionados 400 mL de etanol 95%. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento foi ajustado para fornecer um ciclo mínimo de 6 sífões por hora. O sistema de extração ficou ligado até que não houvesse mais extração (líquido incolor). O álcool contendo os extrativos foi colocado em um rotaevaporador na temperatura de 50 °C, até evaporação total do solvente.

O balão contendo os extraíveis foi colocado em estufa a 60 °C até se obter massa constante. A massa de palha remanescente no cartucho foi colocada em uma placa de Petri, previamente tarada, e deixada em estufa a 60 °C até se obter massa constante.

O percentual de extrativos contidos na biomassa pode ser calculado de duas maneiras: por diferença de massa do balão extrator com extrativos e sem extrativos e por diferença de massa do cartucho antes e depois de realizada a extração, conforme equações 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{m_{\text{balão com extrativo}} - m_{\text{balão sem extrativo}}}{m_{\text{palha seca adicionada}}} \right) \cdot 100 \quad (3.8)$$

Ou

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{m_{\text{cartucho com extrativo}} - m_{\text{cartucho sem extrativo}}}{m_{\text{palha seca adicionada}}} \right) \cdot 100 \quad (3.9)$$

Os valores obtidos na caracterização química da palha de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Composição química da palha *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente.

| Componente | Palha <i>in natura</i> | Palha pré-tratada |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Celulose (%) | 34,23 ± 0,34 | 54,72 ± 0,32 |
| Hemicelulose (%) | 24,21 ± 0,31 | 8,21 ± 0,05 |
| Lignina (%) | 19,65 ± 0,40 | 26,70 ± 0,94 |
| Cinzas (%) | 6,70 ± 0,18 | 6,69 ± 0,07 |
| Extrativos (%) | 8,31 ± 0,01 | - |
| Rendimento* (%) | - | 50,5 |
| Total (%) | 93,10 | 96,32 |

* Calculado de acordo com a equação (3.1)

As composições químicas das palhas de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada hidrotermicamente obtidas no presente estudo apresentaram-se bastante similar aos valores reportados na literatura (Da Silva et al. 2010; Oliveira et al. 2014; Szczerbowski et al. 2014).

3.3 *Quantificação dos compostos produzidos nas etapas de hidrólise e/ou fermentação*

Glicose, celobiose, xilose, etanol e ácido acético foram quantificados por CLAE, utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, equipado com um detector de índice de refração RID-10A e coluna Aminex HPX-87H, sob as seguintes condições: fase móvel H₂SO₄ 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min e temperatura do forno de 65 °C.

Para a construção da curva de calibração de cada analito, foram preparadas soluções padrões para cada composto de interesse em concentrações variando de 0,25 a 10 g/L e a partir daí diferentes diluições foram realizadas. Com a equação da reta ajustada, calculou-se a concentração dos analitos em cada amostra.

Capítulo 4: PRÉ-SACARIFICAÇÃO SEGUIDA DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA: OTIMIZAÇÃO MULTI-CRITÉRIO

Este capítulo teve como objetivo encontrar um equilíbrio entre eficiência e produtividade global na produção de etanol a partir de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente submetida à pré-sacarificação (PS), seguida de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Para fins de otimização multicritério, foram aplicadas ferramentas de planejamento experimental e função desejabilidade. Os experimentos de PS foram realizados avaliando efeitos da concentração de enzima, concentração de biomassa e tempo de PS. Após cada ensaio PS, a etapa SSF foi executada durante 24 h. O desempenho global do processo (PSSSF) foi avaliado com base na eficiência global e na produtividade global em etanol. Dosagem enzimática de 29 FPU/g_{celulose}, carga de biomassa de 19,3 % m/v e tempo de PS de 33 horas permitiram alcançar uma eficiência de celulose a etanol de 73 %, resultando em uma concentração de etanol de 44,03 g/L em 45 horas de tempo global (PS + SSF) de processamento.

4.1 Introdução

Processar altas cargas de biomassa em tempo de reação viável, ao mesmo tempo que se obtém níveis satisfatórios de eficiência e produtividade nas etapas de hidrólise e fermentação, é de suma importância para uma produção efetiva de bioetanol. No entanto, encontrar um processo eficiente pode ser um desafio, já que critérios conflitantes precisam ser resolvidos.

Dentre as inúmeras possibilidades e combinações de estratégias de hidrólise e fermentação, o processo de pré-sacarificação seguido de sacarificação e fermentação simultâneas (PSSSF) é uma alternativa bastante atrativa, conforme já descrito no Capítulo 2: - item 2.5.3.

Muitos estudos (Ishola et al., 2013; Santos et al., 2012; Xiros e Olsson, 2014; Zhang et al., 2014), na tentativa de otimizar a produção de etanol através do processo PSSSF, empregaram tempos específicos de pré-hidrólise. Entretanto, uma avaliação sistemática de sua relação com os principais parâmetros do processo deveria ser antecedida de qualquer análise

de eficiência, uma vez que o tempo de pré-hidrólise é um dos fatores que mais influenciam no desempenho global do processo (PAULOVÁ et al., 2014).

O uso do planejamento experimental é uma técnica valiosa para determinar a influência simultânea e/ou individual de todas as variáveis consideradas no processo, buscando um cenário otimizado. Além disso, quando o sistema envolve mais de uma resposta, a otimização multicritério é altamente recomendada. Nesse sentido, a abordagem de função desejabilidade, como apresentada por Derringer e Suich (1980), é uma ferramenta bastante útil que consiste em unir todas as respostas em uma única medida e levá-las a um certo grau de conformidade. Essa técnica transforma uma resposta estimada em um valor, chamado de desejabilidade, que varia de 0 a 1, e aumenta à medida que a desejabilidade da resposta global se aproxima de 1 (KIM; KWANG-JAE; LIN, 2000). Estudos aplicados na produção de etanol 2G (DAGNINO et al., 2013; MESA et al., 2017; OLIVEIRA RIBEIRO; SILVA LIMA; ARAÚJO MORANDIM-GIANNETTI, 2018) mostraram que essa metodologia é eficaz para fins de otimização, quando várias respostas são exploradas simultaneamente.

De acordo com o cenário apresentado, o presente trabalho utilizou-se de técnicas de planejamento experimental combinado à função de desejabilidade para otimizar um sistema multicritério onde um equilíbrio entre eficiência e produtividade global em etanol é visado. O processo PSSF tem sido proposto como estratégia para a produção de bioetanol a partir da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente. Esta abordagem pretende identificar o conjunto de variáveis de entrada (dosagem de enzima, carga de biomassa e tempo de pré-sacarificação) que maximiza um grau de satisfação geral (decisão multicritério) em relação a todas as variáveis resposta estudadas (eficiência global de etanol e produtividade em etanol).

4.2 *Material e métodos*

4.2.1 Substrato e complexo enzimático

O substrato e o complexo enzimático empregados nos experimentos foram descritos nos itens 3.1 e 3.2.

4.2.2 Microrganismo e preparo do inóculo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* industrial na forma liofilizada (Y-904, AB Brasil, Pederneiras, SP, Brasil) foi utilizada nos experimentos de SSF empregando palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente. A ativação da levedura *S.cerevisiae* foi feita em frascos de Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 40 g/L de glicose) em uma incubadora agitada (Marconi MA-830) sob temperatura de 34 °C e 250 rpm. Depois de 6 horas de cultivo, o meio foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) e as células (aproximadamente 2,5 g_{massa seca}/L) foram inoculadas ao pré-hidrolisado de palha de cana-de-açúcar.

4.2.3 Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultânea

Experimentos de PS foram primeiramente estudados empregando um planejamento experimental, a fim de assegurar de forma estatisticamente significativa as condições operacionais que resultam em maiores valores de eficiência global em etanol e produtividade global de etanol.

Ao final de cada ensaio do planejamento experimental referentes à etapa PS, o hidrolisado foi suplementado com (g/L): extrato de levedura (6,8), MgSO₄ (1,4), K₂HPO₄ (5,6) e ureia (5,32) (SONEGO et al., 2014). A temperatura foi reduzida de 50 °C para 40 °C e a levedura foi inoculada (2,5 g/L), convertendo o processo PS em um SSF, o qual foi executado durante 24 h. Todo o processo é referido como PSSSF (PS + SSF).

Os experimentos foram realizados em reatores de escala de bancada de 200 mL com 50 mL de meio reacional a pH 5,5 (tampão citrato 50 mM) e agitação de 250 rpm. Alíquotas do meio reacional foram retiradas periodicamente e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos para posterior análise de glicose e etanol.

4.2.4 Planejamento experimental

Para fins de otimização, foram avaliados os efeitos da concentração de enzima (C_E), concentração de biomassa (C_B) e tempo de pré-sacarificação (t_{PS}) por meio de planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O número total de experimentos foi $2^K + 2.K + n_{cp}$, onde K é o número de variáveis independentes e n_{cp}

é o número de repetições no ponto central (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Assim, a matriz experimental incluiu 2^3 pontos fatoriais, 2 x 3 pontos axiais e 6 repetições no ponto central, totalizando 20 experimentos.

A Tabela 4.1 indica os níveis das variáveis do planejamento experimental.

Tabela 4.1 – Níveis das variáveis independentes do processo de pré-hidrólise utilizados no planejamento DCCR.

| Variáveis Independentes | Símbolo | Níveis | | | | |
|--------------------------------------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
| C_E (FPU/g _{celulose}) | X_1 | 10,00 | 14,05 | 20,0 | 25,95 | 30,00 |
| C_B (% $m_{biomassa}/V_{reação}$) | X_2 | 5,00 | 9,05 | 15,00 | 20,95 | 25,00 |
| t_{ps} (h) | X_3 | 6,00 | 13,30 | 24,00 | 34,7 | 42,00 |

A eficiência global em etanol e produtividade global de etanol foram as variáveis-resposta consideradas no estudo do processo PSSSF.

Os níveis das variáveis independentes foram definidos com base em estudos da literatura (MANZANARES ET AL., 2011; HOYER ET AL., 2013; LU ET AL., 2013; CAVALAGLIO ET AL., 2016).

4.2.5 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados utilizando o software Statistica® 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), através de análises dos principais efeitos em termos lineares e quadráticos, interações entre variáveis, superfícies de resposta e análise de variância (ANOVA), considerando um nível de confiança de 95 %.

Uma equação de regressão polinomial de segunda ordem (Eq. (4.1)) foi proposta para descrever a relação de cada variável independente com a resposta.

$$y_i = a_0 + \sum_{j=1}^K a_j \cdot X_j + \sum_{j \neq m}^K b_{jm} X_j X_m + \sum_{j=1}^K b_{jj} X_j^2 \quad (4.1)$$

onde: y_i é a resposta experimental para as variáveis-resposta; a_0 é uma constante, X é o conjunto de parâmetros operacionais normalizados; a_j 's é o conjunto de coeficientes dos

termos lineares; b_{jm} 's é o conjunto de coeficientes associados às interações entre as variáveis; b_{jj} 's é o conjunto de coeficientes associados às interações quadráticas para uma mesma variável e K é o número de variáveis independentes.

Todos modelos obtidos durante as análises estatísticas estão apresentados na forma codificada, ou seja, os coeficientes são obtidos a partir das variáveis na forma codificada $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$, conseqüentemente para se obter um valor real de uma variável-resposta é necessário substituir na equação os valores dos parâmetros operacionais em sua forma codificada.

Os modelos ajustados foram utilizados para definir condições operacionais que maximizam separadamente e simultaneamente as variáveis-resposta. A qualidade dos modelos ajustados foi expressa pelo coeficiente R^2 . O modelo foi validado aplicando ANOVA considerando um intervalo de confiança de 95 %.

4.2.6 Otimização multicritérios

Para maximizar simultaneamente todas as respostas aqui consideradas, foi realizada uma otimização multiobjetivo usando a função de desejabilidade geral (D), proposta por Derringer e Suich (1980). A função de desejabilidade geral é uma combinação de todas as respostas em um único índice.

Como primeiro passo, cada resposta y_i é convertida em uma função individual de desejabilidade $d(y_i)$, que varia entre $d(y_i) = 0$ (resposta indesejável) e $d(y_i) = 1$ (resposta completamente desejável).

Neste trabalho, ambas as variáveis-resposta consideradas devem ser maximizadas. Assim $d(y_i)$ poderia ser calculada conforme a Eq. 4.2.

$$d(y_i) = \begin{cases} 0 & y_i < L \\ \left(\frac{y_i - LL}{UL - LL} \right)^s & L \leq y_i \leq T \\ 1 & y_i > T \end{cases} \quad (4.2)$$

onde y_i são os valores de resposta do tipo i ; L é o valor mínimo aceitável para a resposta i ; T é o valor alvo para a resposta i , e s é um peso da função de desejabilidade. Considerou-se que a função de desejabilidade varia linearmente entre $d(y_i) = 0$ e $d(y_i) = 1$, ou seja, $s = 1$.

No segundo passo, a função de desejabilidade geral, D , é calculada através da média geométrica das funções de desejabilidade individuais. Para duas variáveis resposta, a função de desejabilidade global é expressa como mostrado na Eq. (4.3).

$$D = (d(y_1) * d(y_2))^{\frac{1}{2}} \quad (4.3)$$

Observa-se que se qualquer resposta y_i é completamente inaceitável ($d(y_i) = 0$), então a desejabilidade geral é zero. Ou seja, não importa quão desejável sejam os outros resultados individuais, a média geométrica leva o produto de todos a “0”.

O teste de validação foi realizado em triplicata sob condições operacionais que promoveram a maior desejabilidade global do processo, ou seja, um compromisso entre alta eficiência global em etanol e alta produtividade global em etanol.

4.2.7 Quantificação de glicose e etanol

As concentrações de glicose e etanol foram quantificadas conforme descrito no item 3.3 do Capítulo 3.

4.2.8 Procedimento de cálculos

4.2.8.1 Eficiência de hidrólise ($Ef_{hidrólise}$)

A Eq.(4.4) refere-se ao cálculo da eficiência de celulose a glicose.

$$Ef_{hidrólise}(\%) = \frac{C_G}{C_B * 0,55 * 1,11} \quad (4.4)$$

onde: C_G é a concentração de glicose (g/L) produzida nas mesmas condições experimentais do PS e SSF sem inoculação de microrganismo (experimento controle). C_B é concentração (g/L) de palha de cana pré-tratada seca adicionada no início do processo PS; 0,55 corresponde à fração do teor de celulose da biomassa pré-tratada, conforme apresentado na Tabela 3.1 ; e 1,11 é o coeficiente estequiométrico de conversão de celulose a glicose.

4.2.8.2 Eficiência de fermentação ($E_{fermentação}$)

A Eq. (4.5) refere-se ao cálculo da eficiência de glicose a etanol.

$$E_{fermentação}(\%) = \frac{C_{EtOH}}{C_G * 0,51} \quad (4.5)$$

onde: C_{EtOH} é a concentração de etanol (g/L) produzida durante o processo SSF e 0,51 é o rendimento estequiométrico do etanol a partir da glicose.

4.2.8.3 Eficiência global em etanol (E_{global})

A eficiência global em etanol é calculada pela multiplicação da equação (4.4) e (4.5), conforma mostrada na Eq. (4.6).

$$E_{global}(\%) = \frac{C_{EtOH}}{C_B * 0,55 * 1,11 * 0,51} \quad (4.6)$$

4.2.8.4 Produtividade volumétrica em etanol (P_{EtOH})

A produtividade volumétrica global em etanol (g/(L.h)) foi calculada dividindo a concentração de etanol pelo tempo de pré-sacarificação (t_{PS}) em cada ensaio experimental somado ao tempo do processo SSF (t_{SSF}).

$$P_{EtOH} = \frac{C_{EtOH}}{(t_{PS} + t_{SSF})} \quad (4.7)$$

onde t_{PS} variou de 6 a 42 h e t_{SSF} é constante e igual a 24 h.

4.3 Resultados e discussão

Os resultados do planejamento experimental obtidos para a eficiência de hidrólise e fermentação, bem como eficiência e produtividade global em etanol para o processo PSSSF da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados do planejamento DCCR no estudo da etapa de pré-sacarificação com as variáveis-resposta.

| Ensaio | Variáveis em níveis codificados | | | Variáveis-resposta | | | |
|--------|---|---------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| | C _E FPU/g _{celulose} | C _B % (m/v) | t _{PS} (h) | Eficiência de hidrólise (%) | Eficiência de fermentação (%) | Eficiência global em etanol (%) | Produtividade global em etanol (g/(L.h)) |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 58,87 | 92,81 | 54,64 | 0,41 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | 75,94 | 88,32 | 67,07 | 0,51 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | 53,28 | 87,21 | 46,47 | 0,80 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | 58,19 | 90,49 | 52,66 | 0,92 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | 82,00 | 82,65 | 67,78 | 0,33 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | 91,61 | 80,34 | 73,60 | 0,35 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | 61,08 | 96,47 | 58,92 | 0,65 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 70,81 | 96,73 | 68,50 | 0,76 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 51,70 | 95,57 | 49,41 | 0,48 |
| 10 | +1,68 | 0 | 0 | 74,56 | 97,28 | 72,53 | 0,71 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 79,78 | 74,73 | 59,62 | 0,19 |
| 12 | 0 | +1,68 | 0 | 57,19 | 96,14 | 54,98 | 0,89 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 58,83 | 92,85 | 54,62 | 0,85 |
| 14 | 0 | 0 | +1,68 | 78,80 | 89,52 | 70,55 | 0,50 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 73,53 | 87,69 | 64,48 | 0,63 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 72,51 | 87,77 | 63,64 | 0,62 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 76,40 | 90,04 | 68,79 | 0,67 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 76,55 | 89,97 | 68,88 | 0,67 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 75,06 | 88,82 | 66,67 | 0,64 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 77,55 | 83,49 | 64,75 | 0,63 |

Eficiência de hidrólise, eficiência de fermentação, eficiência global em etanol e produtividade global em etanol apresentaram, respectivamente, variações entre 51,7 a 91,6 %; 74,7 a 97,3 %; 46,5 a 73,6 % e 0,19 a 0,92 g/(L.h).

Vale ressaltar que, uma vez que as respostas de eficiência de celulose a glicose e eficiência de glicose a etanol estão inseridas na resposta eficiência global (ver equação (4.6)), optou-se por realizar a análise estatística somente para as variáveis-resposta eficiência global e produtividade global em etanol.

A maior eficiência global em etanol foi obtida nas seguintes condições operacionais: 25,95 FPU/g_{celulose} de enzima, 9,05 % m/v de biomassa e 34,7 h de pré-sacarificação (Experimento 6), enquanto que a maior produtividade global em etanol foi observada com 25,95 FPU/g_{celulose} de enzima, 20,95 % m/v de biomassa e 13,3 h de pré-sacarificação (Experimento 4). Considerando o melhor resultado em termos de eficiência global em etanol, foi possível obter 0,23 g_{etanol}/g_{palha de cana pré-tratada}, correspondendo a aproximadamente 290 L de etanol/ton de palha de cana-de-açúcar pré-tratada.

Os resultados demonstraram que *S. cerevisiae* Y-904 apresenta desempenho satisfatório a 40 °C, mesmo não sendo uma levedura termotolerante, o que simplifica a implementação industrial dos processos de SSF.

4.3.1 Análise estatística e modelagem matemática

Os resultados da ANOVA para ambas as variáveis-resposta são apresentados na Tabela 4.3. A significância estatística do modelo de regressão foi verificada pelo teste F, onde o valor F deve ser maior que o F_{tabelado} , considerando graus de liberdade referentes aos parâmetros significativos (regressão) e insignificantes (resíduos) e p-valor.

Sendo $F_{\text{calculado}} (11,65) > F_{\text{tabelado}} (3,02)$ para a eficiência global em etanol e $F_{\text{calculado}} (78,00) > F_{\text{tabelado}} (3,02)$ para a produtividade global em etanol, e os p-valores dos modelos de regressão altamente significativo (p-valor < 0,0005), pode-se concluir que os modelos previstos são válidos e confiáveis em um intervalo de confiança de 95 %. P-valores insignificantes (p-valor > 0,05) para a falta de ajuste indicam uma correlação satisfatória entre os dados experimentais e os dados previstos.

