



Ricardo Filipe Godinho Rodrigues

**Contributos para a fermentação  
integrada de lamas primárias  
papeleiras**

Coimbra 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ricardo Filipe Godinho Rodrigues

# **Contributos para a fermentação integrada de lamas primárias papaleiras.**

Dissertação na área científica da Engenharia Química submetida ao Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra

## **Supervisores:**

Prof. Dr. Jorge Manuel dos Santos Rocha

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Videira Sousa Carvalho

## **Instituições:**

CIEPQPF - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta

Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra - Portugal

Coimbra

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem o contributo de várias pessoas e entidades, às quais gostaria de agradecer nesta página.

Ao professor Doutor Jorge Rocha, o orientador desta dissertação, a partilha de conhecimentos, a experiencia e disponibilidade para o auxílio ao longo deste trabalho.

À Engenheira Cátia Mendes, pelo auxílio e orientação na fase experimental.

À Engenheira Maria João Bastos o auxílio laboratorial,

Ao RAIZ pelo apoio técnico e incentivo na exploração desta via de produção de um biocombustível.

À Novozymes o fornecimento do extracto enzimático.

Ao Sr. José Santos pela disponibilidade e o apoio laboratorial.

Ao Departamento de Engenharia Química e ao Centro de Investigação e Estudos de Processos Químicos e Produtos da Floresta pelas facilidades e condições laboratoriais.



## Resumo

A oscilação do preço dos combustíveis de origem fóssil, as suas reservas finitas e o aquecimento global são as principais razões para o crescente interesse público e privado em combustíveis provenientes de fontes renováveis e biológicas. A transformação química com o melhor rendimento possível de matérias-primas naturais ou sintéticas, em produtos de valor, tem sido o primeiro objetivo da Engenharia Química. Actualmente a valorização económica de resíduos e a atenuação dos efeitos ambientais têm assumido um papel de relevo na investigação associada à indústria química. A utilização de resíduos lenhocelulósicos, ricos em hidratos de carbono (HC), em particular lamas primárias provenientes da indústria da pasta e do papel, para produzir produtos de valor acrescentado, é o desafio proposto. Os biocombustíveis enquadram-se no contexto desta mudança de paradigma na Engenharia Química diante do desenvolvimento sustentável e dos compromissos ambientais. No âmbito dos biocombustíveis e biorefinarias o presente trabalho contemplou a realização de ensaios de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), em reactores de bancada com agitação mecânica e diferentes configurações e volumes de mistura reaccional (entre 100 mL e 4 L), recorrendo ao extrato enzimático NS 22192 da Novozymes (15 FPU/g HC) e à levedura *S. cerevisiae* ATCC 26622. Recorreu-se a lamas primárias provenientes de duas empresas nacionais doravante designadas Lamas primárias 1 e Lamas primárias 2. Obteve-se 52 g/L de bioetanol (Y= 78%) com as lamas primárias 1 (15% de consistência com 132g/L de HC) e 64 g/L de bioetanol (Y = 70%) com as lamas primárias 2 (28% de consistência com 166 g/L de HC). Foram ainda testados em Erlenmeyer: i) os efeitos da substituição e respetiva adaptação da estirpe aos suplementos dos meios reacionais com compostos industriais como a ureia e sulfato de magnésio; ii) a metabolização da xilose pela *Pichia stipitis* quando adicionada em conjunto com a *Saccharomyces* iii) a redução da quantidade de extrato enzimático celulolítico, faseando a alimentação ao biorreactor. A obtenção de concentrações e rendimentos elevados de bioetanol, em escalas volumétricas crescentes, e em configurações reacionais mais próximas da grande escala, torna a integração de bioprocessos para valorização das lamas primárias muito promissora e com potencial de viabilidade económica.

Palavras-chave: lamas primárias, biocombustíveis, bioetanol, SSF



## Abstract

The fluctuations in the price of fossil fuels, its finite reserves and global warming are the main reasons for the growing public and private interest in fuels from renewable and biological sources. The chemical transformation with the best possible yield from natural or synthetic raw materials into valuable products, has been the first goal of Chemical Engineering. Currently the economic recovery of waste and mitigation of environmental effects have played a major role in research related to the chemical industry. The use of lignocellulosic waste, rich in carbohydrate (CH), in particular primary sludge from the pulp and paper industry to produce value added products, is the proposed challenge. Biofuels fall within the context of this paradigm shift in Chemical Engineering on sustainable development and environmental commitments. Within biofuels and biorefineries this work included the realization of simultaneous saccharification and fermentation tests (SSF) in lab-scale reactors with mechanical agitation and different configurations and reaction volumes (between 100 mL and 4 L), using the extract enzymatic NS 22192 Novozymes (15 FPU / g CH) and the yeast *S. cerevisiae* ATCC 26622. Two sources of primary sludges were collected in two pulp and paper mills, hereafter named Primary Sludge 1 and Primary Sludge 2. A concentration of 52 g / L of bioethanol ( $Y = 78\%$ ) was reached with primary sludge 1 (15% consistency with 132g / L CH) and 64 g / L ethanol ( $Y = 70\%$ ) with the primary sludge 2 (28% consistency with 166 g / L CH). At Erlenmeyer scale, different tests were also performed: i) the effects of substitution and respective adjustment of the strain to supplement the reaction media with industrial compounds such as urea and magnesium sulphate; ii) the metabolism of xylose by *Pichia stipitis* when taken in conjunction with *Saccharomyces cerevisiae* iii) reducing the amount of cellulolytic enzyme extract, phasing power to the bioreactor. Obtaining high ethanol concentrations and yields in increasing volumetric scales, with reaction settings closer to the large-scale, makes integration of bioprocesses for recovery of primary sludge very promising and with a potential economic viability.