Tabela 4.3 – Análise de variância (ANOVA) do modelo predito para a eficiência e produtividade global em etanol, considerando um intervalo de confiança de 95 % (p-valor < 0,05).

| Resposta | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | F-valor | p-valor |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------|---------|
| Eficiência global em etanol | Modelo | 1102.70 | 9 | 122.52 | 11.65 | 0.0003 |
| | X ₁ | 389.11 | 1 | 389.11 | 36.98 | 0.0001 |
| | X ₂ | 144.03 | 1 | 144.03 | 13.69 | 0.0041 |
| | X ₃ | 409.14 | 1 | 409.14 | 38.88 | <0.0001 |
| | X ₁ .X ₂ | 0.77 | 1 | 0.77 | 0.07 | 0.7924 |
| | X ₁ .X ₃ | 1.30 | 1 | 1.30 | 0.12 | 0.7329 |
| | X ₂ .X ₃ | 9.29 | 1 | 9.29 | 0.88 | 0.3696 |
| | X ₁ ² | 35.92 | 1 | 35.92 | 3.41 | 0.0944 |
| | X ₂ ² | 119.25 | 1 | 119.25 | 11.33 | 0.0072 |
| | X ₃ ² | 14.63 | 1 | 14.63 | 1.39 | 0.2656 |
| | Falta de ajuste | 79.49 | 5 | 15.90 | 3.09 | 0.1206 |
| | Resíduos | 105.22 | 10 | 10.52 | | |
| | Total | 1207.88 | 19 | | | |
| | R ² | 0.913 | | | | |
| R ² ajustado | 0.834 | | | | | |
| Produtividade global em etanol | Modelo | 0.700 | 9 | 0.078 | 78.00 | <0.0001 |
| | X ₁ | 0.040 | 1 | 0.040 | 38.86 | <0.0001 |
| | X ₂ | 0.539 | 1 | 0.539 | 519.52 | <0.0001 |
| | X ₃ | 0.094 | 1 | 0.094 | 90.76 | <0.0001 |
| | X ₁ .X ₂ | 0.002 | 1 | 0.002 | 1.59 | 0.2353 |
| | X ₁ .X ₃ | 0.001 | 1 | 0.001 | 0.87 | 0.3726 |
| | X ₂ .X ₃ | 0.001 | 1 | 0.001 | 0.51 | 0.4917 |
| | X ₁ ² | 0.005 | 1 | 0.005 | 5.01 | 0.0491 |
| | X ₂ ² | 0.021 | 1 | 0.021 | 20.54 | 0.0011 |
| | X ₃ ² | 0.001 | 1 | 0.001 | 1.20 | 0.2982 |
| | Falta de ajuste | 0.008 | 5 | 0.002 | 3.44 | 0.1005 |
| | Resíduos | 0.010 | 10 | 0.001 | | |
| | Total | 0.714 | 19 | | | |
| | R ² | 0.985 | | | | |
| R ² ajustado | 0.972 | | | | | |

Os coeficientes que não são estatisticamente significativos (p -valor $> 0,05$) foram desconsiderados do modelo de regressão, com pequena influência sobre o resultado do ajuste final (de $R^2 = 0,913$ para $R^2 = 0,834$ – eficiência global em etanol, e de $R^2 = 0,985$ para $R^2 = 0,972$ – produtividade global em etanol).

O coeficiente de correlação (R^2) reparametrizado foi satisfatório indicando que o modelo é adequado para representar a relação entre as variáveis independentes e a variável-resposta. A equação reparametrizada torna-se mais simples, mas sem perder qualidade no modelo matemático.

Os modelos que descrevem eficiência global em etanol (Ef_{EtOH}) e produtividade global em etanol (P_{EtOH}) como uma função das variáveis operacionais são representadas pelas equações 4.8 e 4.9, respectivamente.

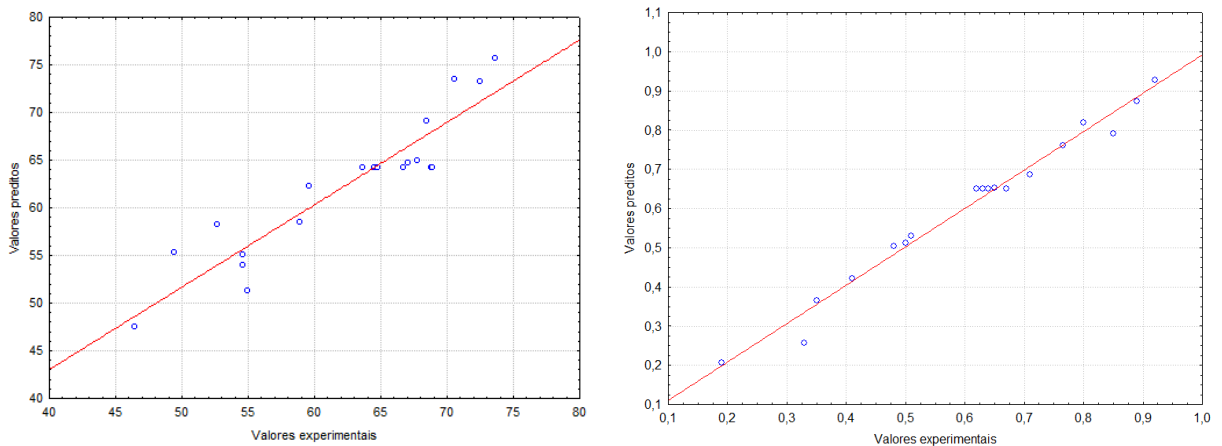
$$Ef_{EtOH} = 64.23 + 5.34 X_1 - 3.25 X_2 - 2.65 X_2^2 + 5.47 X_3 \quad (4.8)$$

$$P_{EtOH} = 0.65 + 0.05 X_1 - 0.02 X_1^2 + 0.20 X_2 - 0.04 X_2^2 - 0.08 X_3 \quad (4.9)$$

onde X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas da concentração enzima, concentração de biomassa e tempo de pré-sacarificação, respectivamente.

A Figura 4.1 mostra os valores experimentais e os valores previstos para ambos os modelos. Observa-se uma boa concordância entre os valores preditos e experimentais, como era de se esperar com base nos resultados da ANOVA.

Figura 4.1 – Valores experimentais e valores previstos para a eficiência global em etanol (a) e produtividade global em etanol (b).



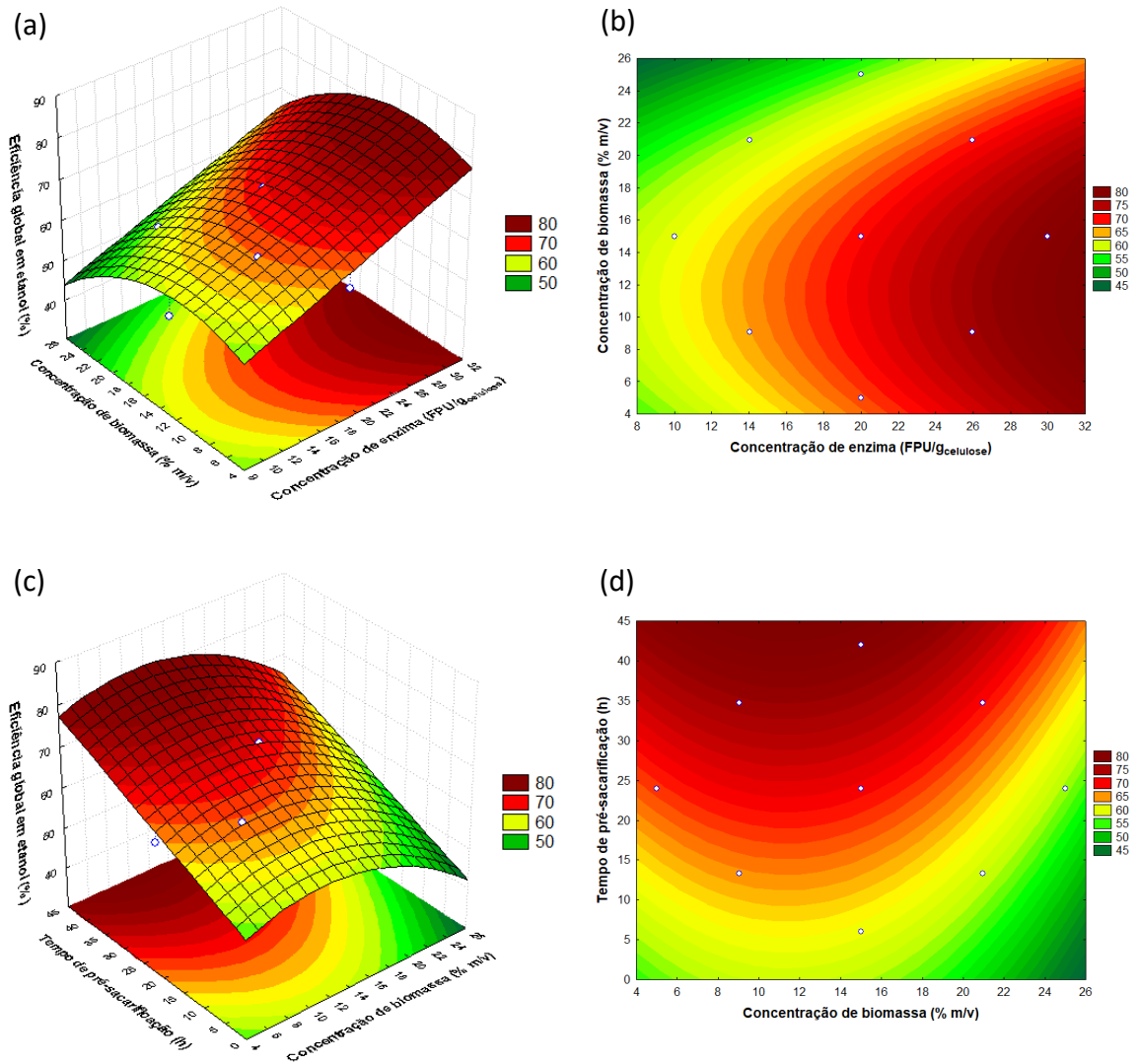
Para melhor interpretação dos resultados, as superfícies de resposta dos modelos polinomiais de segunda ordem foram exibidas graficamente Figura 4.2. Assim, é possível encontrar não somente um ponto ótimo de operação, mas também uma região de operação que extremize a variável-resposta.

Os efeitos combinados das variáveis independentes foram limitados a superfícies 3-D (uma resposta em função de duas variáveis independentes), as quais foram traçadas com uma das três variáveis operacionais fixadas em seu valor ótimo. As Figura 4.2 (a, c) e Figura 4.3 (a, c) exibem o efeito de variáveis independentes sobre a eficiência global em etanol e a produtividade global em etanol, respectivamente. Nas Figura 4.2 (b, d) e Figura 4.3 (b, d) estão apresentadas as curvas de nível.

Nas Figura 4.2 (a) e (b), pode-se verificar a existência de uma região de ótimo para a eficiência de celulose em etanol para uma ampla faixa de combinações possíveis de concentração de enzima (acima de 22 FPU/g_{celulose}) e concentração de biomassa (de 6 a 18 % m/v) poderia favorecer a eficiência global. Alta carga de biomassa (> 18 % m/v) afeta negativamente a eficiência global do processo. Ineficiência de mistura e resistências à transferência de massa e calor, devido à alta viscosidade do meio reacional, podem ser as causas da diminuição da conversão de celulose quando se tem altas concentrações de sólidos no reator (HUANG et al., 2011; MODENBACH; NOKES, 2013).

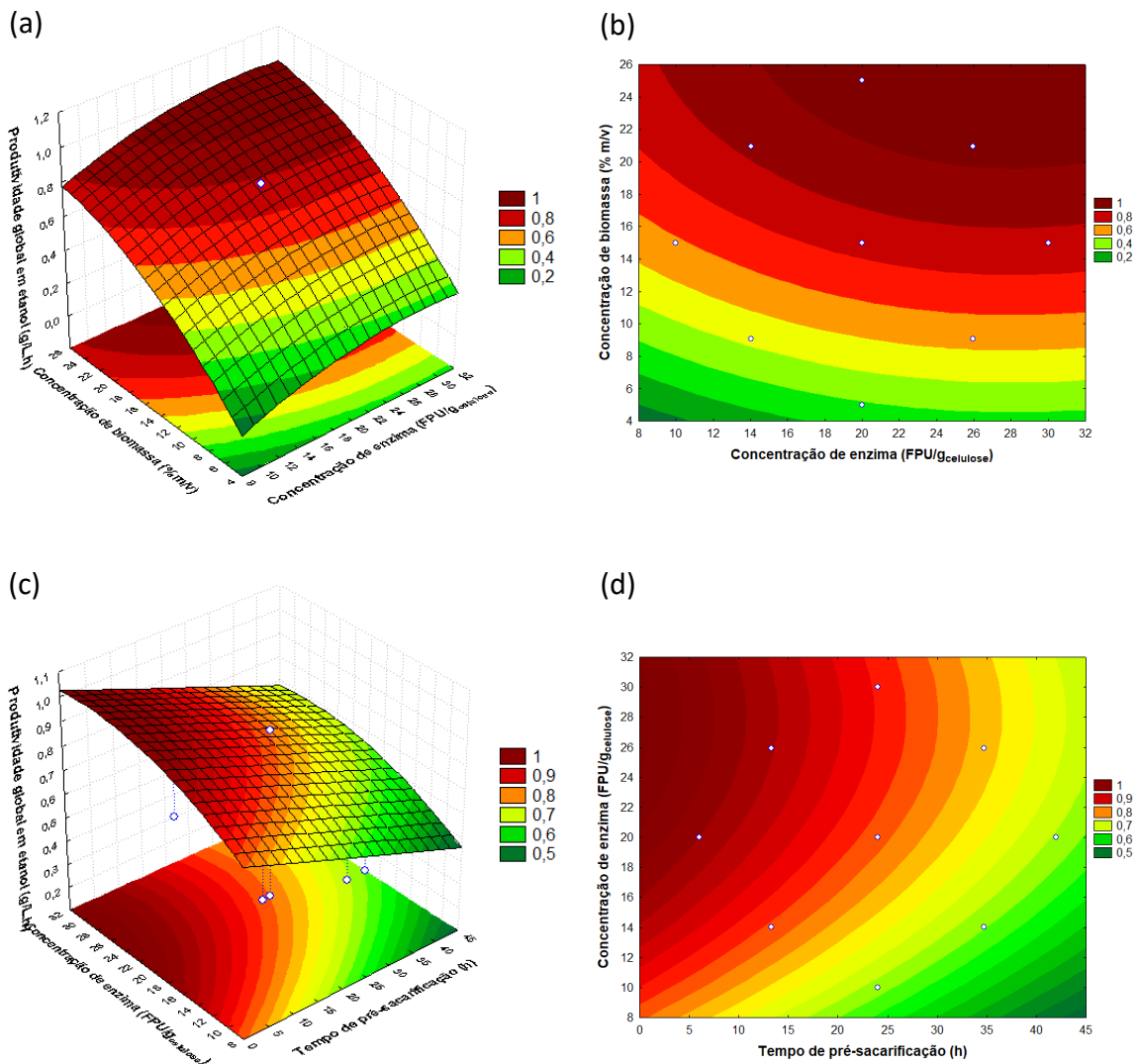
A partir das Figura 4.2 (c) e (d), o efeito combinado do tempo de PS acima de 30 horas e carga de biomassa de 6 a 18 % m/v exibe melhores resultados para a eficiência global em etanol. O tempo de PS e a concentração de enzima indicam claramente que a eficiência global em etanol é maior em torno dos níveis máximos para ambas as variáveis. De fato, um aumento na concentração de enzima associado a um maior tempo de PS resultam em maiores concentrações de glicose presentes no meio reacional e, como consequência, concentrações mais elevadas de etanol também estarão presentes.

Figura 4.2 – Superfícies de resposta ((a), (c)) e curvas de nível ((b), (d)) para eficiência global em etanol em função da concentração de enzima e concentração de biomassa ((a) e (b)); concentração de biomassa e tempo de pré-hidrólise ((c) e (d)).



As Figura 4.3 (a) e (b) indicam que, para obter maior produtividade global em etanol, a concentração de biomassa deve estar acima de 18 % m/v e a concentração de enzima acima de 15 FPU/g_{celulose}. O efeito combinado do tempo de PS até 20 horas e dosagem enzimática acima de 20 FPU/g_{celulose} (Figura 4.3 (c) e (d)) mostram melhores resultados para a produtividade global em etanol. Elevada carga de biomassa combinada com alta concentração de enzima favorece o aumento no teor de glicose presente no meio reacional. A eficiência do processo de fermentação depende da concentração inicial de glicose na etapa SSF (OFORI-BOATENG; LEE, 2014), desta forma, uma alta produtividade é alcançada quando uma alta concentração de glicose está presente no início do processo SSF.

Figura 4.3 – Superfícies de resposta ((a), (c)) e curvas de nível ((b), (d)) para produtividade global de etanol em função da concentração de enzima e concentração de biomassa ((a) e (b)); concentração de enzima e tempo de pré-hidrólise ((c) e (d)).



A Tabela 4.4 apresenta as faixas de operação nas quais as variáveis de entrada proporcionam as características desejadas do processo – alta eficiência global em etanol e alta produtividade global em etanol.

As melhores eficiências globais do processo são alcançadas quando o tempo de pré-hidrólise é maior que aproximadamente 30 h, desde que respeitadas as faixas ideais de operação das outras variáveis. Por outro lado, para otimizar a produtividade global, é necessário que o tempo de pré-hidrólise seja menor que 20 h.

Tabela 4.4 – Condições operacionais do processo PSSSF que maximiza cada variável-resposta.

| Variável operacional | Variável-resposta | |
|--------------------------|---------------------------------|--|
| | Eficiência global em etanol (%) | Produtividade global em etanol (g/(L.h)) |
| Concentração de enzima | > 22 FPU/g _{celulose} | > 15 FPU/g _{celulose} |
| Concentração de biomassa | 6 – 18 % m/v | > 18 % m/v |
| Tempo de pré-hidrólise | > 30 h | < 20 h |

Encontrar um processo que seja eficiente pode ser um desafio, já que critérios conflitantes precisam ser resolvidos. Assim, do ponto de vista técnico-econômico, é importante otimizar não somente uma variável-resposta, mas sim, todas as respostas relevantes para o processo. Nesses casos, deve-se buscar faixas operacionais que otimizem simultaneamente todas as variáveis-resposta ou, no mínimo, as mantenham em valores desejáveis.

4.3.2 Decisão multicritérios aplicado ao processo PSSSF

Para obter os perfis de desejabilidade, foram estabelecidos os valores alvo ($d(y_i) = 1$); valores inaceitáveis ($d(y_i) = 0$) e valores intermediários ($0 < d(y_i) < 1$) do processo PSSSF. Para valores menores do que o menor valor experimental que cada variável-resposta apresentou no planejamento DCCR (Tabela 4.2), foi adotado $d(y_i) = 0$. Por outro lado, para valores maiores do que o maior valor obtido para cada variável-resposta foi considerado $d(y_i) = 1$

De forma resumida, as restrições foram as seguintes:

- a) Eficiência global em etanol

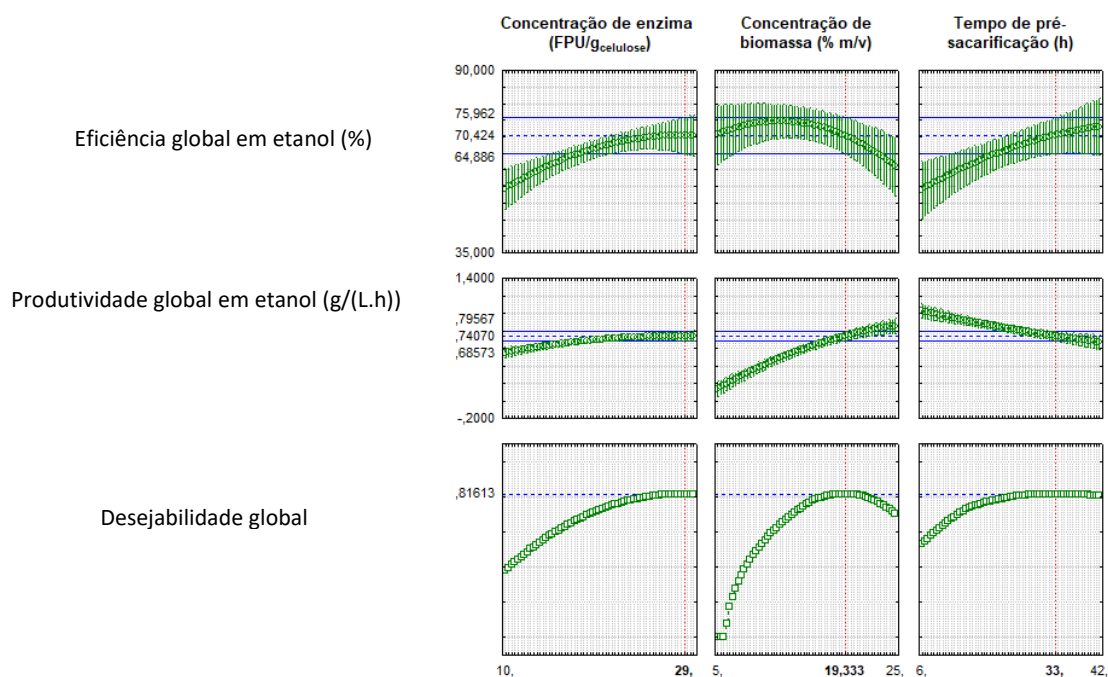
L = 46,5 % (d = 0) – Ensaio 3; T = 73,6 % (d = 1) – Ensaio 6

- b) Produtividade global em etanol

L = 0,19 g/(L.h) (d = 0) – Ensaio 11; T = 0,92 g/(L.h) (d = 1) – Ensaio 4

Figura 4.4 apresenta o comportamento da eficiência global em etanol e produtividade global em etanol em função das variáveis operacionais. Além disso, pode ser visualizado o perfil de desejabilidade global em função de cada uma das variáveis de entrada.

Figura 4.4 – Perfis das respostas previstas pelo modelo (1ª linha, eficiência global em etanol, e 2ª linha, produtividade global de etanol) e perfis de desejabilidade global (3ª linha) em função das variáveis independentes (cada uma das colunas, respectivamente).



Legenda: Linhas vermelhas: valores das variáveis operacionais que otimizam simultaneamente ambas as variáveis-resposta. Linhas azuis: limites de confiança de cada variável resposta.

Os gráficos da resposta prevista pelo modelo e os perfis de desejabilidade global permitem observar como as mudanças nos níveis de cada variável independente influenciam em cada variável-resposta e na desejabilidade global, respectivamente. Esse recurso é especialmente útil na determinação de sensibilidade que cada variável independente tem na desejabilidade global.