Keywords: primary sludge, biofuels, bioethanol, SSF



# Índice

<b>1.Introdução.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Biocombustíveis.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Biorrefinaria.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Bioetanol.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Biomassa lenhocelulósica.....</b>	<b>11</b>
<b>2.5 Lamas primárias da indústria da pasta e do papel.....</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Hidrólise enzimática.....</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Inibidores.....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Organismos fermentativos.....</b>	<b>17</b>
<b>2.9 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).....</b>	<b>18</b>
<b>2.10 Bioprocesso Consolidado (BPC).....</b>	<b>19</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Matéria-prima: resíduos lenhocelulósicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Microrganismos utilizados na fermentação alcoólica.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Suspensão de inóculo.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Extrato Enzimático.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Procedimento SSF.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1 Efeito da consistência.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.2 Composição dos meios de cultura.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5.3 Mudança de Escala.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5.4 Efeito da <i>Pichia stipitis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5.5 Efeito do regime <i>Fed-batch</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Métodos Analíticos.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC).....</b>	<b>32</b>
<b>3.6.2 Quantificação dos açúcares redutores através do método DNS modificado.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Parâmetros de fermentação.....</b>	<b>33</b>
<b>3.7.1 Rendimento em etanol (Y).....</b>	<b>33</b>
<b>3.7.2 Razão de etanol produzido por hidratos de carbono disponíveis (R).....</b>	<b>34</b>
<b>3.7.3 Produtividade em etanol (P).....</b>	<b>34</b>
<b>3.7.4 Cálculo do teor enzimático a fornecer à mistura.....</b>	<b>34</b>
<b>4.Resultados e Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Efeito da consistência.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Efeito dos suplementos ao meio de cultura.....</b>	<b>39</b>

4.3 Aumento de escala .....	40
4.4 Efeito da <i>Pichia stipitis</i> na metabolização da Xilose .....	48
5. Conclusões e Sugestões de trabalho futuro .....	53
6. Referências .....	55
<b>Anexos</b> .....	59
Anexo I- Determinação da composição química dos materiais lenhocelulósicos .....	61
Anexo II -Actividade enzimática .....	65
Anexo III – Efeito do regime <i>Fed-batch</i> .....	67
Anexo IV Método DNS de açúcares redutores .....	69
Anexo V- Ilustração de cromatograma .....	71

# Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Processamento termoquímico e biotecnológico da biomassa lenhocelulósica em vários produtos de valor. (Fonte: Menon e Rao [9]).....	9
<b>Figura 2</b> – Exemplo da estrutura química da celulose (Fonte: adaptado de Akhtar <i>et al</i> [7]).....	12
<b>Figura 3</b> - Exemplo de estrutura química das hemiceluloses (adaptado de Akhtar <i>et al</i> [7]).....	12
<b>Figura 4</b> - Esquema de conversão dos resíduos lenhocelulósicos em etanol, a designação SSF que congrega os passos de hidrólise e fermentação pressupõe que a hidrólise é enzimática. (Fonte: Stanley e Hagerdal-Hahn [10]).....	13
<b>Figura 5</b> – Esquema da hidrólise da celulose monómeros de glucose pelas enzimas constituintes da celulase. (Fonte: adaptado de Menezes [12], Ogeda e Petri [13]).....	15
<b>Figura 6</b> - Produtos de degradação da biomassa lenhocelulósica que constituem potenciais inibidores. (Fonte: adaptado de Anuj <i>et al</i> [17]).....	16
<b>Figura 7</b> - Abordagens à conversão dos resíduos lenhocelulósicos a etanol. Legenda: SHF- Separated Hydrolysis Fermentation, SHCF-Separated Hydrolysis and co-Fermentation, SSF-Simultaneous Saccharification Fermentation, SSCF- Simultaneous Saccharification co-Fermentation, CBP - Consolidated Bioprocess. (Fonte: Adaptado de Den <i>et al</i> [22]).....	18
<b>Figura 8</b> - Aspeto das lamas primárias utilizadas i) lamas primárias 1 ii) lamas primárias 2.....	20
<b>Figura 9</b> – Representação dos agitadores utilizados nos ensaios em BSTF a) Agitador do género hélice, b) agitador do género <i>Rushton</i> com as pás a 45°.....	28
<b>Figura 10</b> – Representação dos agitadores utilizados simultaneamente nos ensaios em Biostat ® a) Agitador do género <i>Rushton</i> de pás verticais, b) agitador do género <i>Pitched blade turbine</i> .....	28
<b>Figura 11</b> - Evolução da formação de etanol e consumo dos açúcares redutores. a) Evolução do etanol 2.VI (15% consistência), 2.VII (21% consistência) 2.VII (consistência 28%). b)	

Evolução da concentração dos açúcares redutores 2.VIII (15% consistência), 2.VII (21% consistência) 2.VIII (consistência 28%).....	36
<b>Figura 12-</b> Meio Reacional em liquefação no Biostat ®.....	39
<b>Figura 13-</b> Evolução da concentração de etanol e dos açúcares ao longo do tempo para quatro volumes diferentes ensaio 1.II erlenmeyer 100 mL, ensaio 1.III BSTF 1000 mL, ensaio 1.V Biostat 2500mL; a) Evolução da formação do etanol, b) Evolução do consumo de açúcares.....	41
<b>Figura 14-</b> Evolução da concentração ao longo do tempo com agitadores diferentes referentes aos ensaios 1.III (agitador Hélice) e 1.IV (Agitador Rushton de 4pás 45°) com as lamas primárias 1.....	42
<b>Figura 15</b> – Nesta figura encontram-se representados os ensaios 2.IV (1400 mL), 2.VIII (2500 mL) e 2.IX (4000 mL) em a) evolução da concentração de etanol mediante aumento de volume consumo dos açúcares redutores ).....	44
<b>Figura 16</b> – Nesta figura encontram-se representados na figura a) a evolução da concentração de etanol nos ensaios 2.V e 2.VI (ambos 1400 mL), e na figura b) a os ensaios 2.VIII (2500 mL) e 2.)IX (4000 mL).....	45
<b>Figura 17</b> -Evolução da concentração de etanol e açúcares redutores ao longo do tempo para os ensaios SSF a) Ensaio 1.II (100 mL) b) Ensaio 1.III (100 mL).....	47
<b>Figura 18-</b> Evolução da concentração de etanol e xilitol ao longo do tempo para os ensaios SSF.a) Ensaio 1.VI, b) Ensaio 2.VI.....	49
<b>Figura 19-</b> Evolução da concentração de etanol nos dois regimes distintos estudados com concentrações de HC semelhantes a) Batch b) Fed-Batch.....	65
<b>Figura 20-</b> Recta de calibração do método dos açúcares redutores.....	67
<b>Figura 21</b> – Ilustração de um cromatograma (eixo yy- RI Signal [ $\mu$ RIU],eixo xx- tempo [min]).....	69

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Composição das lamas primárias 1 e lamas primárias 2. Legenda: ST-Sólidos totais; HC-hidratos de carbono; (*)em base seca.....	20
<b>Tabela 2-</b> Meio de referência para o inóculo.....	22
<b>Tabela 3-</b> Actividade enzimática do complexo enzimático NS 22192.....	22
<b>Tabela 4-</b> Concentração de proteína (equivalentes BSA) e de açúcares simples (equivalentes de glucose) no complexo enzimático NS 22192.....	22
<b>Tabela 5-</b> Ensaio de SSF, para o estudo da mudança de escala, substrato utilizado, designação do ensaio (o dígito árabe 1 ou 2 designa a origem das lamas; o dígito romano designa o número do ensaio efectuado com cada uma das lamas), volume útil, consistência, reator, agitação, tipo de agitador. Legenda <sup>(a)</sup> inóculo misto de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i> ; <sup>(b)</sup> meio de cultura de referência; <sup>(c)</sup> meio de cultura estudado A; <sup>(d)</sup> meio de cultura estudado B.....	23
<b>Tabela 6-</b> Estudo da consistência e respectivos volumes úteis, com as lamas primárias 2.....	24
<b>Tabela 7-</b> Meio de cultura de referência .....	25
<b>Tabela 8-</b> Meio de cultura estudado A .....	25
<b>Tabela 9</b> - Meio de cultura estudado B .....	25
<b>Tabela 10-</b> Detalhes das dimensões e configurações geométricas dos dois reatores. Legenda: VL – volume de trabalho; Dt – diâmetro interno do reator; Da – Diâmetro da turbina de agitação; Hl – altura do líquido; Hi – distância entre o agitador e o fundo do recipiente; Ha-a – distância entre as turbinas de agitação. BSTF- Batch Stirred Tank Fermentor; Biostat-fermentador comercial da Sartorius. ....	27
<b>Tabela 11-</b> Relações adimensionais entre os diferentes volumes e agitadores utilizados.....	27
<b>Tabela 12-</b> Estudo da metabolização da xilose com <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i> em conjunto. ....	29
<b>Tabela 13-</b> Ensaio SSF – batch vs fed-batch.....	30

<b>Tabela 14-</b> Parâmetros de rendimento máximo da fermentação e tempo em que foram atingidos.....	37
<b>Tabela 15-</b> Ensaio com três meios de cultura diferentes meios: 1) meio de referência;2) meio estudado A; 3) meio estudado B.....	38
<b>Tabela 16-</b> Resumo dos ensaios de mudança de escala. ....	40
<b>Tabela 17-</b> Relações adimensionais entre os diferentes volumes e agitadores utilizados nas lp1 VL – volume de trabalho; Dt – diâmetro interno do reactor; Da – Diâmetro da turbina de agitação; Hl – altura do líquido; Hi – distancia entre o agitador e o fundo do recipiente; Ha-a – distancia entre as turbinas de agitação. ....	42
<b>Tabela 18</b> – Parâmetros dos ensaios de aumento de escala para as lamas primárias 1.....	43
<b>Tabela 19</b> – Relações adimensionais entre os ensaios realizados para as lp2. Legenda: VL – volume de trabalho; Dt – diâmetro interno do reactor; Da – Diâmetro da turbina a de agitação; Hl – altura do líquido; Hi – distancia entre o agitador e o fundo do recipiente; Ha-a – distancia entre as turbinas de agitação. ....	46
<b>Tabela 20</b> – Parâmetros dos ensaios do aumento de escala para as lamas 2,entre parenteses está o tempo que foram obtidos os resultados desse ensaio.....	46
<b>Tabela 21</b> – Dados da recta de calibração da actividade enzimática.....	64

## SIMBOLOGIAS E ABREVIATURAS

BSA – proteína de soro bovino (*Bovine Serum Albumine*)

BPC - Bioprocesso consolidado

CaCO<sub>3</sub> – carbonato de cálcio

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

Da – Diâmetro da turbina de agitação

DNS - Ácido 3,5 – dinitrosalicílico

D.O.- densidade óptica

Dt – diâmetro interno do reactor

FPU- unidade de papel de filtro (*Filter paper unit*)

h - horas

Ha-a – distância entre as turbinas de agitação

HC – Hidratos de carbono

Hi – distância entre o agitador e o fundo do recipiente

Hl – altura do líquido

HPLC- Cromatografia líquida de elevada eficiência

L – Litro

lp1 – lamas primárias 1

lp2 – lamas primarias 2

mL – mililitro

nm- nanómetros

P – Produtividade de etanol [ $\text{g}/(\text{L}^{-1} \text{h}^{-1})$ ]

R – Razão de etanol produzido face aos hidratos de carbono fornecidos.

rpm – Rotação por minuto

SHF – Hidrólise e fermentação em separado

S-SSF – Sacarificação e fermentação semi-simultâneo

SSF – Sacarificação e fermentação em simultâneo

VL – volume de trabalho

Y- Rendimento teórico em etanol



## Objectivos do trabalho experimental

O foco do trabalho experimental foi estudar a reacção SSF em volumes reacionais sucessivamente maiores e a resposta do sistema reacional a diversas alterações processuais, com vista a caracterizar e otimizar o SSF para a valorização de lamas primárias. Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Alteração dos suplementos nutritivos laboratoriais convencionais para outros de aplicação industrial.
2. Aumento da consistência da matéria-prima sólida.
3. Estudar os fenómenos decorrentes do aumento de escala (produtos secundários, adaptação da enzima e da levedura, agitação).
4. Influência da proveniência das lamas primárias na produção de produtos secundários.
5. Consumo da xilose recorrendo à adição da *Pichia stipitis* ao meio reagente.

Fasear a alimentação do sistema reacional após um conhecimento da velocidade de consumo dos hidratos de carbono (HC), de modo a diminuir o teor da solução enzimática, com vista a lançar as bases de um eventual SSF em regime contínuo. Outra razão foi a de reduzir a possível inibição pelo produto intermediário de reacção (açúcar simples fermentável).



# 1.Introdução

O crescimento económico, social e industrial requerem recursos energéticos sustentáveis. Para a reorganização de uma economia sustentável, são necessárias novas abordagens e pesquisas. Os biocombustíveis da primeira geração vão-se assumindo como pouco sustentáveis do ponto de vista ecológico por causa do aumento da exploração de terrenos para o crescimento da matéria-prima, constituída essencialmente por alimentos como milho, beterraba, cana-de-açúcar, sorgo entre outros. Os biocombustíveis de segunda geração, afiguram-se mais sustentáveis, dado que provêm de materiais lenhocelulósicos (fonte infinita). De facto, as reservas finitas de combustíveis fósseis, as preocupações com as alterações climáticas e o aumento global do consumo de energia, têm impulsionado a exploração de novas fontes de energia renováveis e mais amigas do ambiente. A biomassa lenhocelulósica é a fonte de energia renovável mais abundante e pode ser usada para produzir combustíveis de segunda geração.

Para além dos resíduos lenhocelulósicos como a biomassa florestal, existem os resíduos provenientes das indústrias de pasta e papel, como as lamas primárias. Este resíduo sólido consiste em fibras perdidas ao longo da linha de produção. Portugal foi em 2015 o 13º maior produtor de pasta de papel a nível mundial e o 4º maior produtor na Europa, o que lhe confere uma posição relevante a nível internacional [1]. Produziu 7,3 % das 36,3 milhões de toneladas produzidas na Europa. Esta atividade gera cerca de 350 000 toneladas de lamas por ano.