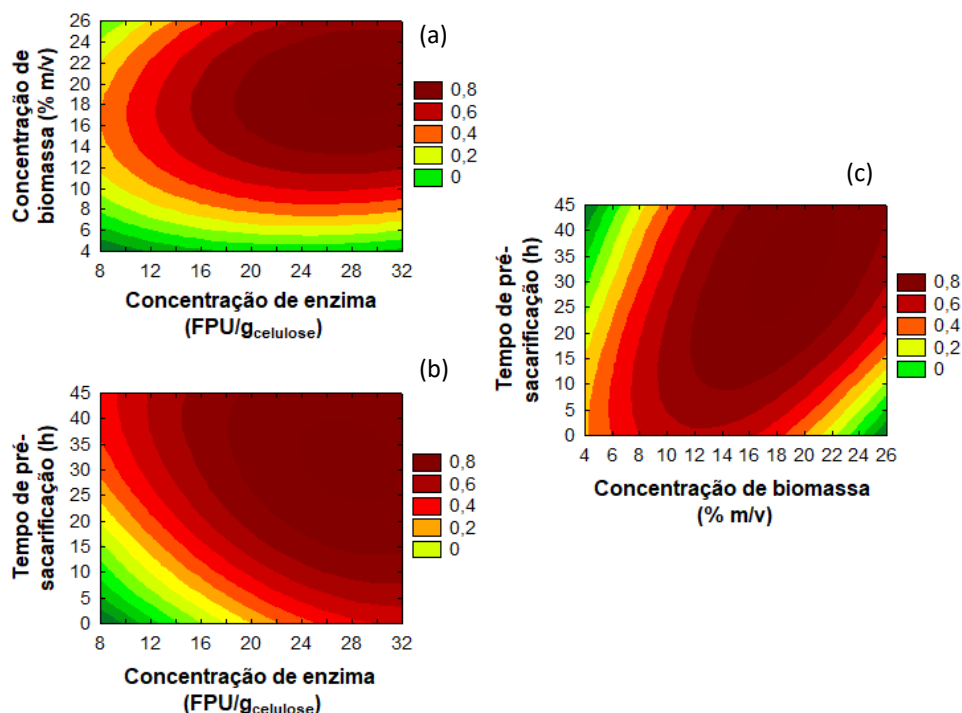
Por meio da otimização multiresposta, uma solução de compromisso foi obtida alcançando uma desejabilidade global de 0,82 (3ª linha da Figura 4.4), indicando que a otimização simultânea das variáveis-resposta atende 82 % de um máximo possível, isto é, desejabilidade global igual a 1 ($d(y_1) = 1$ e $d(y_2) = 1$).

Os valores ótimos para a eficiência global em etanol e produtividade global em etanol foram $70,4 \pm 5,54$ % e $0,74 \pm 0,06$ g/(L.h), respectivamente (1ª e 2ª sequência da Figura 4.4), com o biorreator de PSSSF operando nas seguintes condições operacionais: 29 FPU/g_{celulose}, 19,3 % m/v e tempo de PS de 33 h (1ª, 2ª e 3ª coluna da Figura 4.4, respectivamente).

A Figura 4.5 apresenta as curvas de nível para a desejabilidade global em função das variáveis operacionais do processo. A respectiva variável independente que não foi

plotada em cada curva de nível foi fixada em seu valor ótimo o qual maximiza a desejabilidade global (de maneira similar como foi feito nas Figura 4.3 e Figura 4.4).

Figura 4.5 – Curvas de nível de desejabilidade global em função das variáveis operacionais. (a) Efeito da concentração de biomassa enzima; (b) Efeito da concentração de enzima e tempo de PS; (c) Efeito da concentração da biomassa e tempo de PS.



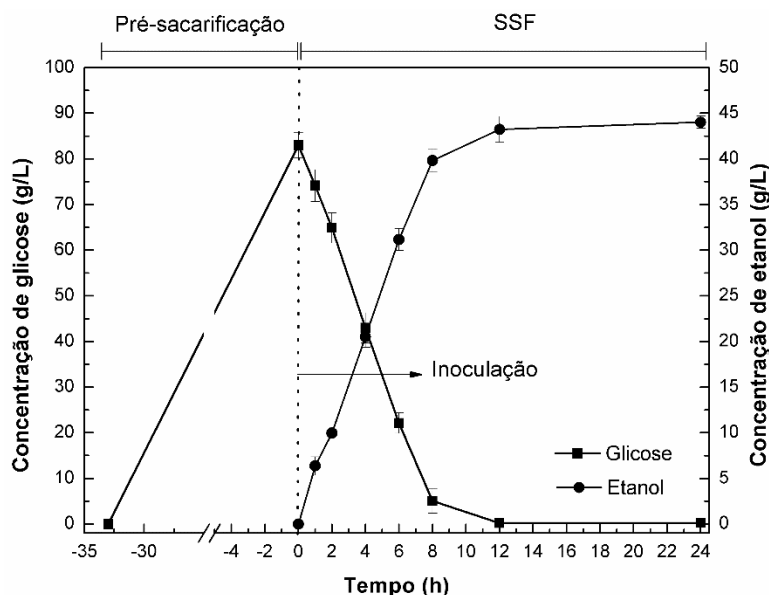
Nota-se que a função de desejabilidade é praticamente plana na proximidade da solução ideal, indicando que pequenas variações em torno das variáveis operacionais não alteram a desejabilidade global drasticamente. Ademais, com as curvas de nível, não apenas um valor pontual ótimo é encontrado para as variáveis operacionais, mas também faixas de operação onde se pode variar as condições de entrada sem que a desejabilidade global seja consideravelmente diminuída. Por exemplo, a concentração de enzima e o tempo de PS poderiam ser reduzidos para aproximadamente 25 FPU/g_{celulose} e 25 h, respectivamente, sem comprometer a eficiência global do processo.

4.3.3 Teste de validação

Os valores ótimos previstos foram investigados experimentalmente para verificar a precisão da otimização. O teste de validação foi realizado sob condições estabelecidas de acordo com a função de desejabilidade global, com três repetições.

A Figura 4.6 apresenta os perfis das concentrações de glicose e etanol no experimento de validação.

Figura 4.6 – Concentração de glicose e etanol obtida no teste de validação.



Da Figura 4.6 observa-se que a produção final de etanol atingiu 44,03 g/L, correspondendo à uma eficiência global de 73 % e produtividade de 0,772 g/(L.h), considerando 33 h de PS, seguido de 24 h adicionais de SSF. Observa-se que a partir de 12 h de SSF, a concentração de glicose é esgotada e, portanto, a produção de etanol é desprezível. Assim, a produtividade efetiva é de 0,978 g/(L.h), considerando 33 h de PS mais 12 h de SSF.

Tabela 4.5 apresenta os valores preditos pela função de desejabilidade global e experimentais obtidos do experimento PSSSF operando sob as condições ideais de processo.

Tabela 4.5 – Comparação entre os valores preditos e experimentais do processo PSSSF conduzido sob condições operacionais definidas pela função de desejabilidade.

| Variável-resposta | Valor predito | Limite de confiança | | Valor experimental |
|--|---------------|---------------------|--------|--------------------|
| | | - 95 % | + 95 % | |
| Eficiência global em etanol (%) | 70,42 | 64,89 | 75,96 | 73,00 ± 1,11 |
| Produtividade global em etanol (g/(L.h)) | 0,741 | 0,686 | 0,796 | 0,772 ± 0,012 |

O teste de validação confirmou que os valores experimentais de ambas as variáveis-resposta estão de acordo com os valores preditos, sugerindo que os modelos

matemáticos foram capazes de prever com precisão as variáveis-resposta estudadas. Além disso, os modelos matemáticos obtidos podem ser úteis para orientar estudos de hidrólise e fermentação simultâneas considerando outros tipos de culturas lignocelulósicas para a produção de etanol 2G.

As condições ótimas obtidas para o processo PSSSF a partir de palha de cana-de-açúcar pré-tratada são bastante interessantes, uma vez que foi possível obter um aproveitamento satisfatório de celulose para a produção de etanol (290 L de etanol/ton de palha de cana-de-açúcar pré-tratada ou 145 L de etanol/ton de palha de cana-de-açúcar *in natura* – considerando recuperação de 50 % de biomassa após o pré-tratamento hidrotérmico), processando um alto teor de biomassa (19,3 % m/v) em apenas 45 h de processamento total (33 h de PS mais 12 h de SSF).

Quando comparado aos resultados obtidos no presente estudo, Santos et al. (2012) alcançaram um rendimento de etanol ligeiramente superior (150 L de etanol /ton de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*) aplicando 6 h de pré-hidrólise mais 30 h de SSF. No entanto, obteve-se uma baixa concentração de etanol (27,71 g/L), o que implica em um elevado consumo de energia de destilação.

De modo similar, um rendimento maior de celulose para etanol (187,5 L de etanol /ton de palha de cana-de-açúcar) foi obtido por Mesa et al. (2017) ao usar palha de cana-de-açúcar pré-tratada com ácido diluído no processo PSSF. Por outro lado, foram produzidos somente 14,47 g/L de etanol, o que não é ideal para aplicações industriais. Este baixo valor é devido a uma baixa concentração de biomassa processada (8 % m/v). O processamento de alta concentração carga de biomassa em biorreator de hidrólise pode ser um requisito importante a fim de alcançar uma produção de etanol 2G rentável, uma vez que altas concentrações de substrato permitem produções concentradas de açúcar (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009)

De acordo com alguns autores (ÖHGREN et al., 2006; MODENBACH; NOKES, 2013; LIU; CHEN, 2016), uma concentração de etanol maior do que 40 g/L no caldo de fermentação deve ser o ponto de referência para uma destilação eficiente, considerando o consumo de energia envolvido nesta etapa. Isto significa operar a uma concentração de biomassa superior a 15 % m/v (assumindo teor de celulose em torno de 55 % e eficiência de hidrólise em torno de 90 %) a fim de alcançar concentração de glicose superior a 80 g/L (JØRGENSEN et al., 2007; MODENBACH; NOKES, 2013). Assim, os resultados obtidos neste estudo motivam o uso industrial de palha de cana-de-açúcar pré-tratada

hidrotermicamente através do processo PSSSF, uma vez que esta estratégia apresenta rendimento positivo enquanto que o tempo de processamento total é reduzido em comparação com o processo SHF – configuração comumente usada na bioconversão de lignocelulósicos em etanol.

Contudo é inegável que, operar o reator de hidrólise com altas cargas de sólidos (> 15 % m/v) pode comprometer a conversão de substrato em produto. Nesse contexto, uma alternativa interessante é processar altas cargas de biomassa mantendo baixa a concentração de sólidos insolúveis dentro do reator. Isso é possível quando se opera no modo batelada alimentada. Desta maneira, consegue-se processar uma carga maior de biomassa e, ao mesmo tempo, obter alta conversão, baixa viscosidade do meio e consumo de energia. O próximo capítulo abordará com mais detalhes esse tipo de estratégia de alimentação.

4.4 Conclusões

A metodologia de superfície de resposta combinada com a abordagem de função de desejabilidade mostrou ser uma ferramenta valiosa para encontrar um equilíbrio entre obter alta eficiência global em etanol e alta produtividade global em etanol. Sob condições otimizadas, operando em uma concentração elevada de biomassa (19,3 % m/v), foi possível obter um aproveitamento de celulose a etanol de 73 %, o que corresponde aproximadamente a 290 L de etanol/ton de palha de cana pré-tratada (ou 145 L de etanol/ton de palha de cana-de-açúcar *in natura*) em tempo de processamento total de apenas 45 h.

Os resultados obtidos neste estudo motivam o uso industrial de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente através do processo PSSSF, uma vez que esta estratégia apresenta rendimento positivo enquanto reduz o tempo total de processamento quando comparado ao processo SHF.

Em um processo industrial de produção de etanol de primeira geração para cada tonelada de cana processada são produzidos aproximadamente 90 L de etanol. Considerando que a cada tonelada de cana processada geram-se em média 140 kg de palha, são necessárias 7,14 toneladas de cana processada para alcançar o rendimento de 145 L de etanol/ton de palha de cana de cana-de-açúcar *in natura*, o que corresponde a 20 L de etanol/ton de cana processada. Isso representa um incremento de aproximadamente 23 % na produção de etanol nacional.

Capítulo 5: ESTRATÉGIAS DE ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO E/OU ENZIMA EM REATOR DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

5.1 Introdução

Processar altas cargas de biomassa no reator de hidrólise enzimática é importante do ponto de vista econômico. Maiores concentrações de açúcar se traduzem em maiores concentrações de etanol, o que reduz o uso de energia e os custos associados ao processo de destilação (MODENBACH; NOKES, 2013). Entretanto, operações em batelada com altas cargas iniciais de sólidos podem causar problemas relacionados à alta viscosidade do meio, tais como: alta demanda energética para homogeneizar o meio reacional, ineficiência de mistura, causando transferência de calor e massa inadequados (GUPTA et al., 2012).

Uma alternativa é operar o reator no modo batelada alimentada, onde se adicionam substrato e/ou enzima gradativamente com o propósito de manter a viscosidade do meio reacional baixa. Contudo, nem sempre é uma tarefa fácil definir um perfil de alimentação que maximize produtividade ou conversão, por exemplo. A otimização das alimentações de substrato e enzima podem contribuir nesse sentido.

Cavalcanti-Montaña et al. (2013) simularam e validaram duas estratégias de alimentação substrato e/ou enzima em experimentos de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. A primeira definiu um perfil de alimentação de substrato e pulsos de enzima. A segunda definiu somente um perfil de alimentação de substrato, utilizando a teoria clássica de controle ótimo.

A teoria de controle ótimo é uma estratégia que permite extremizar (minimizar ou maximizar) um determinado critério de desempenho (por exemplo, minimizar custo, tempo, maximizar produtividade, rendimento, etc), o qual é uma função das variáveis de estado, as quais são função do tempo, sujeito a restrições impostas pela natureza física do problema (RAMIREZ, 1994).

Pinto (2016) também aplicou a teoria de controle ótimo para simular perfis de alimentação de palha de cana-de-açúcar em reator de hidrólise enzimática (P1), a fim de maximizar a concentração de glicose. O autor utilizou os parâmetros cinéticos de hidrólise

enzimática de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente seguida de deslignificação alcalina (PRATTO et al., 2016).

Neste capítulo, uma segunda política de alimentação (P2) (alimentação de substrato com pulsos de enzima ao longo do tempo), já estudada por Cavalcanti-Montañó et al. (2013), foi aplicada à hidrólise da palha de cana-de-açúcar deslignificada. Os resultados foram comparados com os obtidos pela estratégia operacional de controle ótimo (P1) adotada por Pinto (2016).

5.2 *Material e métodos*

5.2.1 Modelo matemático de hidrólise enzimática em batelada alimentada

A modelagem matemática da hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar pré-tratada operando em batelada alimentada inclui balanços materiais e equações cinéticas.

Os modelos matemáticos que descrevem a cinética de reação de hidrólise propostos neste trabalho se enquadram em um modelo semi-mecanístico não segregado, considerando o complexo enzimático como um único catalisador e não estruturado, desconsiderando mecanismos de difusão. Foi escolhido o modelo cinético de Michaelis-Menten (MM) pseudo-homogêneo com inibição pelo produto, baseado nos modelos de Pratto et al. (2016). Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir de experimentos em batelada e usados para simular estratégias de alimentação de substrato e enzima para batelada alimentada.

As hipóteses adotadas para a construção dos balanços materiais foram:

1. Admite-se que o reator é semi-contínuo, onde inicialmente é carregado com uma determinada quantidade de biomassa e são realizadas adições de substrato até que se cumpra a etapa em batelada alimentada. Ao término da fase de alimentação, o reator começa a operar no modo batelada, até que a reação de hidrólise cesse;
2. Sistema reacional pseudo-homogêneo (a reação de fato é heterogênea – substrato insolúvel; enzima solúvel – no entanto, como a carga de substrato insolúvel é baixa ~ 5 % m/v, pode-se assumir meio reacional homogêneo);
3. Enzima não é adsorvida em lignina;
4. Desconsidera-se inibição por celobiose;
5. Desconsidera-se inativação térmica das enzimas.

As equações (5.1) a (5.4) descrevem o processo reacional em batelada alimentada. A equação (5.1) é o balanço de massa para o substrato, a equação (5.2) o balanço de massa para o produto, a equação (5.3) o balanço de massa total, e a equação (5.4) representa a cinética do processo.

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{F_{S,alim} \cdot C_{S,alim}}{V} - r - \frac{F_{S,alim} C_S}{V} \quad (5.1)$$

$$\frac{dC_G}{dt} = r - \frac{F_{S,alim} \cdot C_G}{V} \quad (5.2)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{S,alim} \quad (5.3)$$

$$r = \frac{k \cdot C_E \cdot C_S}{K_m \left(1 + \frac{C_G}{K_i}\right) + C_S} \quad (5.4)$$

onde: $F_{S,alim}$ é a vazão de substrato alimentada (L/min); $C_{S,alim}$ é a concentração de substrato na alimentação em termos de glicose potencial na (g/L); C_S é a concentração de substrato (g/L) no tempo em termos de glicose potencial; C_G é a concentração de glicose (g/L) no tempo; V é o volume reacional (L) em um dado instante de tempo; r é a velocidade de reação em g/(L.min) descrita pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo produto; C_E (g/L) é a concentração de enzima que se deve ter dentro do reator; K_m é a constante de Michaelis-Menten; K_i é a constante de inibição competitiva da celulose por glicose; e k é a velocidade específica de reação.

A concentração de glicose potencial na alimentação, $C_{S,alim}$, fundamental para a manutenção da cinética de reação, é calculada levando em consideração a concentração de biomassa (C_B) como uma relação da quantidade de celulose dissolvida na umidade do substrato, o percentual de celulose na palha, que varia de acordo com o pré-tratamento recebido e a conversão mássica estequiométrica de celulose a glicose. A relação obtida para o cálculo de $C_{S,alim}$ é apresentada na equação (5.5).

$$C_{S,alim} = C_B \cdot \%_{celulose} \cdot 1,11 \quad (5.5)$$

5.2.2 Definição do perfil de alimentação de substrato e enzima

A partir dos balanços materiais e da equação de Michaelis-Menten, obtém-se as equações que descrevem a estratégia de alimentação de substrato e pulsos de enzima. Essas são mostradas nas equações (5.6) a (5.8).

$$e_{alim} = \frac{C_E \cdot V \cdot 230}{1,19} - e_{acumulada} \quad (5.6)$$

$$C_E = \frac{r_0 \left[K_m \left(1 + \frac{C_G}{K_i} \right) \right] + C_{S,0}}{k \cdot C_{S,0}} \quad (5.7)$$

$$F_{S,alim} = \frac{r \cdot V}{C_{S,alim} - C_{S,0}} \quad (5.8)$$

A equação (5.6) se refere à quantidade de enzima adicionada para manter uma velocidade de reação (r) não menor que uma velocidade mínima (r_{min}) pré-definida (ou seja, pulsos de enzima para manter r maior ou igual a alguma porcentagem de r_0).

onde:

- e_{alim} (FPU) é a quantidade de enzima a ser adicionada ao reator. Do termo “ $C_E \cdot V \cdot 230 / 1,19$ ” na equação (5.6), é necessário subtrair a enzima já introduzida até o momento, ou seja, a enzima que já está acumulada dentro do reator ($e_{acumulada}$), para obter a quantidade de enzima a ser alimentada;
- C_E deve ser multiplicada pelo volume do reator, V , e pela atividade enzimática (230 FPU/mL), considerando também a densidade da enzima (1,19 g/mL) para se ter a medida em FPU.

A porcentagem de r_0 adotada nas simulações foi escolhida com base no compromisso de menor quantidade de enzima adicionada sem impactar significativamente na diminuição da produtividade em glicose. A escolha está justificada no item 5.3 - “Resultados e Discussão”.

A equação (5.8) refere-se à vazão de alimentação de substrato, $F_{S,alim}$, e é calculada como uma função da velocidade de consumo de substrato, r , a partir da equação (5.4).

Nessa estratégia de alimentação utilizou-se o princípio do estado pseudoestacionário, ou seja, a variação da concentração de substrato durante a fase de alimentação é praticamente constante ($\frac{dC_s}{dt} \approx 0$), isto é, o substrato é consumido na mesma velocidade que é alimentado.

O perfil de alimentação de substrato foi definido de tal forma que a concentração de sólidos insolúveis ao longo da batelada alimentada fosse mantida em aproximadamente 5 % m/v. Esta concentração foi escolhida pois está abaixo do valor reportado na literatura (< 10 % m/v) (UNREAN; KHAJEERAM; LAOTENG, 2016) de modo a se obter uma mistura eficiente em reator de tanque agitado e evitar uma alta viscosidade do meio reacional.

5.2.3 Simulações do perfil de alimentação de substrato e enzima ao reator de hidrólise enzimática

Os modelos cinéticos de Michaelis-Menten para simular as políticas de alimentação de substrato e enzima foram implementados no software Matlab[®]. Os parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten com inibição por glicose foram obtidos a partir dos ajustes dos dados experimentais obtidos por Pratto et al. (2016) para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar deslignificada (mesmo pré-tratamento utilizado para realizar as validações neste trabalho). Os parâmetros obtidos foram: $K_m = 9,65 \pm 1,51$ g/L; $K_i = 0,8 \pm 0,08$ g/L; $V_m = 0,214 \pm 0,003$ g/(L.min). Vale ressaltar que devido os valores dos parâmetros de Pratto et al. (2016) terem sido obtidos a partir de experimentos em frascos agitados, foi realizado um novo ajuste dos parâmetros cinéticos de maneira que estes aderissem aos experimentos realizados em reator de bancada com agitação mecânica. Após o ajuste, o valor encontrado dos parâmetros foram $K_m = 9,65$ g/L; $K_i = 1,85$ g/L; $V_m = 0,208$ g/(L.min).

5.2.4 Algoritmo de simulação: perfil de alimentação de substrato e enzima

O modelo proposto para a estratégia de alimentação de substrato e enzima está representado pelas equações (5.1) a (5.8). O algoritmo implementado em Matlab[®] para a simulação dos perfis de alimentação de substrato e enzima seguiu os seguintes passos:

- Passo 1: Definir os valores iniciais das variáveis de estado, assim como os valores dos parâmetros cinéticos;

- Passo 2: Definir um vetor, denominado r_{set} , que contém diferentes porcentagens da velocidade inicial ($r_{inicial}$) (ver equação (5.9)). O objetivo de utilizar o vetor r_{set} é avaliar qual a mínima porcentagem da velocidade de reação inicial que deve ser mantida a fim de minimizar o uso de enzima, mas ainda assim manter elevadas velocidades de produção de glicose. Quando $r < r_{set}$, a enzima deve ser adicionada para retomar $r = r_{inicial}$;

$$r_{set} = \begin{bmatrix} 1,0 * r_{inicial} \\ 0,9 * r_{inicial} \\ 0,8 * r_{inicial} \\ 0,7 * r_{inicial} \\ 0,6 * r_{inicial} \\ 0,5 * r_{inicial} \end{bmatrix} \quad (5.9)$$

- Passo 3: Resolver as equações do modelo matemático para cada elemento do vetor r_{set} , utilizando o método numérico de Runge-Kutta 4ª ordem;
- Passo 4: Verificar se houve mudança na concentração de S_0 :
 - Não: $F_{S,alim} = 0$;
 - Sim: Alimentar substrato de acordo com a expressão matemática mostrada na equação (5.8);
- Passo 5: Verificar se houve alteração na velocidade inicial de reação “r”:
 - Não: $e_{alim} = 0$;
 - Sim: Alimentar enzima respeitando as equações (5.6) e (5.7).
- Passo 6: Repetir os passos 3 a 5 até que a capacidade máxima do reator seja atingida, finalizando com a operação em batelada para consumo do substrato residual.

5.2.5 Validação experimental

A validação experimental, que envolvia trabalho laborioso para a alimentação manual de substrato e enzima durante cerca de dois dias seguidos, foi realizada em colaboração com alguns alunos de graduação do departamento de Engenharia Química da UFSCar, da disciplina “10606-2-Desenvolvimento de Processos Químicos 2 (DPQ2)”, supervisionada pelo Prof. Dr. Ruy de Sousa Jr., durante o segundo semestre de 2016. Esta

atividade também computou créditos de Estágio Supervisionado de Capacitação Docente 1 e 2 para a doutoranda.

5.2.5.1 Substrato e complexo enzimático

O substrato e o complexo enzimático empregados nos experimentos foram descritos nos itens 3.1 e 3.2.

5.2.5.2 Deslignificação alcalina da palha pré-tratada hidrotermicamente

Primeiramente, foi realizado o preparo da biomassa utilizada nos experimentos de validação. Amostras de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente foram submetidas a pré-tratamento com NaOH 4 % m/v a fim de promover uma maior remoção de lignina da biomassa (deslignificação).

A condição de reação empregada foi razão sólido/líquido 1:20 ($m_{\text{palha seca}}:V_{\text{NaOH 4 \% m/v}}$). A suspensão foi adicionada em frascos de Erlenmeyers de 2L e autoclavada por 30 minutos a 121 °C e 1 atm. Após o término da reação, a palha foi lavada com água (temperatura ambiente) até obter pH próximo ao pH utilizado na etapa de hidrólise. Por fim, foi realizada a caracterização química da palha deslignificada para determinar o teor de celulose, hemicelulose e lignina. A caracterização química foi realizada conforme os procedimentos analíticos já descritos no item 3.2.2.

5.2.5.3 Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: aplicação da estratégia de alimentação de substrato e enzima

Os experimentos de validação foram realizados em reator de bancada de 200 mL. Os reatores foram operados a 50 °C, pH 5 (tampão citrato 50 mM), sob agitação de 250 rpm. Durante o processo em batelada alimentada foram adicionados palha e pulsos de enzima seguindo os perfis de alimentação obtidos através da simulação da estratégia operacional aqui adotada. Inicialmente, o reator foi carregado com palha deslignificada em uma concentração de 5 % $m_{\text{palha seca}}/v$, contendo 86,23 % de celulose (ver Tabela 5.1), em um volume reacional inicial de 50 mL, correspondente a uma concentração de glicose potencial de 47,9 g/L. Uma concentração de 38,5 FPU do extrato enzimático Cellic®CTec2 foi adicionada no início do

experimento (correspondente a uma concentração inicial de 20 FPU/g_{celulose}), e ao longo da reação mais 7 pulsos de enzima, totalizando em 1450 FPU ao final do processo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Ao longo da reação foram retiradas alíquotas do hidrolisado para posterior quantificação de glicose realizada de acordo com os procedimentos experimentais descrito no item 3.3.

Devido à ausência de um sistema automático de alimentação contínua, a alimentação de substrato foi realizada manualmente a cada 0,5 h.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Caracterização química da palha de cana-de-açúcar deslignificada

Inicialmente, para dar início às simulações, foi necessário quantificar a palha de cana-de-açúcar deslignificada em termos de seu teor de celulose, hemicelulose e lignina. A Tabela 5.1 apresenta a composição química da palha após pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação alcalina.

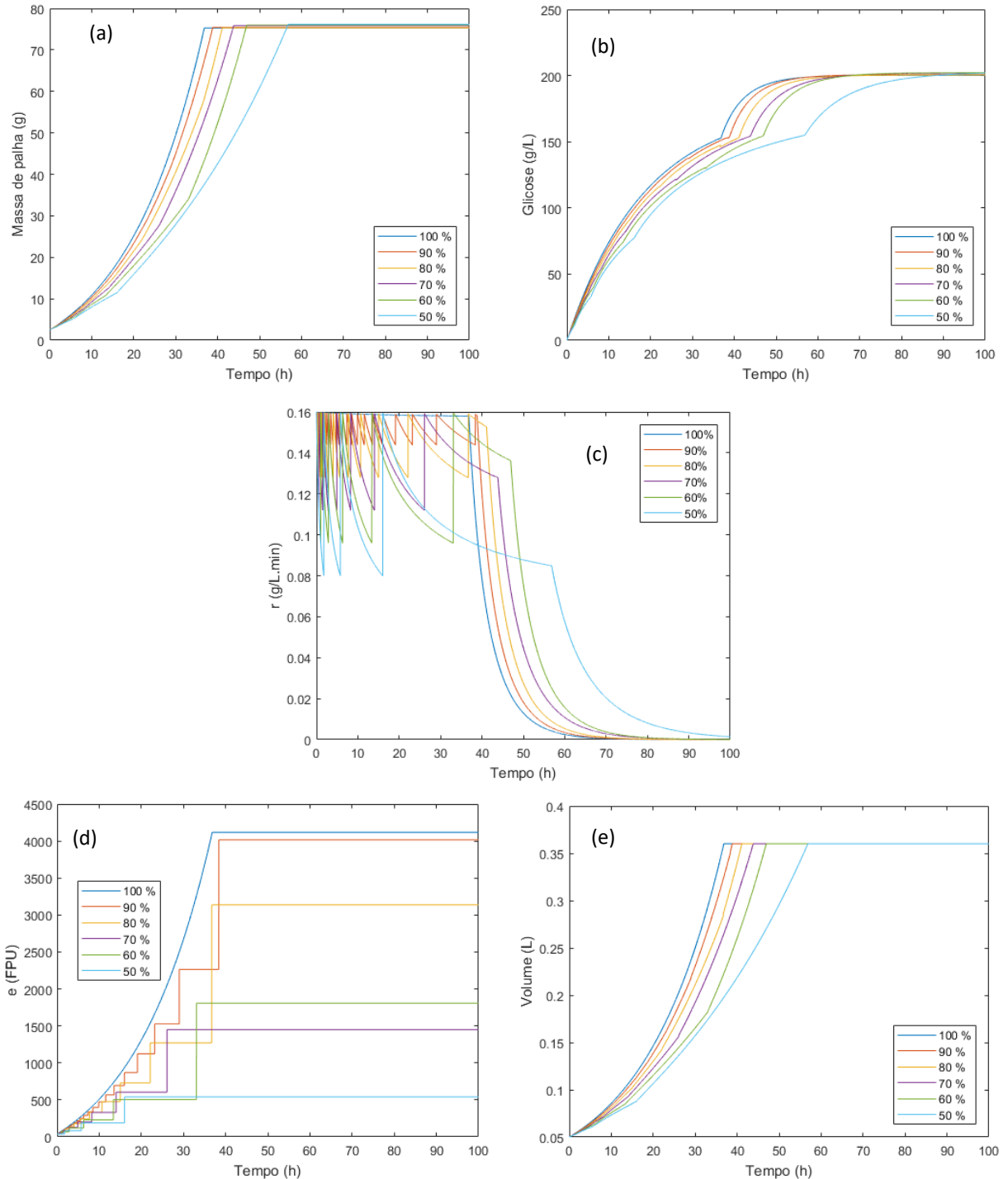
Tabela 5.1 – Composição química da palha de cana-de-açúcar deslignificada.

| Componente | Palha deslignificada |
|-------------------|-----------------------------|
| Celulose (%) | 86,23 ± 0,28 |
| Hemicelulose (%) | 2,89 ± 0,01 |
| Lignina (%) | 7,46 ± 0,91 |
| Cinzas (%) | 2,07 ± 0,47 |
| Total (%) | 98,65 ± 1,51 |

5.3.2 Simulações para diferentes porcentagens mínimas de r inicial a serem mantidas no processo

A Figura 5.1 mostra as simulações para cada componente do vetor (r_{set}), utilizando a estratégia proposta nas equações (5.6) a (5.8).

Figura 5.1 – Simulações para cada componente do vetor (r_{set}): (a) Perfil de alimentação de substrato em função do tempo; (b) Perfil de concentração de produto em função do tempo; (c) Perfil de velocidade de reação em função do tempo; (d) enzima acumulada no reator em função do tempo; (e) Perfil do volume de reação em função do tempo.



A Figura 5.1 (c) apresenta a variação da velocidade de reação com o tempo e com a alimentação de enzima. Para manter 100 % da velocidade inicial de reação, é necessária uma alimentação contínua de enzima durante a fase de alimentação de substrato (ver Figura

5.1 (d)), totalizando em um consumo de 4120 FPU de enzima no processo. Já para o segundo elemento de r_{set} ($0,9 \cdot r_{inicial}$), a alimentação só é feita quando a velocidade cai para 90 % da velocidade inicial, gerando uma alimentação de enzima com um perfil de pulso ao longo do experimento (assim como para os outros elementos $r_{set} < 0,9 \cdot r_{inicial}$), e não mais contínua, como para manter 100 % da velocidade inicial. Para manter uma velocidade de reação a 50 % da velocidade inicial, a quantidade total de enzima adicionada é de aproximadamente 540 FPU. A diferença de enzima adicionada para manter 100 % da velocidade inicial de reação é quase 8 vezes maior do que para manter 50 % da velocidade inicial de reação. Manter a velocidade de reação maximizada é interessante do ponto de vista técnico, pois altas produtividades de produto são obtidas. Por outro lado, para atender esse critério, altas quantidades de enzima também são necessárias para manter a taxa de reação alta.

O critério de escolha adotado para encontrar a porcentagem ideal de $r_{inicial}$ não é uma escolha trivial. A decisão de escolha foi baseada no compromisso de menor quantidade de enzima adicionada sem impactar significativamente na diminuição da produtividade em glicose.

Na Tabela 5.2 estão apresentados os valores de produtividade em glicose e enzima acumulada para as respectivas porcentagens mínimas de velocidade inicial a ser mantida dentro do reator. A produtividade em glicose foi calculada considerando uma conversão de hidrólise de 90 % (concentração de glicose de 181,65 g/L). Foram calculadas também as porcentagens de redução na produtividade em glicose e quantidade de enzima em relação à referência de 100 % (em que a enzima seria alimentada continuamente no reator).

Tabela 5.2 – Comparação das produtividades e enzima consumida no reator para que se atinja 90 % da concentração final de glicose.

| % $r_{inicial}$ | Produtividade (g/(L.min)) | Redução da produtividade * (%) | $e_{acumulada}$ (FPU) | Redução na $e_{acumulada}$ * (%) |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 100 | 0,072 | - | 4118 | - |
| 90 | 0,069 | 4,2 | 4016 | 2,5 |
| 80 | 0,065 | 9,7 | 3137 | 23,8 |
| 70 | 0,061 | 15,3 | 1450 | 64,8 |
| 60 | 0,058 | 19,4 | 1807 | 43,9 |
| 50 | 0,046 | 36,1 | 540 | 86,9 |

* Diminuição em relação ao 100 % de $r_{inicial}$

Para manter a velocidade de reação em sua velocidade máxima exigiria altas dosagens de enzima, o que tornaria a operação desinteressante do ponto de vista econômico.

Mantendo velocidades de reação acima de 80 % de $r_{inicial}$ seria possível uma redução de 24 % na quantidade de enzima a ser adicionada, com uma consequente redução de 9,7 % na produtividade em glicose. Por outro lado, para a condição na qual seja mantida uma velocidade de reação de pelo menos 70 % de $r_{inicial}$, é alcançada uma economia de aproximadamente 65 % de enzima utilizada com uma redução de apenas 15,3 % na produtividade. Nota-se que no segundo caso (70 % de $r_{inicial}$), a economia na enzima utilizada é quase 3 vezes maior (em relação à manutenção da velocidade em $r \geq 0,8.r_{inicial}$).

Vale destacar que, para a condição de 60 % de $r_{inicial}$, tem-se um aumento no consumo de enzima, quando comparado com a condição de 70 % de $r_{inicial}$. Para a condição de 60 % de $r_{inicial}$, as adições de enzima são mais espaçadas e tardias, por consequência, acaba sendo necessário adicionar mais enzima para a velocidade retornar à sua velocidade inicial.

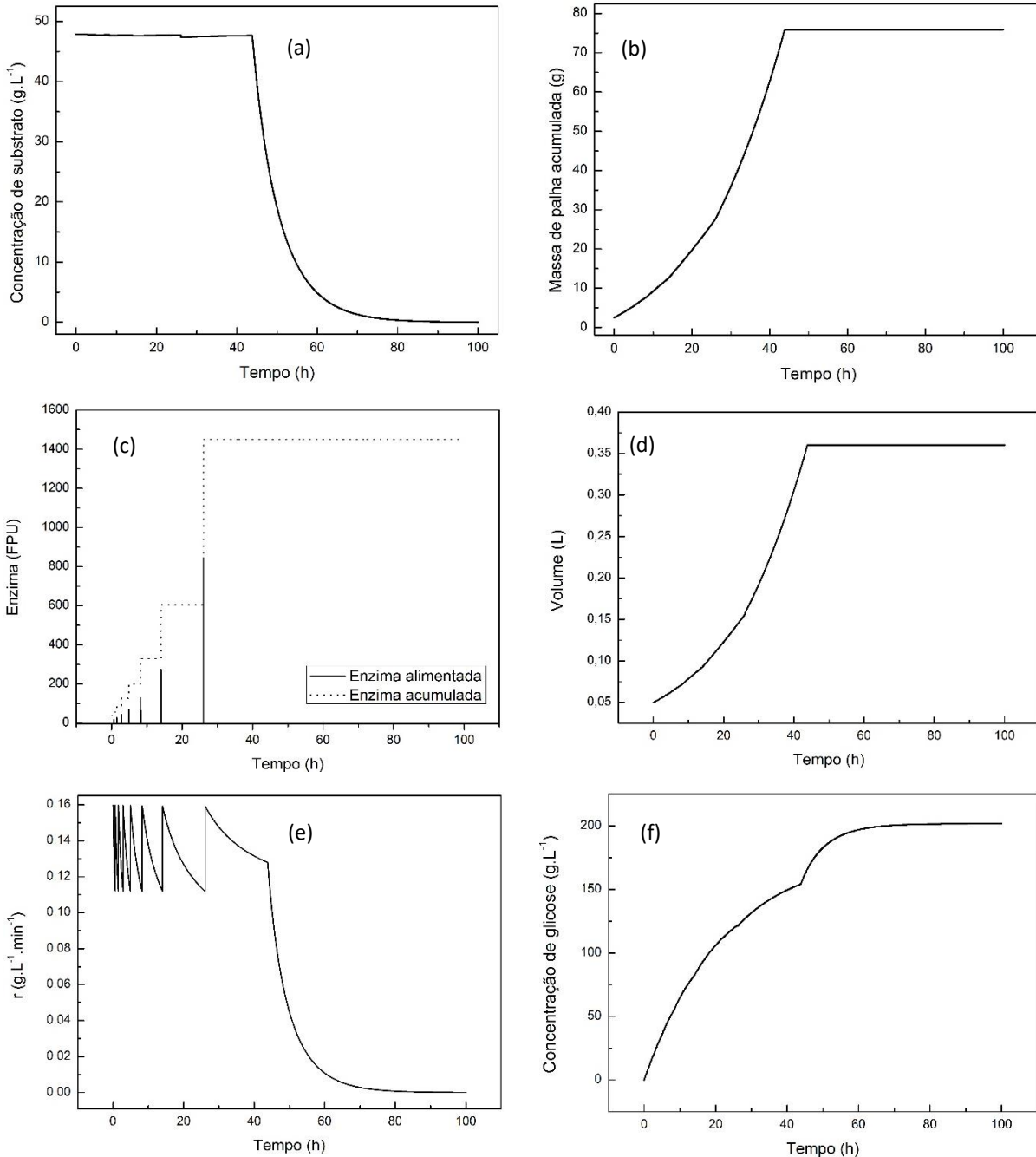
Quando se deseja manter uma velocidade de reação de no mínimo 50 % de $r_{inicial}$, a economia na quantidade enzima utilizada é de quase 90 %, no entanto, essa grande redução compromete a eficiência do processo, diminuindo em até 36 % a produtividade em glicose. A grande redução na quantidade de enzima acumulada para manter 50 % de $r_{inicial}$ pode ser explicada pelo fato de que a simulação atingiu o volume final do reator antes do próximo pulso de enzima (ver Figura 5.2 (c) e (e)).

Os valores apresentados na Tabela 5.2 indicam que a a porcentagem de 70 % não apenas otimiza a quantidade de enzima adicionada, mas também não causa uma queda significativa na produtividade. Por esta razão e sendo a carga de enzimas (~ 1400 FPU) comparável à utilizada em Pinto (2016), foi escolhida a estratégia de alimentar a quantidade de enzima necessária para manter a velocidade de reação em um valor igual ou superior a 70 % da velocidade inicial de reação.

5.3.3 Simulação para manter $r \geq 0,7.r_{inicial}$

Para realizar os experimentos de validação, simulações foram feitas para $r = 0,7.r_{inicial}$.

Figura 5.2 – Simulações para $r = 0,7 \cdot r_{inicial}$: (a) Concentração de substrato em função do tempo; (b) Massa de palha alimentada no reator em função do tempo; (c) Enzima alimentada e acumulada no reator em função do tempo; (d) Volume de reação em função do tempo; (e) Velocidade de reação em função do tempo; (f) Concentração de produto em função do tempo.



A Figura 5.2 (a) mostra a concentração de substrato (em termos de concentração de glicose potencial) em função do tempo. Observa-se que a concentração de substrato dentro do reator é mantida constante durante as primeiras 44 horas de experimento (fase de alimentação), momento no qual o volume máximo do reator é atingido (condição de parada de

alimentação – ver Figura 5.2 (d)). A partir deste instante, a alimentação cessa e o reator começa a ser operado em regime batelada simples.

O perfil de alimentação de substrato, conforme mostrado na Figura 5.2 (b), está representado em termos de massa seca de palha deslignificada e, portanto, para a utilização desses dados para validação experimental, deve ser feita a correção dos valores pela umidade do substrato no momento da adição no reator. Na Figura 5.2 (b) observa-se que a massa de palha acumulada fica constante a partir das 44 horas, indicando, mais uma vez, o momento de parada de alimentação.

O perfil de concentração de glicose formado ao longo da reação é mostrado na Figura 5.2 (f). Pode-se observar que o gráfico segue uma tendência até as 44 horas de alimentação, após este instante, a tendência da curva muda devido ao término da batelada alimentada e início da batelada simples. A concentração máxima de glicose que pode ser alcançada (glicose potencial) é de aproximadamente 202 g/L.

A Figura 5.2 (c) mostra o perfil simulado de alimentação de enzima e enzima acumulada com o tempo, calculado através das equações (5.5) e (5.6). São alimentados 7 pulsos de enzima mais uma quantidade inicial de 38,5 FPU. Nas primeiras 9 horas de processo são realizadas 5 alimentações de enzima, totalizando em 330 FPU de enzima acumulada, com uma razão de enzima:substrato em torno de 44 FPU/g_{celulose}. No sexto pulso, às 14 h de experimento, são adicionados 262 FPU e no último pulso, às 26,1h, adicionados 860 FPU, totalizando 1450 FPU de enzima acumulada.