Em vez de serem incineradas, ou descarregadas em aterros, o seu elevado teor em polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) e a quantidade muito baixa de lenhina, permite a sua conversão em bioetanol.

A produção deste biocombustível a partir das lamas primárias da indústria da pasta e do papel por sacarificação e fermentação simultânea (SSF), é considerada a forma mais adequada para processar esse resíduo, pois ao contrário da biomassa florestal, não carece de um pré-tratamento a fim de tornar acessíveis os polissacarídeos e remover inibidores dos processos subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação. Na fermentação e sacarificação simultâneas ocorre a integração de duas etapas, a sacarificação dos polissacarídeos por parte das enzimas a açúcares simples que por sua vez serão fermentados a

etanol. A eficiência deste processo integrado depende de ambas as etapas. Se a hidrólise dos polissacarídeos for ineficiente, os microrganismos não têm substrato suficiente, causando decaimento na sua população atrasando a cinética e serão obtidas baixas concentrações de etanol. Por outro lado, o consumo lento dos açúcares simples por parte dos microrganismos leva ao aumento da sua concentração no meio reaccional que por sua vez reduz fortemente a actividade da enzima, sendo inibida pelo seu próprio produto. As condições operatórias deste processo integrado devem assumir um compromisso entre as duas etapas desta transformação, pois a enzima opera em condições ideais aos 50°C, enquanto os microrganismos utilizados normalmente neste tipo de abordagem, as leveduras, vêm o seu metabolismo favorecido a 30°C; então, a melhor temperatura de operação deste processo integrado situa-se nos 38°C.

Este trabalho inseriu-se na Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, e pretendeu estudar-se a dinâmica deste processo, inserindo alterações processuais para o aumento da eficiência.





## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Biocombustíveis

Desde o início da humanidade os combustíveis tiveram um papel de relevo na sua evolução, usados para necessidades básicas como aquecimento e confeção de alimentos. A revolução industrial no séc. XVIII trouxe a necessidade de utilização de combustíveis facilmente disponíveis e maior poder energético para operar diversos tipos de indústrias desde o carvão, madeira a derivados do petróleo e gás. A evolução industrial trouxe novas tecnologias e comodidades ao Homem, no entanto, a exploração desmesurada dos recursos energéticos disponíveis trouxeram uma factura pesada. As reservas finitas de recursos como o petróleo e o carvão assim como a forte perturbação no meio ambiente que a utilização destes impõem suscitaram novos problemas à sua utilização. O recurso a novos combustíveis tem se vindo a afigurar como uma urgência, o estímulo do uso de energias e recursos por parte dos governos, tem sido promovido, segundo Lange [2], por três razões principais:

1. Acesso fiável a energia: a procura energética, que deve duplicar na primeira metade do séc. XXI, não poderá ser satisfeita pelo petróleo, carvão e energia nuclear combinados; como é restrito o número de países exportadores destes recursos, as fontes de energias renováveis são cada vez mais exploradas.
2. Alterações Climáticas: leva à necessidade de reduzir as emissões e ao mesmo tempo captar o excesso de CO<sub>2</sub>.
3. Desenvolvimento da agricultura: as economias dependentes da agricultura podem ser sustentadas promovendo a exploração de biorrecursos para alimentação e energia.

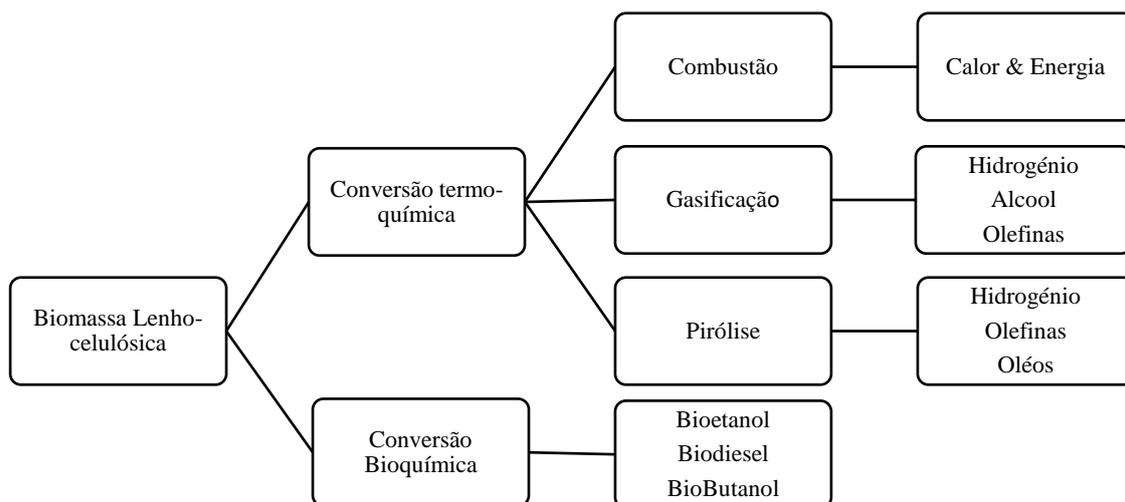
A primeira geração de biocombustíveis foi e é produzida a partir de açúcares, amidos, e óleos vegetais . No entanto, esta utilização não constitui uma solução viável a longo prazo. A competição com a indústria alimentar pelos solos aráveis, conseqüente aumento do preço de certos alimentos, as emissões de CO<sub>2</sub> para cultivar, colher os alimentos e produzir o bioetanol limitavam muito a viabilidade desta abordagem.

Uma alternativa para ultrapassar essas limitações é o uso de resíduos lenhocelulósicos, como resíduos agrícolas, florestais e industriais. Os resíduos agrícolas provêm da mesma ocupação de terreno que os produtos alimentares, sem que estes sejam integrados na produção de biocombustíveis, ou de terrenos que não sejam de exploração agrícola (resíduos das floresta ou industriais). A produção mundial de 3-5 Gt/ano de materiais lenhocelulósicos (ou biomassa lenhocelulósica) poderia providenciar 50/85 EJ/ano de energia [2], representando 10-20 % da necessidade energética mundial. A conversão da matéria lenhocelulósica a etanol é, no entanto, mais difícil nesta segunda geração de biocombustíveis.

Os biocombustíveis utilizados actualmente provêm de várias abordagens como a transformação bioquímica de biomassa (bioetanol por exemplo), passando pela reutilização de óleos vegetais transformando-os em biodiesel até à pirólise de biomassa.

## **2.2 Biorrefinaria**

O conceito de biorrefinaria é análogo ao das refinarias de petróleo. Assim como uma refinaria produz uma miríade de combustíveis e matérias-primas para inúmeras indústrias a partir do petróleo, uma biorrefinaria também pode produzir combustível e produtos a partir de um resíduo renovável nomeadamente a biomassa. A conversão de biomassa em produtos de valor acrescentado pode ser obtida a partir de duas abordagens diferentes (esquematizadas na figura 1) [9]. Uma é caracterizada por transformações bioquímicas e a outra por reações termoquímicas.



**Figura 1** - Processamento termoquímico e biotecnológico da biomassa lenhocelulósica em vários produtos de valor (Fonte: Menon e Rao [9])

A conversão bioquímica é a mais intrincada, pois requer que biomassa seja fraturada nos seus principais componentes (celulose, hemiceluloses e lenhina) para posterior hidrólise dos polissacarídeos e fermentação dos açúcares simples, produzindo etanol [3]. Esta abordagem emprega processos biológicos na conversão dos polissacarídeos constituintes da biomassa vegetal por processos de hidrólise enzimática, daí o seu cariz bioquímico. Os monómeros obtidos por hidrólise da celulose e hemiceluloses, podem ser utilizados pela maioria dos microrganismos (leveduras e bactérias) nestas transformações bioquímicas pois estes têm vias metabólicas transversais entre eles, convertendo-os em bioetanol, ácidos orgânicos, glicerol, sorbitol, manitol, xilitol, etc... A utilização de biomassa lenhocelulósica na conversão bioquímica pode ser baseada em quatro fases [3]:

1. Armazenamento da matéria-prima (resíduos lenhocelulósicos)
2. Tecnologia de conversão (Pré-tratamento, hidrólise enzimática)
3. Co-fermentação de pentoses e hexoses.
4. Purificação do produto (destilação convencional do etanol).

A conversão termoquímica de biomassa não é tão sensível e intrincada como a outra via, porém requer a utilização de processos a temperaturas e pressões geralmente mais elevadas do que as encontradas em sistemas de conversão bioquímica. As principais

vantagens relativamente à abordagem bioquímica são: i) a utilização indiferenciada de matérias-primas (o que confere maior flexibilidade de produção) e ii) a diversidade de produtos combustíveis que podem ser produzidos [4]. O processo termoquímico começa com gaseificação ou pirólise. O bioetanol é o produto pretendido, mas ainda se produz eletricidade e vapor como fontes de energia, éter dimetílico e vários álcoois [4].

Actualmente, as biorrefinarias na produção de bioetanol existem maioritariamente nos EUA. Na Europa, existem biorrefinarias em Espanha e na Áustria mas com cariz de demonstração e na Noruega uma de cariz comercial [5].

## 2.3 Bioetanol

O bioetanol (álcool etílico) é um líquido volátil, incolor, inflamável, tem inúmeras aplicações como antisséptico, solvente, combustível ou aditivo. A molécula de etanol tem a fórmula estrutural  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , normalmente abreviada para  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  ou  $\text{EtOH}$ .

O etanol sendo facilmente inflamável, produzindo água e  $\text{CO}_2$  como produtos de combustão assume-se como um combustível bastante atractivo daí o primeiro automóvel produzido em série, o modelo T da Ford, o tenha contemplado como um dos combustíveis. O surgimento da Segunda Guerra Mundial e o conseqüente aumento da procura de combustíveis disponíveis mais facilmente como o petróleo e gás goraram as expectativas de tornar o etanol num combustível de uso generalizado.

Seriam necessários trinta anos após o fim da Segunda Guerra Mundial para que em 1973 com a crise do preço do petróleo, várias companhias petrolíferas fossem ‘forçadas’ a vender gasolina com 10 % de etanol. O etanol, metanol e derivados (MTBE e ETBE), são aditivos das gasolinas que melhorando a combustão diminuem em geral as emissões poluentes ( $\text{CO}$ ,  $\text{NO}_x$ ...). No entanto, o MTBE viria a ser banido devido ao seu cariz altamente poluente. O bioetanol pode ser utilizado como combustível alternativo em diversas formas desde combustível principal (anidro com 100% de etanol ou hidratado com 4% de água e 96 % de etanol) a aditivo como o ETBE (éter etil-terc-butílico).

A adição do etanol à gasolina não pode ser na forma destilada mais corrente de 96% etanol e 4% água, tem que ser na forma anidra, sob pena de afectar o funcionamento

do motor. As concentrações do bioetanol nos combustíveis variam entre 5 % (E5) e 100 % (E100). O Brasil, um dos maiores impulsionadores do bioetanol, utiliza concentrações de 24 % de etanol e 76 % de gasolina em motores a gasolina devidamente adaptados.

No ano de 2015 foram produzidos, a nível global, 74 847 000 toneladas equivalentes de petróleo, tendo os EUA contribuído com 41,4% e o Brasil 23,6%. Em 2015, produziram-se em Portugal 315 000 toneladas equivalentes de petróleo, subindo 4,6 % em relação ao ano de 2014, o que representou 0,4% da produção global de equivalentes de petróleo, contrariando a tendência dos anos anteriores [6].

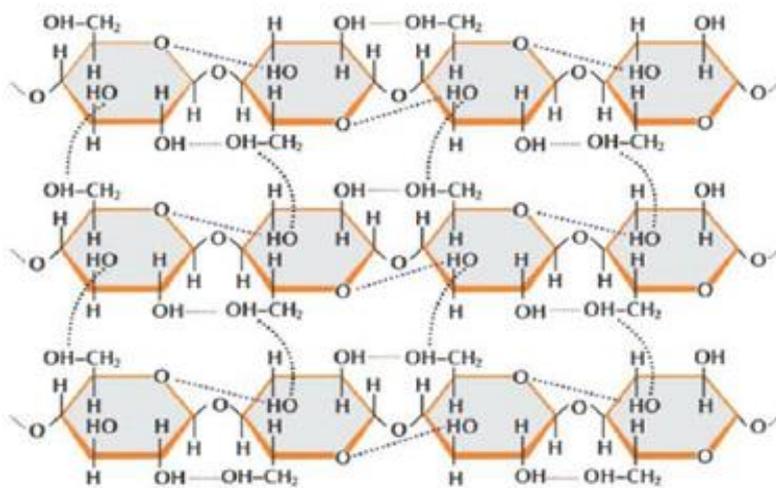
## **2.4 Biomassa lenhocelulósica**

O bioetanol proveniente de biomassa tem uma grande variedade de opções de matéria-prima disponíveis desde produtos/resíduos agrícolas como cereais até aos resíduos da floresta, resíduos da indústria papelreira etc... obviamente os métodos de produção variam conforme a estrutura química da biomassa, que por sua vez varia conforme a sua proveniência. A biomassa lenhocelulósica é de longe um substrato mais complexo que os materiais à base de amido ou sacarose usados em biocombustíveis de primeira geração, pois é constituída por uma mistura de polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) e lenhina. Estes três polímeros representam aproximadamente 90% da matéria seca da biomassa lenhocelulósica, sendo o resto constituído por compostos inorgânicos.