Na Figura 5.2 (e) é apresentada a velocidade de reação em função do tempo. Quando a velocidade atinge 70 % da velocidade inicial (aprox. 0,112 g/(L.min)), uma certa quantidade de enzima necessária (ver Figura 5.2 (c)) é adicionada para que a velocidade de reação retorne à sua velocidade inicial. Este processo de adição em pulsos é realizado toda vez que a velocidade de reação atinja um valor $\leq 0,112$ g/(L.min).

Observa-se, na Figura 5.2 (e) que as adições de enzima ficam cada vez mais espaçadas e em maior quantidade. Como a concentração de substrato é mantida constante durante a fase de alimentação, o que influencia a velocidade da reação são as concentrações de produto e enzima. Conforme a glicose é produzida a velocidade de reação diminui, pois, a glicose atua como inibidor da enzima. Com relação à quantidade de enzima adicionada em cada pulso, quanto maior a concentração de produto presente dentro do reator, maior a quantidade de enzima necessária para fazer com que a velocidade de reação retorne ao seu

valor inicial. Finalmente, os pulsos são cada vez mais espaçados como consequência das diferentes relações enzima:substrato:produto ao longo da reação.

5.3.4 Validação experimental

Foi validado experimentalmente o perfil de formação de produto obtido na simulação para $r = 0,7.r_{\text{inicial}}$. O procedimento experimental utilizado na realização dos ensaios de validação está descrito no item 5.2.5.3.

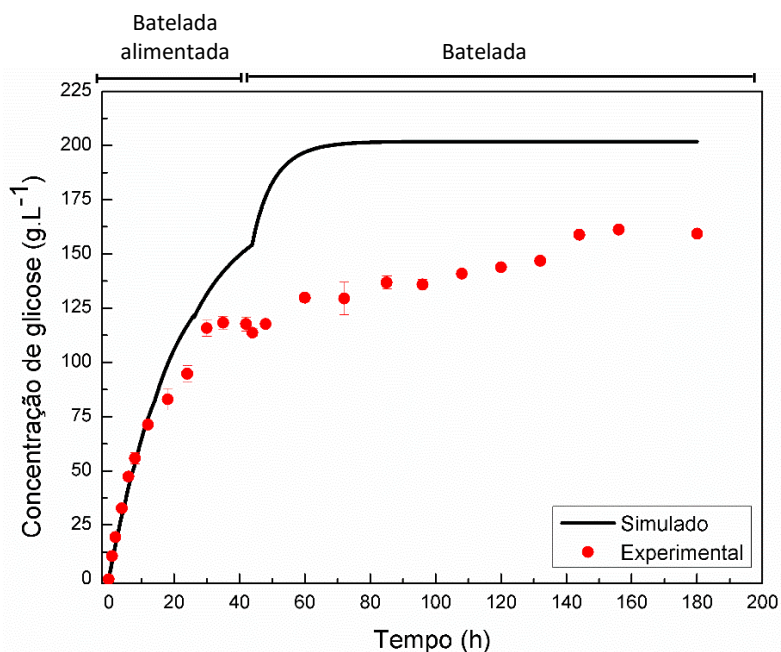
A

Figura 5.3 apresenta os valores de concentração de glicose experimental e simulada em função do tempo de reação. Neste experimento, a biomassa foi adicionada em intervalos de 30 minutos até 44 horas. A Tabela A 1 (Apêndice) apresenta a quantidade de palha adicionada em cada instante de tempo.

A alimentação de substrato foi realizada até as primeiras 44 h de reação. A interrupção da alimentação (fim da operação em batelada alimentada e início da batelada) pode ser verificada na

Figura 5.3 através de uma descontinuidade na curva de formação de glicose, isto é, um aumento instantâneo da concentração de glicose (redução do efeito de diluição).

Figura 5.3 – Concentração de glicose experimental e simulado em função do tempo de reação.



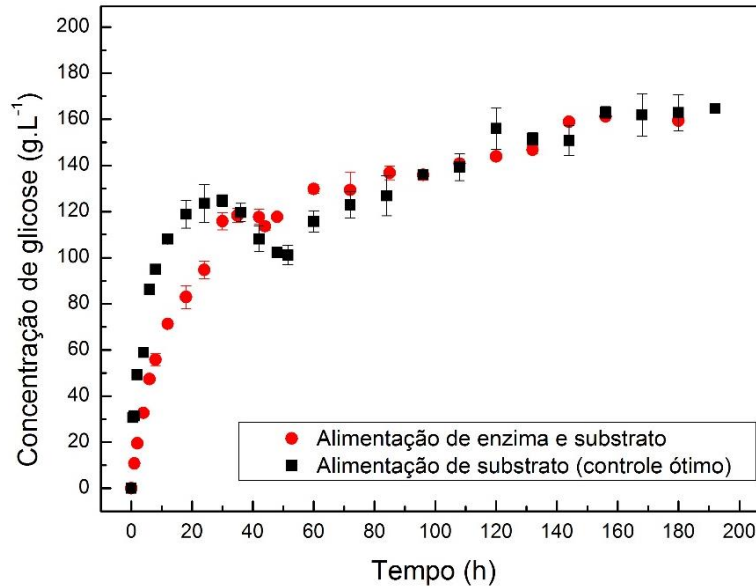
Foi alcançada uma concentração final de glicose de aproximadamente 160 g/L obtida experimentalmente e 202 g/L pela simulação (100 % de conversão). A conversão experimental de celulose foi, portanto, equivalente a 80 % do simulado. Esse descolamento dos dados simulados em relação aos experimentais pode estar atrelado a fenômenos não previstos pelo modelo cinético considerado, tais como: adsorção não-produtiva da enzima na lignina residual; celulose remanescente (cristalina) recalcitrante à hidrólise; desativação térmica da enzima; efeitos difusivos internos, onde altas concentrações de produto podem levar a um difícil acesso de enzima ao substrato, de modo que a concentração final de equilíbrio difere do máximo potencial de glicose presente no meio. Vale destacar também que os parâmetros cinéticos K_m , K_i e V_m utilizados na simulação para determinação do perfil de alimentação de substrato e enzima foram obtidos de experimentos de hidrólise com concentração de glicose da ordem de 50 g/L (PINTO, 2016). No experimento de batelada alimentada foi alcançada concentrações de glicose 3 vezes maior. Assim, sugere-se realizar ensaios de velocidade inicial considerando concentrações mais altas de glicose a fim de obter novos parâmetros cinéticos.

De qualquer forma, quaisquer que tenham sido os fenômenos físicos e químicos que ocasionaram a severa redução observada na velocidade de hidrólise, a reação praticamente alcançou um estado de equilíbrio com 80 % de conversão. Essa questão será discutida com mais detalhes no item 5.3.6.

5.3.5 Comparação das estratégias de alimentação P1 e P2

Foi feita uma análise comparativa entre a estratégia de alimentação estudada neste capítulo (P2) com aquela apresentada por Pinto (2016) (P1). As curvas experimentais obtidas pelas políticas de controle ótimo (P1) e pela política adotada neste capítulo (P2) são mostradas na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Comparação entre perfis experimentais para palha de cana-de-açúcar, utilizando a política de controle ótimo (P1) e a política de alimentação de substrato e enzima (P2).



A estratégia de controle ótimo mostrou um perfil decrescente entre 25-50 h quando comparado à estratégia de alimentação de enzima e substrato. Este é o resultado de uma cinética que não é capaz de hidrolisar o substrato como está sendo alimentado. Isto é decorrente do fato de que no controle ótimo, a alimentação de substrato foi realizada de uma forma “bang-bang” ($vazão=vazão_{máx}$ seguida de $vazão=0$). Assim, no final da batelada alimentada a diluição proveniente da alimentação de palha estaria superando a velocidade de formação do produto. Por outro lado, a estratégia de alimentação P2 mostrou uma resposta mais suave para a concentração de glicose, o que é resultado de um perfil mais adequado para alimentação de substrato. Desta forma, espera-se também respostas mais uniformes para o consumo de potência de agitação.

Os experimentos realizados em ambas as estratégias de alimentação atingiram praticamente a mesma produtividade volumétrica ao final de 180 h, produtividade volumétrica de 0,015 g/(L.min) e conversão de celulose a glicose de 80 %.

Diferentemente da P2, na estratégia P1 toda a enzima é adicionada no início da reação. Assim, a possibilidade de minimizar a quantidade de enzima utilizada é maior na estratégia P2. Por exemplo, trabalhando com a manutenção de maiores cargas de sólidos insolúveis dentro do reator (desde que menores do que 10 % m/v), reduz-se o tempo de alimentação de substrato e a quantidade de enzima adicionada, sem prejuízo ao processo de mistura.

5.3.6 Fatores que afetam a hidrólise enzimática de lignocelulósicos

A fim de entender quais são as principais causas que podem estar associadas à incompleta conversão de celulose em glicose, considerou-se avaliar alguns dos possíveis fenômenos já mencionados, como a adsorção não-produtiva e presença de celulose cristalina. Tais fatores podem ser classificados em dois grupos:

1. Desativação da enzima: as celulasas podem se tornar inativas devido a ligações não produtivas, como por exemplo, enzima-lignina.

2. Transformação do substrato: a recalcitrância da celulose é aumentada durante a reação. Partes facilmente hidrolisadas da celulose (regiões amorfas) são despolimerizadas nos estágios iniciais de reação, deixando frações cristalinas para os estágios finais.

Como primeira parte da investigação, foi avaliado se a adsorção não produtiva de celulasas é um dos fenômenos físicos que está presente. Uma das maneiras de verificar se existem ligações não produtivas de enzima é utilizar agentes bloqueadores de ligações não produtivas. Estes agentes, de maneira geral, impedem a adsorção de enzima em lignina e, até mesmo, desintegram a ligação hemicelulose-lignina, tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático (BRANDT et al., 2013).

Vários aditivos (surfactantes Tween 20 ou 80, polietileno glicol (PEG), albumina de soro bovino, proteína de soja, peptona) têm sido testados com o objetivo de minimizar tal inconveniente (BRONDI et al., 2018; FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2016). A depender da escolha, o custo do processo pode aumentar consideravelmente, inviabilizando seu uso em larga escala. Entre as opções possíveis, escolheu-se no presente estudo a proteína de soja (90 % de proteína; Bremil, Brasil) uma vez que é um dos agentes bloqueadores mais baratos além de fornecer ganhos significativos no rendimento de hidrólise (BRONDI et al., 2018)

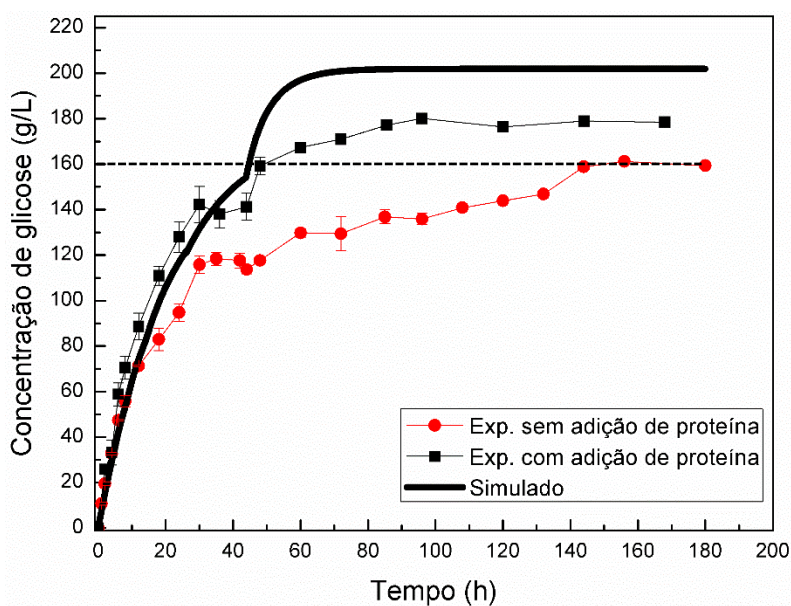
O experimento de validação experimental da estratégia de alimentação P2 foi conduzido novamente, mas agora, com a adição de proteína de soja. A adição foi feita no momento inicial de reação. Brondi et al. (2018) testaram diversas concentrações (8, 12 e 20 % m/m) de proteína de soja na hidrólise enzimática de bagaço de cana explodido. Verificou-se que não houve melhora significativa na hidrólise quando concentrações acima de 8 % foram utilizadas. Deste modo, considerou-se aqui utilizar também uma concentração de 8 % m/m de proteína de soja isolada.

A Figura 5.5 apresenta os perfis da reação de hidrólise enzimática com e sem (dados da

Figura 5.3) adição de proteína de soja, bem como o perfil simulado obtido por meio da estratégia de alimentação P2 (Figura 5.2 (f)).

Verifica-se que houve um ganho na conversão final de celulose em torno de 10 %, o que se traduz em um aumento na concentração final de glicose de 160 para 180 g/L. A linha tracejada revela que com apenas 48 h de reação a concentração de açúcar liberada foi praticamente a mesma daquela obtida em 140 h sem adição de aditivo. Este comportamento suporta o fato de que enzimas estavam inativas (devido a ligações não produtivas), resultando em velocidades de reação menores. Em 48 h de reação, o ganho de produção de glicose foi de 36 %.

Figura 5.5 – Efeito da adição de proteína isolada de soja na hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar.



Análise de espectroscopia de infravermelho de amostras de bagaço de cana-de-açúcar sujeita a hidrólise enzimática com adição de proteína de soja demonstraram evidências da capacidade deste aditivo adsorver na fração de lignina da biomassa, conforme relatado por Brondi et al. (2018).

Eriksson; Karlsson; Tjerneld (2002) investigaram fatores que podem ocasionar a diminuição na velocidade de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Instabilidade

térmica das enzimas e a inibição do produto não foram responsáveis pela redução na velocidade de reação. Os resultados indicaram que ligações não produtivas da enzima é a principal causa. Kristensen; Felby; Jørgensen (2009) avaliaram o efeito de altas concentrações (~30 % m/v) de sólidos na hidrólise enzimática de papel filtro e para este caso também houve uma forte correlação entre o decréscimo da adsorção e a conversão, indicando que a inibição da adsorção da celulase em celulose foi a principal causa da redução do rendimento de sacarificação.

Após 85 h de sacarificação, praticamente não há mais liberação de açúcar. É sugerido que a celulose amorfa, inicialmente presente na biomassa, foi totalmente despolimerizada, restando apenas celulose cristalina, a qual é extremamente difícil de ser hidrolisada.

5.4 Conclusões

Empregando a operação em batelada alimentada, foi possível processar um total de 21 % de carga de sólidos (mantendo aproximadamente 5 % m/v de sólidos insolúveis no meio reacional), com uma conversão máxima de 80 %. Foi obtida uma concentração final experimental de glicose de 160 g/L, sendo adequada do ponto de vista de processo, uma vez que se pode alcançar até 81,6 g/L de etanol (valor dentro da faixa de operação das destilarias brasileiras em que se utiliza sacarose como substrato).

A falta de ajuste dos dados simulados aos dados experimentais foi atribuída a fenômenos que ocorrem no processo e que não foram previstos no modelo cinético. Ensaios realizados para investigar as causas possíveis, sugerem que a razão para o decréscimo da velocidade de reação de hidrólise está associado à ligações não produtivas da enzima, diminuindo assim a quantidade de enzima disponíveis para a reação. Ademais, pode-se dizer que após 85 h de hidrólise a reação praticamente constante.

A estratégia de alimentação P2 mostrou uma resposta mais suave para a concentração de glicose em relação à estratégia P1. Assim, espera-se também respostas mais uniformes para o consumo de potência de agitação.

Capítulo 6: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOBUTANOL AVALIANDO DOIS MODOS DE OPERAÇÃO: SHF E SSF

Como já apresentado no capítulo 2 (item 2.2), o butanol apresenta algumas vantagens técnicas frente ao etanol. O estudo de sua produção a partir de biomassas de baixo custo pode ser também de grande importância para o país. No entanto, no Brasil ainda há poucos estudos sobre a produção de butanol a partir de biomassas lignocelulósicas. Com relação ao uso da palha de cana-de-açúcar, apenas um trabalho (MAGALHÃES et al., 2018) foi encontrado visando à produção de butanol. Assim, o estudo do potencial desta biomassa na produção de biobutanol torna-se um campo de pesquisa importante para o nosso país.

No último ano de doutorado, foi realizado estágio de seis meses no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Engenharia Química da Aalto University (Finlândia), através de uma bolsa de estudos concedida pela Agência Nacional Finlandesa de Educação (EDUFI Fellowship) sob a supervisão do Prof. Dr. Sandip Bankar. Nesse período de doutorado sanduíche, desenvolveram-se estudos voltados à produção de biobutanol por meio da fermentação ABE do hidrolisado da palha de cana-de-açúcar, com o objetivo de avaliar dois diferentes processos de produção: hidrólise e fermentação separadas (SHF) e pré-sacarificação e fermentação simultâneas (PSSSF).

Assim, o estabelecimento de uma interação formal com o grupo do Prof. Sandip Bankar foi uma oportunidade valiosa para obtenção de conhecimentos no tema de doutorado desta tese, podendo ser de impacto extremamente positivo para o desenvolvimento tecnológico do nosso país.

6.1 Introdução

A fermentação ABE é um processo industrial antigo, sendo a principal rota para a produção de n-butanol durante muitos anos no início do século XX. Entretanto, devido a fatores econômicos, como o alto custo do processo e expansão das indústrias petroquímicas, a produção de n-butanol por fermentação declinou em substituição à rota petroquímica. Nos dias atuais, com o estabelecimento de novas políticas energéticas voltadas ao uso de fontes renováveis, a produção de n-butanol através de rota bioquímica recebeu maior atenção e interesse dos pesquisadores (KARIMI et al., 2015).

Da mesma forma que na produção de etanol 2G, a produção de butanol 2G requer etapas de pré-tratamento e hidrólise que visam disponibilizar os polissacarídeos, encontrados nos materiais lignocelulósicos, na forma de açúcares fermentescíveis para o microrganismo.

O microrganismo do gênero *Clostridium* tem a capacidade de converter uma variedade de biomassas e resíduos agrícolas para produção de acetona-butanol-etanol. Esse gênero de bactéria apresenta uma grande vantagem por ser capaz de fermentar hexoses e pentoses presentes em biomassas lignocelulósicas (RAGANATI et al., 2015). A etapa de fermentação ABE é dividida em dois estágios: o primeiro, fase acidogênica, na qual as bactérias utilizam açúcares para o seu crescimento e produção de ácidos acéticos e butíricos, juntamente com gases de dióxido de carbono (CO₂) e hidrogênio (H₂); o segundo, fase solvatogênica, na qual ocorre a conversão de ácidos em Acetona-Butanol-Etanol.

Recentemente, pesquisadores têm estudado a produção de butanol a partir de biomassas lignocelulósicas como polpa de madeira (GUAN et al., 2018), resíduos do cultivo da cana-de-açúcar (LI et al., 2017; MAGALHÃES et al., 2018; REDDY, 2018), palma (IBRAHIM et al., 2015), bagaço de sorgo (QURESHI et al., 2016), palha de arroz (AMIRI; KARIMI; ZILOUEI, 2014) e etc.

A fermentação de butanol celulósico ainda não é economicamente viável, principalmente devido às baixas concentrações de butanol obtidos no meio de fermentação. A principal razão da baixa produção de butanol é a presença de compostos de degradação de açúcar e lignina os quais são inibitórios, além da toxicidade da bactéria causada pelo próprio butanol. Alguns métodos de detoxificação (carvão ativado, *overliming*) e recuperação de solventes (pervaporação, adsorção, extração líquido-líquido e esgotamento com gases) podem ser utilizados para reduzir tais inconvenientes (KUJAWSKA et al., 2015; ZHANG et al., 2018). Etapas de tratamento do hidrolisado implicam em aumento nos custos de produção. Assim, a busca por um processo de pré-tratamento que remova lignina sem gerar concentrações de inibidores num nível tóxico é de extrema importância.

No presente estudo, a palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente foi avaliada como substrato para a produção de biobutanol utilizando *C. acetobutylicum* ATCC 824. O objetivo deste trabalho foi estudar e comparar a eficiência em termos de rendimento e produtividade de dois modos de operação (SHF e PSSF) na produção ABE.

6.2 *Material e métodos*

6.2.1 Substrato e complexo enzimático

O substrato e o complexo enzimático empregados nos experimentos foram descrito nos itens 3.1 e 3.2.

6.2.2 Microrganismo e preparo do inóculo

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 foi utilizado como microrganismo de fermentação ABE empregando como substrato palha de cana-de-açúcar.

Inicialmente, células esporuladas (2 mL) da cultura foram ativadas por choque térmico a 80 °C/2 min em frascos de vidros herméticos contendo 100 mL de Meio Reforçado para *Clostridium* (MRC). Após resfriados em banho de gelo, os frascos foram incubados anaerobicamente a 37 °C, sem agitação, por aproximadamente 20 h (até se atingir DO entre 2,0 e 2,5). O meio MRC é composto por (g/L): glicose (30); extrato de carne (10); peptona (5); extrato de levedura (3); amido (1); NaCl (5); acetato de sódio (3) L-cisteína (0,5) e pH ajustado para $6,8 \pm 0,2$.

Após o tempo de inoculação, 5 % v/v de inóculo foi ressuspenso no hidrolisado de palha de cana-de-açúcar suplementado com meio de fermentação com a seguinte composição (g/L): acetato de amônio (2,2); KH_2PO_4 (0,5); K_2HPO_4 (0,5); vitaminas (ácido para-amino-benzóico (0,1), tiamina (0,1) e biotina (0,01)) e sais minerais ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); NaCl (0,01) (BANKAR et al., 2012). O pH do meio de fermentação foi ajustado para 6,5 com HCl ou NaOH, conforme a necessidade.

Para garantir condições de anaerobiose, todas as soluções foram purgadas com nitrogênio antes de inocular o microrganismo.

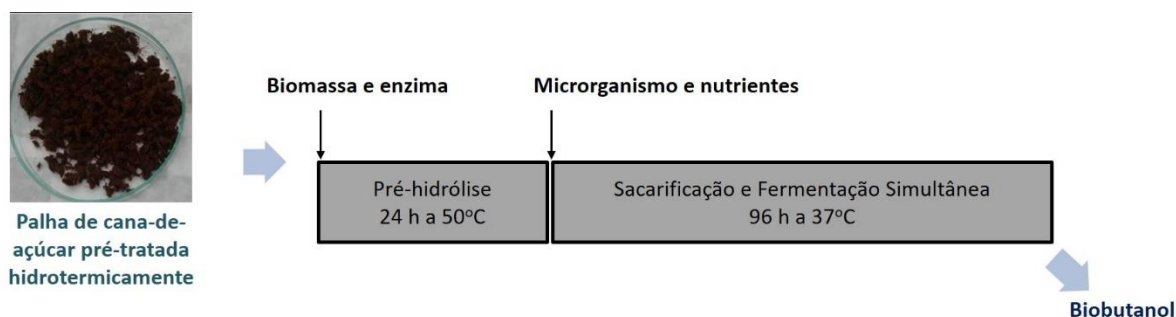
6.2.3 Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação ABE simultâneas

Palha de cana-de-açúcar pré-tratada foi adicionada em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,5). A suspensão foi autoclavada a 121 °C durante 20 min para evitar contaminações durante a etapa de fermentação. Após o resfriamento da suspensão, a enzima foi adicionada (20 FPU/ $\text{g}_{\text{celulose}}$) e então iniciou-se a etapa de pré-sacarificação, a qual durou

24 h, conduzida a 50 °C e 250 rpm em incubadora agitada. Duas concentrações de sólidos (10 e 15 % m/v) foram avaliadas a fim de alcançar níveis de açúcares próximas àsquelas comumente utilizadas em meio sintético na faixa de 50 - 60 g/L e suficientes para o microrganismo conseguir manter a fase solvatogênica.

Após o tempo indicado, a temperatura de reação, pH e agitação foram ajustados a 37 °C, 6,5 e 100 rpm, respectivamente. O hidrolisado foi purgado com nitrogênio para garantir condições de anaerobiose, suplementado com meio de fermentação (previamente descrito) e 5 % (v/v) do inóculo ativo. A etapa SSF foi conduzida por 96 h.

Figura 6.1 – Diagrama esquemático do bioprocesso PSSSF para a produção de produtos ABE a partir de palha de cana-de-açúcar.



Alíquotas do meio reacional foram retiradas em intervalos de 24 h usando uma seringa estéril. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e analisadas quanto ao teor de solventes (butanol, acetona e etanol) e ácidos (ácido acético e ácido butírico).

6.2.4 Hidrólise e fermentação ABE separadas

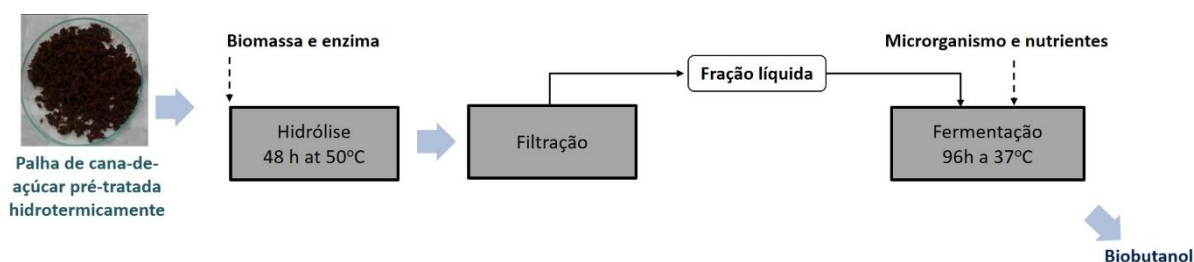
A estratégia de hidrólise e fermentação separadas também foi avaliada na fermentação ABE. O diagrama esquemático do bioprocesso é apresentado na Figura 6.2.

Biomassa pré-tratada (10 e 15 % m/v) foi submetida à hidrólise enzimática em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio reacional, pH 5,5 (tampão acetato 50 mM), agitados a 250 rpm (em incubadora) por 48 h a 50 °C e dosagem enzimática de 20 FPU/g_{celulose}. Ao término da etapa de hidrólise, o hidrolisado contendo os açúcares fermentescíveis foi separado do sólido residual por centrifugação a 10000 rpm por 10 min. A fração líquida foi suplementada com os nutrientes do meio de fermentação (exceto glicose) e

pH ajustado para 6,5. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min para subsequente fermentação do hidrolisado.

A fermentação foi iniciada pela inoculação de pré-inóculo ativo (5 % v/v) e conduzida a 37 °C por 96 h com agitação de 100 rpm. A Figura 6.2 apresenta um diagrama esquemático do bioprocesso SHF empregado neste trabalho.

Figura 6.2 – Diagrama esquemático do bioprocesso SHF para a produção de produtos ABE a partir de palha de cana-de-açúcar.

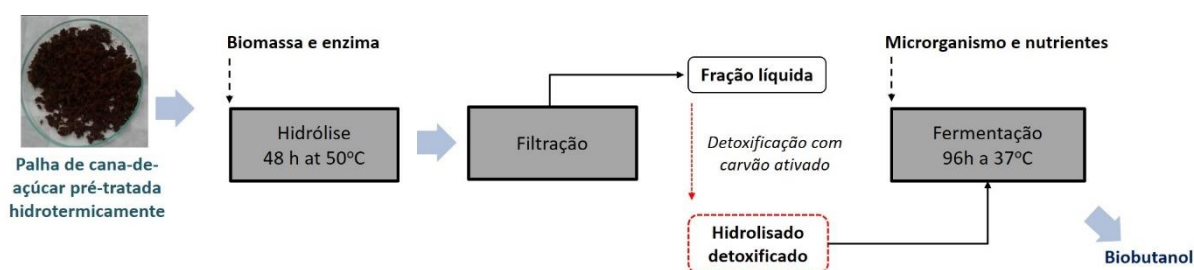


Devido a presença de compostos fenólicos no hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, parte da fração líquida foi detoxificada antes de ser submetida à fermentação a fim de minimizar a concentração de compostos tóxicos para o microrganismo.

6.2.4.1 Detoxificação do hidrolisado de palha de cana-de-açúcar

O diagrama esquemático que representa o processo SHF com detoxificação é apresentado na Figura 6.3.

Figura 6.3 – Diagrama esquemático do bioprocesso SHF para a produção de produtos ABE a partir de palha de cana-de-açúcar, com a inclusão da etapa de detoxificação.



Após hidrólise enzimática, o hidrolisado foi coletado e centrifugado a 15.000 rpm por 20 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido até obter uma solução isenta de sólidos suspensos. Em seguida, o hidrolisado foi detoxificado com a adição de 5 % (m/v) de carvão

ativado (Hydrodarco B, CABOT, Norit American, Inc., Marshall, Texas, EUA) a 28 ° C por 1 h (adaptado de LIU et al., 2015). Em seguida, o hidrolisado foi novamente centrifugado a fim de remover o carvão ativado. Finalmente, o concentrado de açúcares detoxificado foi misturado aos nutrientes do meio de fermentação e autoclavado a 121 °C por 20 min para posterior realização da etapa de fermentação, a qual foi realizada da mesma maneira que no hidrolisado sem detoxificação.

Os experimentos realizados tanto na configuração SHF quanto na configuração PSSSF foram realizados em duplicatas utilizando frascos herméticos de 150 mL contendo 75 mL de meio reacional e os resultados são apresentados como valores médios \pm erro padrão.

Amostras do meio reacional foram retiradas em intervalos de 24 h usando uma seringa estéril. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e analisadas quanto ao teor de solventes (butanol, acetona e etanol) e ácidos (ácido acético e ácido butírico).

6.2.5 Aumento de escala dos melhores ensaios obtidos para a estratégia SHF e PSSSF

As melhores condições encontradas para ambas as estratégias de processo avaliadas foram realizadas também em biorreator de 2 L (New Brunswick Scientific Co, New Brunswick) contendo 1 L de meio reacional sob agitação de 100 rpm, a fim de verificar a reprodutibilidade dos experimentos conduzidos em frascos. No ensaio onde hidrólise e fermentação ocorrem concomitantemente, o biorreator foi autoclavado na presença de biomassa e tampão. Na estratégia de hidrólise e fermentação separadas, o biorreator foi autoclavado na presença do hidrolisado já filtrado proveniente da etapa de hidrólise enzimática. Antes de iniciar a fermentação, gás N₂ foi introduzido ao reator a fim manter o sistema anaeróbio.

6.2.6 Análise de açúcares, solventes, ácidos e compostos fenólicos

Os açúcares (glucose e xilose) foram analisados por sistema de CLAE, utilizando cromatógrafo Waters Alliance e2695, equipado com um detector de índice de refração (waters 2414) e coluna de exclusão iônica (Rezex ROA-Organic acid H⁺ (8 %)). A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 5 mM a 0,6 mL/min e temperatura de operação 65 °C.

Produtos da fermentação (acetona, butanol, etanol, ácido acético e ácido butírico) foram quantificados utilizando cromatografia gasosa (Agilent Technologies 7890B) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar AB-INNOWAX (30 m x 0,32 mm x 1 µm). Temperaturas foram mantidas a 200 °C e 250 °C para o injetor e detector, respectivamente, com volume de injeção de 10 µL.

O teor de compostos fenólicos totais foi estimado pelo método Folin-Ciocalteu adaptado de Xu e Chang (2009), com pequena modificação. Amostras de hidrolisado (20 µL) foram diluídas em água destilada (1580 µL), misturadas com reagente Folin-Ciocalteu 2N (100 µL) e incubadas por 3 min em temperatura ambiente e ausência de luz. A reação foi interrompida pela adição de 300 µL de Na₂CO₃ (200 g/L). A mistura foi novamente incubada no escuro por 25 min. As amostras foram medidas a 765 nm, em um espectrofotômetro UV visível de microplacas (PowerWave HT – BioTek). O teor de fenólicos totais contido nas amostras foi determinado pelo uso de uma curva padrão de ácido gálico (5-500 µg/mL). A análise foi realizada em triplicata.

6.2.7 Procedimentos de cálculos e análise estatística dos resultados

O rendimento de produtos ABE foi baseado na quantidade de açúcares totais consumido durante a fermentação conforme mostra na equação 6.1.

$$\text{Rendimento ABE} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{C_{ABE}}{C_{açúcares,0} - C_{açúcares,f}} \quad (6.1)$$

onde: C_{ABE} é a concentração (g/L) de acetona, butanol e etanol produzidos ao final da fermentação; $C_{açúcares,0}$ é a concentração de açúcares no momento inicial de fermentação e $C_{açúcares,f}$ é a concentração de açúcares no momento final de fermentação.

A produtividade em solventes foi calculada de acordo com a equação 6.2.

$$\text{Produtividade em ABE} \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) = \frac{C_{ABE}}{t_{total}} \quad (6.2)$$

onde t_{total} (h) considera o tempo de hidrólise ou pré-sacarificação somado ao tempo de fermentação.

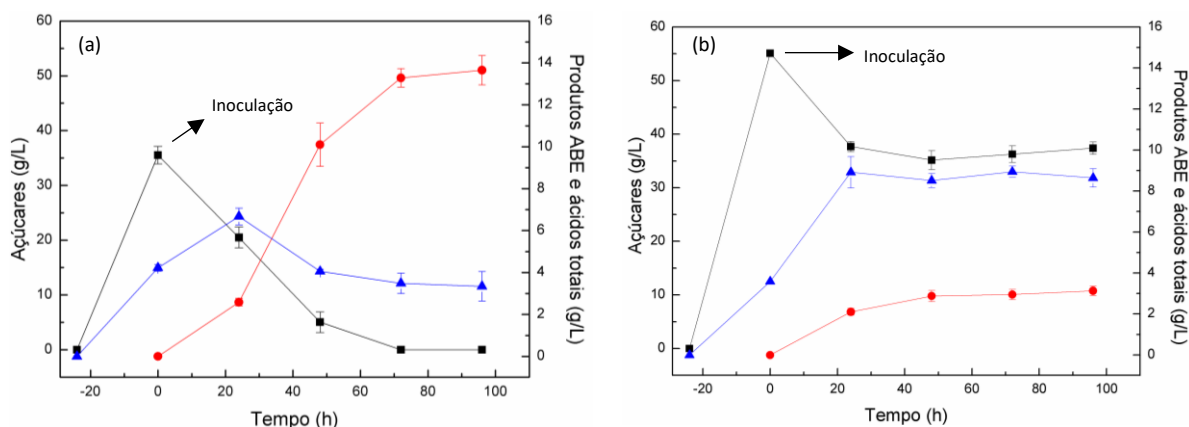
A significância estatística das diferenças entre os diferentes grupos avaliados foi verificada através do teste Tukey utilizando o software Excel, em um nível de confiança de 95 %.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultânea

O efeito da concentração de biomassa foi avaliado na produção de produtos ABE utilizando a estratégia PSSSF. Nas Figura 6.4 (a) e (b) são apresentados os perfis de consumo de açúcares, produção e consumo de ácidos e produção de solventes durante a fermentação ABE em concentrações iniciais de biomassa de 10 e 15 % m/v, respectivamente.

Figura 6.4 – Pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas de pré-hidrolisado em concentrações de 10 (a) e 15 (b) % m/v de palha de cana-de-açúcar.



Símbolos: ■ Açúcares (glicose + xilose); ● Solventes (acetona, butanol e etanol); ▲ Ácidos (acético + butírico)

Verifica-se que o efeito da concentração de biomassa inicial é bastante pronunciado na produção de produtos ABE, sendo observado uma produção 4,4 vezes maior para a concentração de 10 % m/v de palha de cana-de-açúcar. Para essa mesma condição, a glicose disponível foi praticamente 100 % consumida. Para 15 % da biomassa, o consumo de açúcar permaneceu praticamente inalterado após 24 h de fermentação, com um aproveitamento de açúcar de apenas 32 %.

Maiores concentrações de biomassa geram maiores concentrações de açúcar, porém, acompanhado de maiores níveis de inibidores (furanos e fenólicos) e ácidos

produzidos durante a hidrólise enzimática (SANTOS-ROCHA et al., 2018). Deste modo, uma das possíveis justificativas para a baixa produção de butanol e consumo de açúcar na condição de 15 % de sólidos pode estar associada a combinação da presença de compostos inibidores e ácidos que, a depender da concentração, podem alterar o funcionamento do metabolismo celular de bactérias *Clostridium* e resultar em um hidrolisado não fermentável (BARAL; SHAH, 2014).

A fim de obter conclusões mais sólidas sobre as hipóteses sugeridas, mediu-se a concentração de compostos fenólicos no início e no final da fermentação. A Tabela 6.1 apresenta essas informações, bem como os individuais obtidos ao final de 96 h de fermentação.

Tabela 6.1 – Efeito da carga de sólidos inicial na produção ABE usando após 96 h de fermentação usando a estratégia PSSSF.

| | Carga de sólidos 10 % m/v | Carga de sólidos 15 % m/v |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Acetona (g/L) | 5,38 ± 0,01 | 1,46 ± 0,24 |
| Butanol (g/L) | 7,63 ± 0,72 | 1,58 ± 0,23 |
| Etanol (g/L) | 0,64 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 |
| ABE total (g/L) | 13,65 ± 0,70 | 3,13 ± 0,33 |
| Rendimento (g_{ABE}/g_{açúcares})^a | 0,35 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 |
| Ácido acético (g/L) | 2,00 ± 0,70 | 5,39 ± 0,25 |
| Ácido butírico (g/L) | 1,34 ± 0,04 | 3,24 ± 0,33 |
| Ácidos totais (g/L) | 3,34 ± 0,70 | 8,63 ± 0,41 |
| Velocidade de produção de ácidos (g/(L.h))^b | 0,10 ± 0,03 | 0,22 ± 0,05 |
| Fenólicos (g/L) | 0,65 ± 0,04 | 0,88 ± 0,02 |

^a valor estimado uma vez que a produção de açúcar continua durante o processo SSF e não dá para ser medida já que o açúcar vai sendo consumido conforme é produzido.

^b valor determinado nas primeiras 24 h de fermentação.

Verifica-se que a velocidade de produção de ácidos para 15 % de sólidos foi tão alta (cerca de 2,2 x maior que para 10 % de biomassa) que concentrações de ácidos em níveis tóxicos foram formados rapidamente, restringindo a fase solvatogênica. A produção de solventes foi iniciada, mas após 24 h de fermentação as atividades metabólicas, incluindo consumo de açúcar, produção de ácidos e solventes foi praticamente cessada. Como resultado desse comportamento, sugere-se que o fenômeno de efeito “acid crash” ocorreu, fato que é

observado pela alta concentração de ácidos totais obtidos ao final da fermentação. Ou seja, o microrganismo foi inicialmente capaz de utilizar açúcar para a produção de ácido acético e butírico, entretanto, tais ácidos não foram reassimilados adequadamente (IBRAHIM et al., 2015). Assim, observam-se altas concentrações de ácido com baixa concentração de produtos ABE, comportamento este oposto ao observado para a concentração de 10 % m/v de biomassa.

Maddox et al. (2000) avaliaram que o fenômeno “acid crash” ocorre quando concentrações de ácidos na sua forma não-dissociada excedem 60 mmol/L, isto é, concentrações total de ácidos acima de 3,6 g/L (situação hipotética quando somente ácido acético está presente). Nos resultados apresentados na Tabela 6.1 nota-se uma concentração maior de ácido acético, indicando possível limitação na transição da fase acidogênica para a solvatogênica.

Outra possível causa que deve ser observada é o aumento da concentração de compostos fenólicos com o aumento do teor de biomassa. Compostos fenólicos, tais como ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico, siringaldeído, vanilina são extremamente tóxicos para as bactérias, mesmo quando em baixas concentrações uma vez que elas agem na membrana celular, levando a ruptura da mesma (IBRAHEEM; NDIMBA, 2013).

Cho; Lee; Um (2009) mostraram que compostos fenólicos interferem na via metabólica da troca da fase acidogênica pela solvatogênica, o qual afeta a produção de solventes. Os autores observaram que apenas 1 g/L de compostos fenólicos foi suficiente para inibir completamente a produção de butanol. Ezeji e Blaschek (2008), durante uma investigação sobre o efeito de inibidores de hidrolisado lignocelulósico na produção ABE por *Clostridium*, encontraram que compostos fenólicos em concentrações acima de 0,5 g/L foram extremamente inibitórios para o crescimento de diferentes espécies *Clostridium* e produção ABE. Lee et al. (2015) corroboraram essa afirmação ao verificar que a presença de 0.87 g/L de compostos fenólicos presentes no hidrolisado de palha de arroz inibiram a produção de ácido butírico por *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, indicando elevada toxicidade do microrganismo por compostos fenólicos. Além disso, foi identificado que dentre os diferentes inibidores (furanos e compostos fenólicos) presentes no meio de fermentação, os fenólicos se apresentaram como os mais prejudiciais ao processo fermentativo.

Deste modo, pode-se inferir há um limite no qual o microrganismo é capaz de tolerar a presença de compostos fenólicos. Provavelmente, na condição de maior concentração

de fenólicos houve um desequilíbrio no metabolismo da bactéria resultando em uma falha na troca da fase acidogênica pela solvatogênica.

Outro fator que deve ser considerado é que em elevado teor de sólidos (concentrações acima de 15 % m/v), problemas de mistura e resistência à transferência de massa são mais pronunciados (CHEN; LIU, 2016; MODENBACH; NOKES, 2013) podendo ser uma das causas da baixa produção de butanol (QURESHI et al., 2014). Agitações mecânicas adequadas desempenham um papel importante para garantir uma suspensão homogênea entre nutrientes, substrato e microrganismos em sistemas SSF, no entanto, rotações acima de 150 rpm podem danificar as células de *Clostridium*, levando a uma consequente diminuição na atividade celular (QURESHI et al., 2014).

Assim, como alternativa ao processo PSSSF, a estratégia SHF foi estudada, onde somente a fração do hidrolisado líquido foi fermentado. Além disso, para minimizar os efeitos dos compostos fenólicos presentes, uma etapa de detoxificação com carvão ativado foi também estudada.