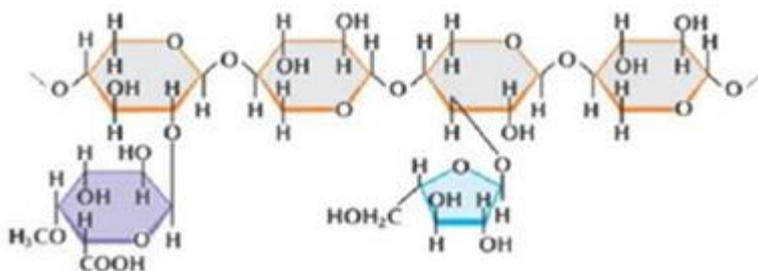
A composição dos resíduos lenhocelulósicos é, em média, 10-25% lenhina, 20-30% hemiceluloses e 40-50% celulose. A celulose é um polímero linear que contém milhares unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. A celulose tem ligações de hidrogénio inter- e intramoleculares, formando fibras de celulose onde predominam as regiões cristalinas (Figura 2). Esta estrutura complexa é a principal responsável pela sua rigidez, dificultando o acesso à celulose e hemiceluloses.

As hemiceluloses são compostas por cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose, e aldohexoses, como glucose [7]. Estas macromoléculas contêm ainda ácidos hexurónicos, como os ácidos  $\beta$ -D-glucurónico (Figura 3). A variedade de ligações entre os polímeros e as ramificações,

assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribuem para a complexidade destes polissacarídeos e suas diferentes conformações. Apesar de serem polímeros mais complexos as hemiceluloses apresentam baixa massa molecular e não formam regiões cristalinas, sendo, portanto, mais susceptíveis à hidrólise. As xilanas, abundantes na madeira ou nos resíduos florestais de folhosas, são a segunda fração de hidratos de carbono mais abundante na natureza. A hidrólise ácida ou enzimática liberta monómeros de xilose (pentose) cuja a fermentação não é, para já tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glucose (hexoses) [7].



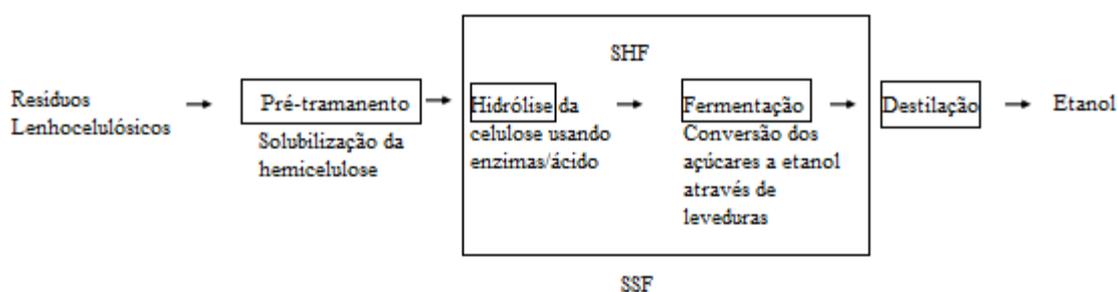
**Figura 2** – Exemplo da estrutura química da celulose (Fonte: adaptado de Akhtar *et al* [7])



**Figura 3** - Exemplo de estrutura química de uma hemicelulose - xilana (adaptado de Akhtar *et al* [7]).

A lenhina é um polímero heterogéneo que serve como agente agregante, envolvendo a celulose e as hemiceluloses e preenchendo os interstícios entre esses dois polímeros, é composta por polímeros de cadeia longa de fenil-propano, grupos metoxilo e substâncias polifenólicas, não tendo utilidade por isso, para a produção de bioetanol. Essa fração, no entanto, condiciona o sucesso da tecnologia de hidrólise não tendo qualquer tipo de utilidade nos processos de fermentação, uma vez que dificulta o acesso à celulose, devido ao seu cariz agregante.

A transformação dos resíduos lenhocelulósicos em formas aceitáveis aos microrganismo, ou seja, a açúcares fermentáveis e posteriormente a etanol envolve uma sequência de passos operacionais esquematizados na figura 4. A matéria-prima tem que ser pré-tratada a elevadas temperaturas na presença de líquidos ácidos, alcalinos e solventes orgânicos, de forma a tornar acessíveis os hidratos de carbono à próxima fase: hidrólise química ou enzimática. Durante o pré-tratamento e hidrólise ácida, ocorrem reacções que formam compostos como ácido acético, furanos e compostos fenólicos. Os microrganismos fermentativos dada a sua sensibilidade requerem que após estes passos operacionais e a libertação destes componentes tóxicos o hidrolisado seja separado destes antes da fermentação.



**Figura 4-** Esquema de conversão dos resíduos lenhocelulósicos em etanol, a designação SSF que congrega os passos de hidrólise e fermentação pressupõe que a hidrólise é enzimática. (Fonte: Stanley e Hagerdal-Hahn [10])

## 2.5 Lamas primárias da indústria da pasta e do papel.

As lamas primárias provenientes da produção de pasta e papel são o maior fluxo de resíduos sólidos produzidos por esta indústria, sendo também uma potencial matéria-prima para tecnologias com base na transformação de biomassa celulósica por hidrólise enzimática. Numa das etapas de separação no processo de fabrico de pasta e papel são

obtidos num clarificador primário da fábrica, sólidos designados por “lamas primárias”, com elevado teor de polissacarídeos que lhe confere o potencial de matéria-prima para fermentação e um baixo teor de lenhina comparativamente aos substratos lenhocelulósicos naturais, o que lhe confere uma grande vantagem, pois é da lenhina que viram inúmeros inibidores e compostos tóxicos aos microrganismos. Estas lamas têm valores muito variados de humidade e têm na sua composição, em base seca, cerca de 45-60% (m/m) de hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses), 2-5% (m/m) de lenhina e 35-50% (m/m) de matéria inorgânica (cinzas, principalmente  $\text{CaCO}_3$ ).