6.3.2 Hidrólise e fermentação ABE separadas

Fermentações foram realizadas utilizando hidrolisado de palha de cana-de-açúcar não detoxificado e detoxificado. Fermentações ABE com meio sintético em concentrações de glicose equivalentes àsquelas obtidas no final da hidrólise enzimática foram conduzidos a fim de avaliar e comparar com a produção de butanol do hidrolisado derivado de biomassa lignocelulósica. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Efeito da concentração de glicose inicial em meio hidrolisado não detoxificado e detoxificado na produção ABE após 96 h de fermentação

| | Ensaio 1 | Ensaio 2 | Ensaio 3 | Ensaio 4 | Ensaio 5 | Ensaio 6 |
|--|-------------------------------|---|---|---------------------------|---|---|
| | Controle 10% | Hidrolisado 10% Não detoxificado | Hidrolisado 10% Detoxificado | Controle 15% | Hidrolisado 15% Não detoxificado | Hidrolisado 15% Detoxificado |
| Glicose inicial (g/L) | 45 | 45,66 ± 1,92 | 44,98 ± 1,67 | 70 | 68,48 ± 1,43 | 67,96 ± 1,66 |
| Xilose inicial (g/L) | 5 | 4,87 ± 0,03 | 4,69 ± 0,11 | 10 | 7,73 ± 0,32 | 6,98 ± 0,27 |
| Açúcares consumido (g/L) | 47,76 ± 1,61 | 40,84 ± 2,56 | 47,21 ± 0,34 | 48,85 ± 2,14 | 22,03 ± 1,51 | 49,12 ± 1,24 |
| Acetona (g/L) | 4,31 ± 0,17 | 3,32 ± 0,36 | 3,51 ± 0,03 | 4,71 ± 0,33 | 0,87 ± 0,08 | 4,21 ± 0,19 |
| Butanol (g/L) | 10,33 ± 0,68 ^{a,b,c} | 8,82 ± 0,27 ^a | 9,08 ± 0,91 ^{a,b,c} | 11,29 ± 0,39 ^c | 2,13 ± 0,06 ^d | 11,33 ± 0,68 ^{b,c} |
| Etanol (g/L) | 1,23 ± 0,05 | 0,88 ± 0,11 | 0,98 ± 0,02 | 1,27 ± 0,10 | 0,20 ± 0,02 | 1,37 ± 0,09 |
| ABE total (g/L) | 15,86 ± 0,70 ^{a,b} | 13,02 ± 0,46 ^a | 13,57 ± 0,91 ^a | 17,27 ± 0,49 ^b | 3,20 ± 0,11 ^c | 16,91 ± 0,71 ^b |
| Rendimento (g_{ABE}/g_{açúcares}) | 0,33 ± 0,02 ^{e,f} | 0,32 ± 0,02 ^{e,f} | 0,29 ± 0,02 ^e | 0,35 ± 0,02 ^f | 0,15 ± 0,01 ^g | 0,34 ± 0,02 ^{e,f} |
| Ácido acético (g/L) | 0,82 ± 0,18 | 2,71 ± 0,42 | 2,20 ± 0,70 | 1,51 ± 0,40 | 5,48 ± 0,53 | 2,03 ± 0,35 |
| Ácido butírico (g/L) | 0,62 ± 0,06 | 1,45 ± 0,16 | 1,22 ± 0,05 | 0,90 ± 0,06 | 1,97 ± 0,71 | 1,37 ± 0,15 |
| Ácidos totais (g/L) | 1,44 ± 0,19 | 4,16 ± 0,45 | 3,42 ± 0,70 | 2,42 ± 0,41 | 7,44 ± 0,88 | 3,40 ± 0,38 |
| Fenólicos (g/L) | - | 0,64 ± 0,04 ⁱ | 0,04 ± 0,02 | - | 0,95 ± 0,01 ^j | 0,09 ± 0,02 |

* As letras minúsculas sobrescritas representam o teste Tukey para comparações múltiplas entre colunas considerando um nível de confiança de 95%.

Ambos os ensaios 1 e 4 foram realizados contendo açúcar puro para simular a quantidade de glicose e xilose no hidrolisado a fim de ser comparativo com os ensaios de fermentação 2 e 3; 5 e 6, respectivamente. Observa-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na produção de butanol e ABE nos ensaios 1 e 4, indicando que concentrações muito altas de glicose (> 60 g/L) não se traduzem em maiores incrementos na concentração dos solventes, podendo até ser inibitório para o microrganismo. No ensaio 1 a fermentação resultou em 10,33, 15,86 e 1,44 g/L de butanol, ABE e ácidos totais, respectivamente. Para o ensaio 4, butanol, ABE e ácidos totais atingiram concentrações de 11,29, 17,27 e 2,42 g/L, respectivamente. Por outro lado, a diferença no consumo final de açúcar entre os dois ensaios é notável. A conversão de açúcar foi de 95 % no ensaio 1, contra 61 % no ensaio 4.

Provavelmente o incompleto aproveitamento dos açúcares disponíveis tanto no ensaio 4 quanto no ensaio 6 é devido ao fato de ambos terem atingido uma concentração de butanol (~ 12 g/L) considerada tóxica ao microrganismo, inibindo seu crescimento celular (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2003). Este problema poderia ser mitigado ao incluir um sistema de recuperação de produto ao passo que os solventes são produzidos. Concentrações de butanol seriam diminuídas no meio reacional e assim a bactéria continuaria seu processo de assimilação de açúcar (KUJAWSKA et al., 2015).

Da mesma forma que na estratégia PSSSF, observa-se aqui também uma diferença bastante significativa na produção de solventes para as condições com 10 e 15 % de biomassa (ensaios 2 e 5), alcançando 13,02 e 3,20 g/L, respectivamente. Com esta observação, poderia-se descartar a hipótese de problemas de mistura e transferência de massa associados à elevada carga de biomassa, uma vez que aqui somente a fração líquida foi fermentada. Deste modo, a explicação mais plausível para a baixa produção é a presença de inibidores no hidrolisado. O tratamento de detoxificação foi aplicado a fim de investigar se há melhorias na fermentabilidade do hidrolisado.

Verifica-se que as produções de butanol e ABE aumentaram em torno de 5,3 vezes quando o ensaio 5 foi submetido à detoxificação (ensaio 6), resultando em 11,33 g/L de butanol e 16,9 g/L de ABE, valores estes estatisticamente iguais aos do experimento controle (ensaio 4). Somente 2,13 g/L de butanol foi produzido na fermentação direta do hidrolisado sem detoxificação. O aproveitamento de açúcar melhorou de 29 % para 65,5 % quando a detoxificação foi utilizada no processo. Claramente, esta etapa teve um efeito extremamente positivo no desempenho da fermentação. A remoção de compostos fenólicos do hidrolisado foi em torno de 90 %, passando de 0,95 g/L para 0,09 g/L ao final da fermentação. Qureshi et

al. (2016) também observaram uma melhora significativa na produção ABE quando hidrolisado de bagaço de sorgo (86 g/L) foi detoxificado, passando de 3,85 para 16,78 g/L de ABE e produtividade de 0,09 para 0,56 g/(L.h).

Por outro lado, as produções de butanol e ABE nos hidrolisados com menor concentração de açúcares (ensaios 2 e 3) foram similares ao do experimento controle (ensaio 1), sugerindo que a etapa de detoxificação foi desnecessária, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de concentração de solventes total.

O efeito da detoxificação, possivelmente, não foi detectado no ensaio 2 por que a concentração de fenólicos não foi suficientemente alta para a inibição da bactéria. Entretanto, no ensaio 5, a concentração de fenólicos possivelmente atingiu um limite prejudicial, ocasionando o efeito “acid crash”, fenômeno que é notado pela diferença na produção de ácidos totais entre os dois ensaios.

Embora uma maior produção de solventes tenha sido alcançada no ensaio 6 em comparação ao ensaio 2, o hidrolisado de maior carga de biomassa requer uma etapa de tratamento, o que implica em custos extras ao processo. Deste modo, na sequência dos experimentos foi considerado como 10 % m/v como carga inicial de biomassa, para ambos os processos.

Como experimento final, os processos SHF e PSSF foram realizados em biorreator de 2 L, a fim de verificar a repetibilidade dos resultados em maior escala.

6.3.3 Aumento de escala e comparação dos processos SHF e PSSF

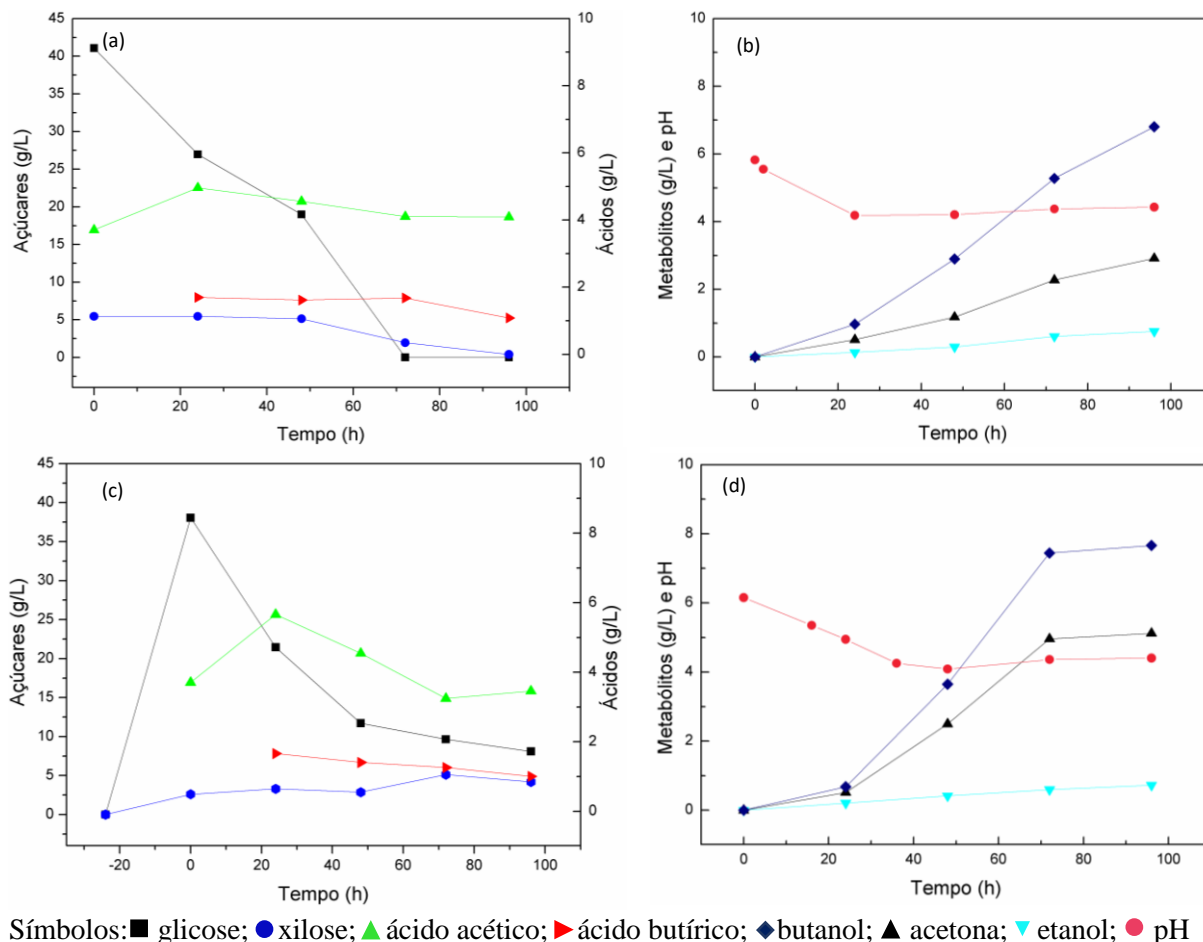
A fim de se comparar os desempenhos dos dois processos, reduziu-se o tempo de hidrólise enzimática no processo SHF de 48 para 24 h, uma vez que para o processo PSSF a etapa de pré-sacarificação é conduzida por 24 h.

Os resultados obtidos ao longo da fermentação de hidrolisado da palha de cana-de-açúcar estão apresentados nas Figura 6.5 (a-d).

Nota-se que os perfis de consumo de açúcar, produção de ácidos bem como seu consumo, produção de solventes e alteração de pH ao longo da reação são bastante similares para ambos os processos. Primeiramente os açúcares são assimilados pelo microrganismo que excreta ácidos acético e butírico atingindo seus valores máximos nas primeiras 24 h de fermentação. Nesta etapa, o pH do meio reacional reduz, chegando a um mínimo em torno de 4,60. Em resposta à essa mudança, os ácidos são assimilados produzindo acetona, butanol e

etanol. Com a redução da concentração de ácidos durante a fase solvatogênica, o pH do meio tem um pequeno aumento.

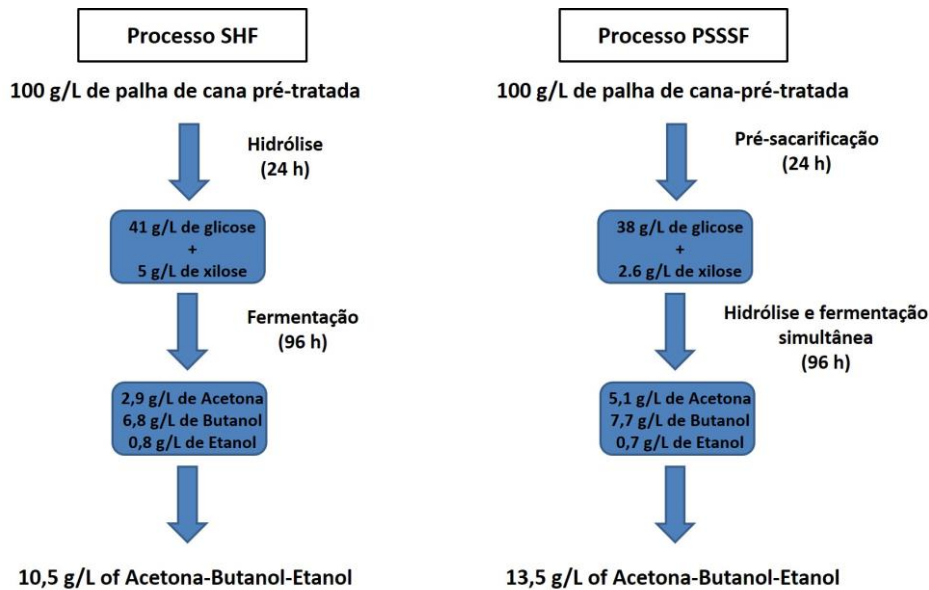
Figura 6.5 – Consumo de açúcar e produção de metabólitos ao longo da fermentação ABE de palha de cana-de-açúcar (10 % m/v) pelos processos SHF (a-b) e PSSSF (c-d).



Observa-se na Figura 6.5 (d) que após 72 h de fermentação a produção de solventes cessou, indicando que o processo PSSSF foi mais favorável em termos de produtividade (0,181 g/(L.h) contra 0,113 g/(L.h) para o processo SHF). Comportamento bastante similar também foi verificado por Zhang et al. (2013) que observaram uma maior produtividade da fermentação ABE de espiga de milho através do processo SSF, obtendo 0,15 g/(L.h), superior à 0,12 g/(L.h) do processo SHF. Verifica-se ainda a presença de açúcar residual ao final de 96 h (Figura 6.5 (c)), totalizando em 12,3 g/L de glicose e xilose. É natural que haja liberação de açúcares durante o processo de hidrólise e fermentação simultânea. Provavelmente o acúmulo de açúcar se deu pelo fato da reação de hidrólise enzimática estar ocorrendo e a bactéria já estar em fase estacionária.

A Figura 6.6 mostra os resultados sob uma perspectiva global de produção ABE.

Figura 6.6 – Acetona-Butanol-Etanol obtidos da palha de cana-de-açúcar pré-tratada através do processo SHF e PSSSF conduzido em reator de 2L.



A concentração de butanol obtida foi bastante similar em ambas as estratégias. Entretanto, o processo PSSSF apresentou uma produção de ABE ligeiramente maior comparado ao processo SHF, sendo que para cada 100 g/L de palha de cana-de-açúcar pré-tratada, 10,5 e 13,5 g/L de produtos ABE foram alcançados nos processos SHF e PSSSF, respectivamente, o que corresponde a um rendimento de 131 L e 170 L de ABE por tonelada de palha de cana-de-açúcar pré-tratada.

Ambas as estratégias aplicadas demonstram resultados comparáveis com os apresentados pela literatura utilizando matérias-primas lignocelulósicas. Liu et al. (2015) avaliaram o potencial de produção de gramínea “*switchgrass*” pré-tratada hidrotermicamente na produção de produtos ABE por *C.acetobutylicum* ATCC 824. Os autores conseguiram obter 16,8 g/L de ABE com rendimento de 0,30 g_{ABE}/g_{açúcares} utilizando a estratégia SHF. Entretanto, uma etapa de detoxificação foi necessária para viabilizar a fermentação ABE do hidrolisado lignocelulósico. He; Kuo; Li (2017) estudaram a fermentação ABE de capim-elfante pré-tratado (0,5 % m/v NaOH), utilizando a estratégia SSF, concentrações de ABE de 15,25 g/L e rendimento de 0,36 g_{ABE}/g_{açúcares} foram obtidos.

6.4 Conclusões

O efeito sinérgico de ácidos fracos (acético e butírico) e compostos fenólicos, tornaram o hidrolisado de palha de cana-de-açúcar pouco fermentável para a concentração de biomassa de 15 % m/v. Uma etapa de detoxificação foi necessária antes do hidrolisado ser fermentado. Os efeitos foram positivos sobre a produção e rendimento ABE, aumentando de 3,2 g/L para 17 g/L e de 0,15 g_{ABE}/g_{açúcares} para 0,28 g_{ABE}/g_{açúcares}, respectivamente. Por outro lado, na condição de 10 % m/v, foi possível obter satisfatória produção (13,02 g/L) e rendimento (0,32 g_{ABE}/g_{açúcares}) ABE mesmo sem a inclusão de uma etapa de detoxificação.

Experimentos em reator de 2 L foram conduzidos apenas para a condição de 10 % m/v operando nos dois modos de configuração de processo avaliados, SHF e PSSSF. Ambas as estratégias alcançaram concentração de butanol bastante similar. Em termos de produtividade, o processo PSSSF foi 60 % mais elevado. Assim, seria possível estimar um rendimento de 170 L de ABE por tonelada de palha de cana-de-açúcar pré-tratada, sendo 65 L correspondente a acetona, 95 L correspondente ao butanol e 10 L correspondente ao etanol.

Capítulo 7: CONCLUSÕES DA TESE

A metodologia de superfície de resposta combinada com a abordagem de função de desejabilidade mostrou ser uma ferramenta bastante útil para encontrar um equilíbrio entre obter alta eficiência global em etanol e alta produtividade global em etanol. Sob condições otimizadas, Foi possível obter um rendimento de 290 L/ton de palha de cana pré-tratada em apenas 45 h de processo global (33 h de PS + 12 h de SSF), o que representaria um incremento de 23 % na produção nacional de etanol.

Ademais, verificou-se que os modelos matemáticos utilizados para descrever o processo PSSSF de palha de cana-de-açúcar forneceram uma boa previsão de resposta, podendo também ser úteis no estudo de processos simultâneos com outras culturas lignocelulósicas para a produção de etanol 2G.

Experimentos de hidrólise operando em modo batelada alimentada mostraram que a adição de enzima e substrato é uma estratégia melhor do que somente adição de substrato. Com a determinação de um perfil ótimo de alimentação foi possível atingir níveis de glicose (~ 160 g/L) adequado do ponto de vista industrial. Verificou-se que fenômenos não previstos pelo modelo cinético proposto estão associados à adsorção não produtiva das enzimas, bem como a presença de celulose cristalina (extremamente difícil de ser hidrolisada em tempo factível).

Com relação ao estudo da produção de butanol, os resultados demonstraram que a fermentação ABE empregando biomassas lignocelulósicas como matéria-prima é um grande desafio uma vez que dependendo das condições de pré-tratamento e hidrólise, o efeito sinérgico de ácidos fracos e compostos fenólicos pode ser extremamente tóxica as bactérias do gênero *Clostridium* e assim tornar o hidrolisado pouco fermentável.

Das duas concentrações de biomassa avaliadas (10 e 15 % m/v), a concentração de 10 % m/v se mostrou mais favorável uma vez que não houve a necessidade de detoxificação do hidrolisado para promover produções ABE satisfatórias.

Entre as configurações de processo testadas, ambas, SHF e PSSSF, obtiveram concentrações final de butanol bastante similares. Entretanto, a estratégia PSSSF se mostrou mais eficiente em termos de produtividade. Pode-se estimar um rendimento de 170 L de ABE por tonelada de palha de cana-de-açúcar pré-tratada, sendo 65 L correspondente a acetona, 95 L correspondente ao butanol e 10 L correspondente ao etanol.

Fazendo um comparativo com o rendimento de etanol obtido no Capítulo 4, temos que a produção de etanol foi 300 % maior (290 L de etanol contra 95 L de butanol). Considerando que o potencial energético de butanol é 30 % maior que o do etanol, para que o a produção de ambos os combustíveis seja comparativa o rendimento de butanol deveria ser em torno de 2,35 vezes maior do que o obtido, ou seja, alcançar 223 L de butanol/ton de palha pré-tratada.