A quantidade considerável de hidratos de carbono presentes nesta biomassa lenhocelulósica que, uma vez hidrolisados, faz deste resíduo uma matéria-prima capaz de ser convertida a etanol por microrganismos como as leveduras *S. cerevisiae*, *P. stipitis* ou a *K. marxianus* ou bactérias como *Zymomonas mobilis*.

Uma outra virtude desta matéria-prima é o facto de ser um resíduo, como tal, a sua eliminação representa um custo, desta forma não só se poupa um encargo como ainda se gera capital. A possibilidade da sua utilização sem pré-tratamento, ao contrário de outros resíduos lenhocelulósicos, reduz substancialmente o custo de capital e risco técnico. Por estas razões, este resíduo tem elevado potencial de que a sua conversão em etanol possa ser realizada com um menor número de operações unitárias do que outros materiais lenhocelulósicos.

## 2.6 Hidrólise enzimática

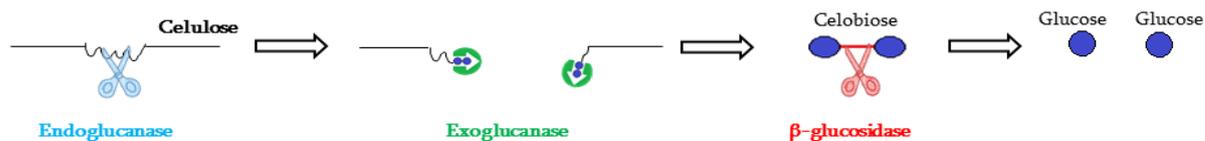
A hidrólise enzimática da celulose é levada a cabo por uma classe de enzimas celulolíticas altamente específicas [11], genericamente designadas por celulasas. A sua eficiência máxima é atingida quando a glucose é o único produto final. O custo-utilidade da hidrólise enzimática é baixo quando comparado com a hidrólise ácida, porque a hidrólise enzimática é geralmente conduzida em condições moderadas (pH 4,8 e temperatura de 45-50 C), sem problemas de corrosão e formação de compostos inibidores da fermentação.

A fonte destas enzimas não é exclusiva de um microrganismo existindo um elevado número que é capaz de produzir tais enzimas desde bactérias pertencentes aos

gêneros *Acetovibrio*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium* *Microbispora*, e *Streptomyces* e fungos como *Sclerotium rolfsii* e *Trichoderma* [11].

As celulases são normalmente uma mistura de várias enzimas um consórcio que opera em sinergia. Pelo menos três grupos principais de celulases estão envolvidos no processo de hidrólise (Figura 5):

- (1) **Endoglucanase** (EG, endo1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4) cria extremidades livres na cadeia polimérica da celulose;
- (2) **Exoglucanase celobiohidrolase** ou, celobiohidrolase 1,4- $\beta$ -D-glucano, ou EC 3.2.1.91) remove unidades de celobiose da cadeia;
- (3)  **$\beta$ -glucosidase** (EC 3.2.1.21), hidrolisa a celobiose libertando a glucose.



**Figura 5** – Esquema da hidrólise da celulose monómeros de glicose pelas enzimas constituintes da celulase. (Fonte: adaptado de Menezes [12], Ogeda e Petri [13])

Um aumento da concentração do substrato em teoria resulta num aumento do rendimento e na velocidade da hidrólise [15] mas, uma concentração elevada de substrato pode causar inibição pelo substrato, que reduz a velocidade da hidrólise [11]. A afinidade das enzimas celulolíticas com a celulose depende das características estruturais deste polissacarídeo, sobretudo da facilidade de acesso que é influenciada pelo teor de lenhina e grau de polimerização [15]. A lenhina interfere com a hidrólise, devido ao seu cariz agregante dificulta o acesso das enzimas à celulose, pelo que a remoção desta facilita e acelera o processo de hidrólise [15].

O aumento da concentração de celulases no meio reacional pode melhorar o rendimento e velocidade da hidrólise, incrementando porém o custo do processo então a dosagem de celulase costuma rondar os 10-15 FPU / g de celulose, o suficiente para fornecer uma boa razão entre hidrólise e custos operacionais [11].

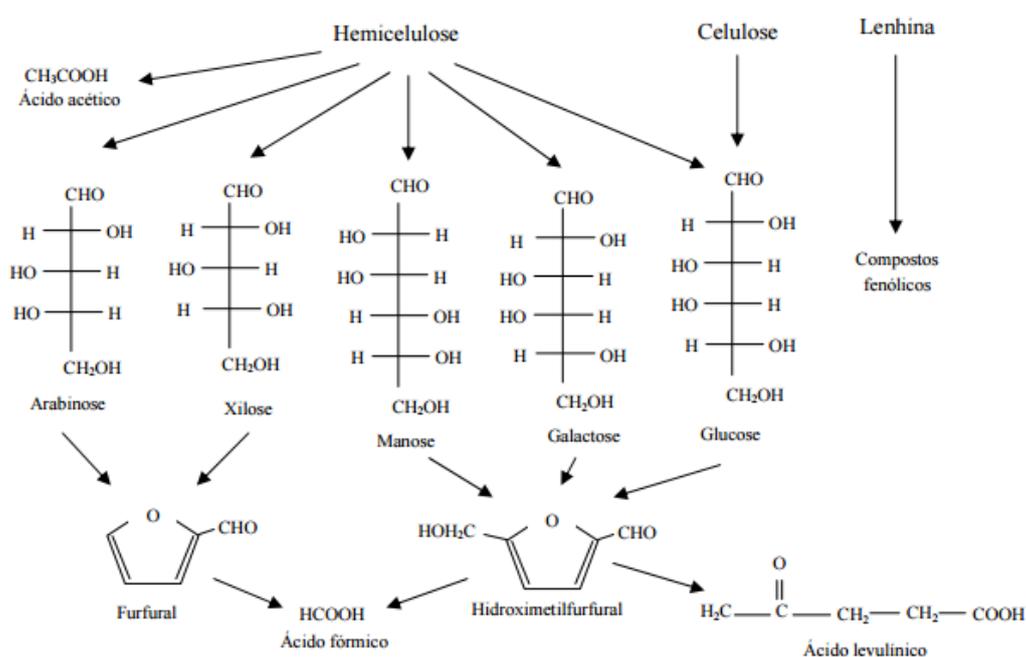
A hidrólise enzimática de celulose é composta por três passos, transversais a todos os fenómenos de catálise, são : adsorção das enzimas sobre a superfície da celulose

(enzima-substrato), a ‘quebra’ das ligações da celulose em açúcares fermentáveis, e a separação da enzima do açúcar simples formado. [11].