Capítulo 8: SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos, algumas sugestões para a realização de trabalhos futuros:

- Aprimorar o modelo de Michaelis-Menten proposto no capítulo 5 considerando novos parâmetros cinéticos, especialmente para a etapa de batelada simples, onde houve grande diferença entre o perfil de glicose simulado e o perfil de glicose experimental;
- Aplicar a estratégia de alimentação de substrato e enzima estudada no capítulo 5, mas agora para a etapa de pré-sacarificação, visando à obtenção de alta produtividade e conversão de celulose a etanol, operando, assim que possível, com relações produto/enzima mais favoráveis do que em operação em batelada já avaliada no planejamento experimental do capítulo 4.
- Considerar o uso de agentes bloqueadores na etapa de hidrólise enzimática a fim de aumentar a conversão de celulose a glicose, dando a possibilidade de redução no uso da enzima;
- Integrar um sistema de recuperação de produto a fermentação ABE a fim de aumentar a produção de butanol.

Referências bibliográficas

- ALFANI, F. et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 184–192, 1 out. 2000.
- ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, S. G.; DUMESIC, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 24, p. 8075, 2012.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, jul. 2010.
- AMIRI, H.; KARIMI, K.; ZILOUEI, H. Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol and ethanol production. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 152, p. 450–456, 2014.
- AMOAH, J. et al. Development and evaluation of consolidated bioprocessing yeast for ethanol production from ionic liquid-pretreated bagasse. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1413–1420, 2017.
- ASK, M. et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 10, p. 1452–1459, 2012.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway : A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.
- BANKAR, S. B. et al. Continuous two stage acetone-butanol-ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 110–116, 2012.
- BANKAR, S. B. et al. Biobutanol: the outlook of an academic and industrialist. **RSC Advances**, v. 3, n. 47, p. 24734–24757, 2013.
- BARAL, N. R.; SHAH, A. Microbial inhibitors : formation and effects on acetone-butanol-ethanol fermentation of lignocellulosic biomass. p. 9151–9172, 2014.
- BATISTA, G. et al. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 321–327, 2019.
- BEGUM, S.; DAHMAN, Y. Enhanced biobutanol production using novel clostridial fusants in simultaneous saccharification and fermentation of green renewable. p. 529–544, 2015.
- BINOD, P. et al. **Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.
- BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, 2013.
- BRONDI, M. G. et al. Alternative Low-Cost Additives to Improve the Saccharification of Lignocellulosic Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–13, 2018.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- CARTÓN, A. et al. Selection of adsorbents to be used in an ethanol fermentation process. Adsorption isotherms and kinetics. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 75–78, out. 1998.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

CARVALHO, D. M. DE et al. Cold alkaline extraction as a pretreatment for bioethanol production from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. **Energy Conversion and Management**, v. 124, p. 315–324, 2016.

CAVALAGLIO, G. et al. Response surface methodology for the optimization of cellulosic ethanol production from *Phragmites australis* through pre-saccharification and simultaneous saccharification and fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 431–437, 2016.

CAVALCANTI-MONTAÑO, I. D. et al. Optimal Bioreactor Operational Policies for the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 776–785, 2013.

CHEN, H.-Z.; LIU, Z.-H. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. **Engineering in Life Sciences**, n. January 2018, 2016.

CHO, D. H.; LEE, Y. J.; UM, Y. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. p. 1035–1043, 2009.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 82–92, 2016.

CHUNG, D. et al. Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 24, p. 8931–8936, 2014.

CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Power consumption evaluation of different fed-batch strategies for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 5, p. 825–833, 22 maio 2016.

DA SILVA, A. S. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

DA SILVA, S. S. et al. Fermentative production of value-added products from lignocellulosic biomass. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 826162, 2012.

DAGNINO, E. P. et al. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 363–368, 2013.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 22 out. 1980.

DING, S.-Y.; HIMMEL, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 3, p. 597–606, fev. 2006.

EIA. **U.S. fuel ethanol production capacity continues to increase**. Disponível em: <<https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=36774>>.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (cel7A) and endoglucanase I (cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 41–60, 2002.

EZEJI, T.; BLASCHEK, H. P. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia. v. 99, p. 5232–5242, 2008.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 595–603, 2003.

- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. **Berlin: Walter de Gruyter**, 1989.
- FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 172–180, 2016.
- FOCKINK, D. H. et al. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Treated Sugarcane Bagasse: Effect of Enzyme Loading and Substrate Total Solids on Its Fractal Kinetic Modeling and Rheological Properties. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 6, p. 6211–6220, 15 jun. 2017.
- FOND, O. et al. Cellulose fermentation by a coculture of a mesophilic cellulolytic *Clostridium* and *Clostridium acetobutylicum*. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 13, p. 217–224, 1983.
- GARCIA, A.; IANNOTTI, E. L.; FISCHER, J. L. Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 6, p. 785–791, 1986.
- GHOSE, T. . Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 1, p. 17–24, jan. 2010.
- GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.
- GUAN, W. et al. Acetone-butanol-ethanol production from Kraft paper mill sludge by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 713–721, 2016.
- GUAN, W. et al. Acetone–Butanol–Ethanol Production from Fermentation of Hot-Water-Extracted Hemicellulose Hydrolysate of Pulping Woods. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 57, n. 2, p. 775–783, 17 jan. 2018.
- GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712–725, fev. 2015.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550–567, 2015.
- GUPTA, R. et al. Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 16, 2012.
- HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006.
- HE, C. R.; KUO, Y. Y.; LI, S. Y. Lignocellulosic butanol production from Napier grass using semi-simultaneous saccharification fermentation. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 101–108, 2017.
- HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 289–293, 2013.
- HUANG, R. et al. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. **BioEnergy Research**, v. 4, n. 4, p. 225–245, 3 dez. 2011.
- IBRAHEEM, O.; NDIMBA, B. K. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 6, p. 598–612, 2013.
- IBRAHIM, M. F. et al. Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel.

Renewable Energy, v. 77, p. 447–455, 2015.

JØRGENSEN, H. et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 862–70, 1 abr. 2007.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p. 103–110, jul. 2004.

KARIMI, K. et al. Recent trends in acetone , butanol , and ethanol (ABE) production. v. 8, p. 301–308, 2015.

KIM; KWANG-JAE; LIN, D. K. . Simultaneous Optimization of Mechanical Properties of Steel by Maximizing Exponential Desirability Functions. **Applied Statistics**, v. 49, n. 3, p. 311–325, 2000.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KOLESINSKA, B. et al. Butanol Synthesis Routes for Biofuel Production: Trends and Perspectives. **Materials**, v. 12, p. 350–372, 2019.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950–4962, 2011.

KUJAWSKA, A. et al. ABE fermentation products recovery methods—A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 48, p. 648–661, ago. 2015.

LEE, K. M. et al. In situ detoxification of lignocellulosic hydrolysate using a surfactant for butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 630–635, 2015.

LI, C. et al. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 155–164, 2004.

LI, H. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation of sugarcane bagasse by combined diluted acid with oxidate ammonolysis pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 257–263, mar. 2017.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LIU, K. et al. Butanol production from hydrothermolysis-pretreated switchgrass: Quantification of inhibitors and detoxification of hydrolyzate. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 292–301, ago. 2015.

LIU, Z. H.; CHEN, H. Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 15–26, 2016.

LÓPEZ-LINARES; et al. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, v. 122, p. 112–118, abr. 2014.

LU, J. et al. Fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bio-ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 539–547, 2013.

MACEDO, I. C. Geração de energia elétrica a partir de biomassa no Brasil : situação atual , oportunidades e desenvolvimento. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, p. 1–10, 2001.

- MADDOX, I. S. et al. The cause of “acid-crash” and “acidogenic fermentations” during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation process. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 1, p. 95–100, 2000.
- MAGALHÃES, B. L. et al. Improved n- butanol production from lignocellulosic hydrolysate by Clostridium strain screening and culture-medium optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, n. November 2017, p. 157–166, jan. 2018.
- MANZANARES, P. et al. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 881–887, jun. 2011.
- MENDES, V. T.; ROCHA, J. M. S.; GRAC, M. Valorization of Residual Streams from Pulp and Paper Mills : Pretreatment and Bioconversion of Primary Sludge to Bioethanol Ca t. 2014.
- MESA, L. et al. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, n. 1, p. 185–191, 2011.
- MESA, L. et al. Desirability function for optimization of Dilute Acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. **Applied Energy**, v. 198, p. 299–311, 2017.
- MME. RenovaBio : Biocombustíveis 2030. 2017.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, 2013.
- MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- NDABA, B.; CHIYANZU, I.; MARX, S. n -Butanol derived from biochemical and chemical routes : A review. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 1–9, 2015.
- 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.
- NIEMISTÖ, J. **Towards sustainable and efficient biofuels production : Use of pervaporation in product recovery and purification.** [s.l: s.n.].
- NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 1, p. 52–68, fev. 2011.
- NOVACANA. **Benefícios em usar etanol.**
- O’BRIEN, D. J.; ROTH, L. H.; MCALOON, A. J. Ethanol production by continuous fermentation–pervaporation: a preliminary economic analysis. **Journal of Membrane Science**, v. 166, n. 1, p. 105–111, fev. 2000.
- OFORI-BOATENG, C.; LEE, K. T. Same-vessel enzymatic saccharification and fermentation of organosolv/H₂O₂ pretreated oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) fronds for bioethanol production: Optimization of process parameters. **Energy Conversion and Management**, v. 78, p. 421–430, 2014.
- ÖHGREN, K. et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of Biotechnology**, v. 126, n. 4, p. 488–498, dez. 2006.
- ÖHGREN, K. et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and

separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 834–839, 2007.

OKAMOTO, K. et al. Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014.

OLIVEIRA, L. R. M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1–7, 2014.

OLIVEIRA RIBEIRO, W. C. DE; SILVA LIMA, A. C. DA; ARAÚJO MORANDIM-GIANNETTI, A. DE. Optimizing treatment condition of coir fiber with ionic liquid and subsequent enzymatic hydrolysis for future bioethanol production. **Cellulose**, v. 25, n. 1, p. 527–536, 2018.

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

ÖZDENKÇİ, K. et al. A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. **Energy Conversion and Management**, v. 149, p. 974–987, 2017.

PAULOVA, L. et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015.

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

PEREIRA, L. G. et al. Economic and environmental assessment of n-butanol production in an integrated first and second generation sugarcane biorefinery: Fermentative versus catalytic routes. **APPLIED ENERGY**, v. 160, n. 2015, p. 120–131, 2015a.

PEREIRA, L. G. et al. Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 557–568, jun. 2015b.

PÉREZ, J. A. et al. Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 10, p. 929–938, out. 2007.

PETITDEMANGE, E. et al. A novel one step process for cellulose fermentation using mesophilic cellulolytic and glycolytic *Clostridia*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 2, p. 119–124, 1983.

PIHLAJANIEMI, V. et al. Yield optimization and rational function modelling of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by NaOH-delignification, autohydrolysis and their combination. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1683–1691, 2015.

PINTO, V. D. P. **Otimização de reator batelada alimentada para hidrólise de palha de cana de açúcar aplicando a teoria de controle ótimo**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2016.

PITARELO, A. N. A. P. **AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO BAGAÇO E DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR À BIOCONVERSÃO VIA PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2007.

PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2015.

PRATTO, B. et al. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 7, p. 1430–1444, 2016.

QURESHI, N. et al. Process integration for simultaneous saccharification, fermentation, and recovery (SSFR): Production of butanol from corn stover using *Clostridium beijerinckii* P260. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 222–228, 2014.

QURESHI, N. et al. Cellulosic Butanol (ABE) Biofuel Production from Sweet Sorghum Bagasse (SSB):

Impact of Hot Water Pretreatment and Solid Loadings on Fermentation Employing *Clostridium beijerinckii* P260. **BioEnergy Research**, 2016.

QURESHI, N.; HODGE, D. B. .; VERTÉS, A. A. **Biorefineries: Integrated biochemical processes for liquid biofuels**. Elsevier ed. [s.l.: s.n.].

QURESHI, N.; MADDIX, I. S. Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 2, p. 185–189, jan. 1995.

QURESHI, N.; MADDIX, I. S.; FRIEDL, A. Application of Continuous Substrate Feeding to the ABE Fermentation: Relief of Product Inhibition Using Extraction, Perstraction, Stripping, and Pervaporation. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 5, p. 382–390, 1992.

RAGANATI, F. et al. Butanol production from hexoses and pentoses by fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. **Anaerobe**, v. 34, p. 146–155, 2015.

RAMIREZ, W. F. **Process control and identification**. Boston: Academic Press, 1994.

RANA; ECKARD, A. D.; AHRING, B. K. Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 516, 2014.

REDDY, L. V. Utilization of Sugarcane Field Residue (SFR) as Renewable Feedstock for Biobutanol Production. **Sugar Tech**, v. 20, n. 2, p. 168–174, 2018.

REIS, V. R. et al. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1121–1131, dez. 2013.

ROCHA, G. et al. **A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC** Fifth brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components, 1997.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274–279, 2012.

RODRIGUES, A. C. et al. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79–80, p. 70–77, nov. 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e Otimização de processos**. Third ed. ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RUIZ, H. A. et al. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. **Fuel**, v. 95, p. 528–536, maio 2012.

SAAD, M. B. W. et al. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 220–225, 2008.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. et al. A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 176–185, mar. 2017.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. et al. Assessment of different biomass feeding strategies for improving the enzymatic hydrolysis of sugarcane straw. **Industrial Crops & Products**, v. 125, n. August, p. 293–302, 2018.

SANTOS-ROCHA, M. S. R.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Evaluation of energy potential of the agroindustrial residues from different brazilian regions. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017.

SANTOS, J. R. A. et al. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238

in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 584–588, 2012.

SASAKI, C. et al. Acetone-butanol-ethanol production by separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) methods using acorns and wood chips of *Quercus acutissima* as a carbon source. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 286–292, 2014.

SHAHZADI, T. et al. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 05, n. 03, p. 246–251, 2014.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 1, p. 33–43, 18 jan. 2011.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. p. 123, 2010.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618. 2008.

SONEGO, J. L. S. et al. Extractive Batch Fermentation with CO₂ Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 12, p. 7552–7559, 2014.

SUDIYANI, Y. et al. Alkaline Pretreatment of Sweet Sorghum Bagasse for Bioethanol Production. **Int Journal of Renewable Energy Development**, v. 5, n. 2, p. 113–118, 2016.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

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.

UNICA. Brazilian sugarcane industry association. <http://www.unica.com.br/unicadata>. Accessed 02 Sep 2018. 2018.

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S.; LAOTENG, K. Systematic optimization of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high-solid loading based on enzymatic hydrolysis and dynamic metabolic modeling of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2459–2470, 2016.

VARGAS, F. et al. Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 263–270, 2015.

WEN, F.; SUN, J.; ZHAO, H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous Saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1251–1260, 2010.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18 SPEC. ISS., p. 1959–1966, 2005.

XU, B.; CHANG, S. K. . Total Phenolic , Phenolic Acid , Anthocyanin , Flavan-3-ol , and Flavonol Profiles and Antioxidant Properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as Affected by Thermal Processing. v. 57, p. 4754–4764, 2009.

XU, Z.; HUANG, F. Pretreatment methods for bioethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 43–62, 2014.

ZAKARIA, M. R. et al. Soluble inhibitors generated during hydrothermal pretreatment of oil palm mesocarp fiber suppressed the catalytic activity of Acremonium cellulase. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 541–547, 2016.

ZENG, Y. et al. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 98–45, 2014.

ZHANG, J. et al. Efficient Acetone-Butanol-Ethanol Production from Corncob with a New Pretreatment Technology-Wet Disk Milling. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 1, p. 35–43, 2013.

ZHANG, X. Z.; ZHANG, Y. H. P. One-step production of biocommodities from lignocellulosic biomass by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*: Opportunities and challenges. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 5, p. 398–406, 2010.

ZHANG, Y. et al. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 178, 26 dez. 2018.

ZHU, M. et al. A comparison of the production of ethanol between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using unpretreated cassava pulp and enzyme cocktail. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 76, n. 4, p. 671–8, 2012.

Apêndice

Tabela A 1- Massa de palha pré-tratada adicionada durante a fase de alimentação do processo de hidrólise enzimática.

| Tempo (horas) | Massa adicionada (g) | Massa acumulada (g) | Massa úmida adicionada* (g) |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 0 | 2,500 | 2,500 | 10,500 |
| 0,5 | 0,270 | 2,770 | 1,136 |
| 1 | 0,284 | 3,055 | 1,195 |
| 1,5 | 0,254 | 3,308 | 1,067 |
| 2 | 0,315 | 3,623 | 1,322 |
| 2,5 | 0,279 | 3,902 | 1,173 |
| 3 | 0,287 | 4,189 | 1,207 |
| 3,5 | 0,334 | 4,524 | 1,405 |
| 4 | 0,311 | 4,835 | 1,306 |
| 4,5 | 0,293 | 5,128 | 1,233 |
| 5 | 0,297 | 5,426 | 1,250 |
| 5,5 | 0,381 | 5,806 | 1,599 |
| 6 | 0,364 | 6,170 | 1,530 |
| 6,5 | 0,351 | 6,521 | 1,475 |
| 7 | 0,341 | 6,862 | 1,432 |
| 7,5 | 0,332 | 7,194 | 1,396 |
| 8 | 0,325 | 7,519 | 1,366 |
| 8,5 | 0,387 | 7,906 | 1,626 |
| 9 | 0,446 | 8,353 | 1,875 |
| 9,5 | 0,438 | 8,791 | 1,842 |
| 10 | 0,432 | 9,223 | 1,815 |
| 10,5 | 0,427 | 9,650 | 1,794 |
| 11 | 0,423 | 10,073 | 1,776 |
| 11,5 | 0,419 | 10,492 | 1,762 |
| 12 | 0,417 | 10,909 | 1,751 |
| 12,5 | 0,415 | 11,324 | 1,743 |
| 13 | 0,413 | 11,737 | 1,737 |
| 13,5 | 0,412 | 12,149 | 1,732 |
| 14 | 0,412 | 12,561 | 1,729 |
| 14,5 | 0,578 | 13,139 | 2,428 |
| 15 | 0,587 | 13,725 | 2,465 |
| 15,5 | 0,587 | 14,313 | 2,468 |
| 16 | 0,589 | 14,901 | 2,474 |
| 16,5 | 0,591 | 15,492 | 2,482 |
| 17 | 0,593 | 16,085 | 2,493 |
| 17,5 | 0,596 | 16,681 | 2,505 |

| | | | |
|------|-------|--------|-------|
| 18 | 0,599 | 17,281 | 2,519 |
| 18,5 | 0,603 | 17,884 | 2,534 |
| 19 | 0,607 | 18,491 | 2,551 |
| 19,5 | 0,611 | 19,103 | 2,569 |
| 20 | 0,616 | 19,718 | 2,588 |
| 20,5 | 0,621 | 20,339 | 2,608 |
| 21 | 0,626 | 20,965 | 2,630 |
| 21,5 | 0,631 | 21,596 | 2,652 |
| 22 | 0,637 | 22,233 | 2,676 |
| 22,5 | 0,643 | 22,876 | 2,700 |
| 23 | 0,649 | 23,524 | 2,725 |
| 23,5 | 0,655 | 24,179 | 2,751 |
| 24 | 0,661 | 24,840 | 2,778 |
| 24,5 | 0,668 | 25,508 | 2,805 |
| 25 | 0,674 | 26,183 | 2,834 |
| 25,5 | 0,681 | 26,864 | 2,863 |
| 26 | 0,688 | 27,552 | 2,893 |
| 26,5 | 0,949 | 28,502 | 3,989 |
| 27 | 1,015 | 29,517 | 4,264 |
| 27,5 | 1,031 | 30,547 | 4,330 |
| 28 | 1,047 | 31,594 | 4,398 |
| 28,5 | 1,063 | 32,658 | 4,468 |
| 29 | 1,081 | 33,738 | 4,540 |
| 29,5 | 1,098 | 34,836 | 4,614 |
| 30 | 1,116 | 35,953 | 4,690 |
| 30,5 | 1,135 | 37,087 | 4,768 |
| 31 | 1,154 | 38,241 | 4,847 |
| 31,5 | 1,173 | 39,414 | 4,929 |
| 32 | 1,193 | 40,607 | 5,012 |
| 32,5 | 1,213 | 41,820 | 5,098 |
| 33 | 1,234 | 43,054 | 5,185 |
| 33,5 | 1,255 | 44,310 | 5,275 |
| 34 | 1,277 | 45,587 | 5,366 |
| 34,5 | 1,299 | 46,886 | 5,459 |
| 35 | 1,322 | 48,208 | 5,555 |
| 35,5 | 1,345 | 49,553 | 5,652 |
| 36 | 1,369 | 50,922 | 5,752 |
| 36,5 | 1,393 | 52,315 | 5,853 |
| 37 | 1,418 | 53,733 | 5,957 |
| 37,5 | 1,443 | 55,176 | 6,063 |
| 38 | 1,469 | 56,645 | 6,171 |
| 38,5 | 1,495 | 58,140 | 6,281 |
| 39 | 1,522 | 59,661 | 6,393 |

| | | | |
|------|-------|--------|-------|
| 39,5 | 1,549 | 61,210 | 6,508 |
| 40 | 1,577 | 62,787 | 6,625 |
| 40,5 | 1,605 | 64,392 | 6,744 |
| 41 | 1,634 | 66,026 | 6,866 |
| 41,5 | 1,664 | 67,690 | 6,990 |
| 42 | 1,694 | 69,384 | 7,117 |
| 42,5 | 1,725 | 71,108 | 7,246 |
| 43 | 1,756 | 72,864 | 7,378 |
| 43,5 | 1,788 | 74,652 | 7,512 |
| 44 | 1,210 | 75,862 | 5,084 |

* Os valores de massa úmida de palha foram calculados com base na umidade presente na palha no momento adição no reator.