## 2.7 Inibidores

A estrutura da biomassa lenhocelulósica como foi dito anteriormente carece de uma desagregação a fim de tornar possível a sua transformação em etanol por parte dos microrganismos. A hidrólise apesar de imprescindível, não traz apenas os açúcares simples para a fermentação, mas também compostos que influenciam o metabolismo dos microrganismos levando a desvios e até inibições na conversão dos açúcares a etanol. Ao longo da fermentação até os próprios produtos do metabolismo que em determinadas concentrações podem causar inibição como o etanol, ácido láctico, ácido fórmico e o acetaldeído. Um dos desafios na investigação de biocombustíveis a partir de biomassa lenhocelulósica é mitigar o impacto dos compostos inibidores presentes nesta matéria-prima.

Como pode ser observado na figura 6 os açúcares podem dar origem a compostos tóxicos aos microrganismos cujos efeitos afetam o seu metabolismo que por sua vez afetam a fermentação como o caso dos compostos fenólicos, ácidos como o levulínico e o fórmico assim como o furfural e hidroximetilfurfural [17].



**Figura 6-** Produtos de degradação da biomassa lenhocelulósica que constituem potenciais inibidores. (Fonte: adaptado de Anuj *et al* [17])

## 2.8 Organismos fermentativos

Os microrganismos mais utilizados para produção de bioetanol a partir de resíduos lenhocelulósicos devem ser robustos, operar em condições dinâmicas e ter cinéticas razoáveis de conversão de açúcares a etanol, nesse perfil podem se contemplar: a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Kluyveromyces marxianus* e a *Pichia stipitis*.

- *Saccharomyces cerevisiae*

Este é um dos microrganismos mais utilizados pelo Homem tanto na alimentação como na fermentação alcoólica desde há milhares de anos. É um microfungo unicelular que desempenha um papel importante na indústria, meio ambiente e na ciência médica. É a opção mais utilizada para a produção de bioetanol pela sua robustez ao longo de vários ensaios e resistência ao etanol (120 g/L). Como limitações, refira-se que esta estirpe é incapaz de metabolizar pentoses (xilose, arabinose) e a temperaturas elevadas (> 50°C) não sobrevive. Estas limitações tendem a dificultar o processo de produção de etanol, limitando as condições operacionais.

- *Kluyveromyces marxianus*

As leveduras têm uma longa tradição de aplicação em biotecnologia industrial e sem dúvida, a *Saccharomyces cerevisiae*, tem sido o representante dominante em todos estes aspetos. Porém, a levedura *Kluyveromyces marxianus* é de particular interesse a este respeito porque tem características que a tornam especialmente adequada para aplicação industrial. Uma taxa de crescimento que rápida, a termotolerância, a capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares faz desta levedura uma ótima candidata ao SSF [16]. A tolerância a temperaturas elevadas, é a característica mais interessante desta levedura. [16]

- *Pichia stipitis*

A *P. stipitis* tem a capacidade natural, melhor do que qualquer outra levedura, de fermentar a xilose diretamente, convertendo-a em etanol, uma característica potencialmente valiosa. Porém, tem uma cinética de conversão em etanol lenta. Tendo em conta a abundância de monómeros de xilose e o seu contributo para a bioconversão de materiais lenhocelulósicos para combustíveis renováveis esta levedura tem sido extensivamente estudada. [18]

## 2.9 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

A sacarificação e fermentação simultânea trata-se de um processo integrado onde a hidrólise dos polissacarídeos e a fermentação dos açúcares simples são operados em conjunto no mesmo reactor. O conceito de hidrolisar enzimaticamente e fermentar simultaneamente (SSF) surgiu na década de 1970 [19]. A hidrólise e fermentação no mesmo reactor atingem maiores concentrações de etanol, pois os açúcares vão sendo consumidos, que dessa forma elimina a inibição da enzima por parte dos próprios produtos da reacção enzimática [19].

A inibição do produto final é a razão mais importante para a utilização de SSF, uma vez que este processo evita-a, mas há mais [19]. A hidrólise e fermentação num único reactor diminuem os custos de investimento e de contaminação. O SSF apresenta também algumas limitações face a outros métodos em comparação com a hidrólise e fermentação em separado (SHF). Num processo SHF, a temperatura para a hidrólise enzimática pode ser a recomendada de 50°, tirando proveito uma vez que ambas as operações são realizadas em separado [20].

A celulose pode ser hidrolisada e fermentada separadamente (*Separated Hydrolysis Fermentation, SHF*) [20]. Este processo consiste em duas etapas: o primeiro passo envolve a hidrólise enzimática dos polissacarídeos (da celulose a glucose, e das hemiceluloses a pentoses e hexoses) e o segundo passo tem por objetivo a reacção dos monossacarídeos resultantes em etanol.

A desvantagem do SHF é que os açúcares produzidos ao longo do tempo contribuem para inibir a actividade enzimática, num fenómeno designado de inibição por substrato [20]. Outro problema da SHF é a possibilidade de contaminação. A hidrólise é um

processo demorado, e uma solução diluída de açúcar é bastante propícia a contaminação, mesmo a temperaturas mais elevadas do que as da fermentação.

As vantagens do SSF face ao SHF incluem a exigência de apenas um reactor (conduzindo assim a poupança de custos de capital), menor probabilidade de contaminação durante a hidrólise enzimática (pois a presença de etanol reduz o risco de contaminação), um maior rendimento de etanol, melhor produtividade e a exigência de menor concentração de enzima [20].

No entanto, o SSF vê-se obrigado a adoptar condições de temperatura e de pH que representem um compromisso entre o óptimo de ambos os processos tanto para a actividade enzimática como para a fermentação. As celulasas, têm actividades máximas entre 45°C e 50°C, enquanto a temperatura para o crescimento ideal para a maioria das estirpes de *Saccharomyces* é aproximadamente 30° [20]. A temperatura para o SSF é normalmente mantida em cerca de 38 ° C, um compromisso entre o óptimo para a hidrólise e para fermentação. A hidrólise é geralmente o passo limitante da velocidade na SSF. Existem leveduras termotolerantes como a *K. marxianus*, ou bactérias como a *Z. mobilis* que têm sido usadas em SSF para elevar a temperatura de operação para próximo da temperatura ótima da hidrólise tendendo dessa forma acelerar o processo de fermentação. Um dos problemas do SSF resulta do facto de a maioria dos microrganismos utilizados para a conversão de biomassa celulósica (por exemplo, *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*) usarem preferencialmente a glucose e não terem a capacidade de utilizar xilose e arabinose, ficando assim vários açúcares por metabolizar. O valor combinado destas pentoses pode representar até um quarto do teor de açúcar presente em hidrolisados de resíduos lenhocelulósicos típicos.

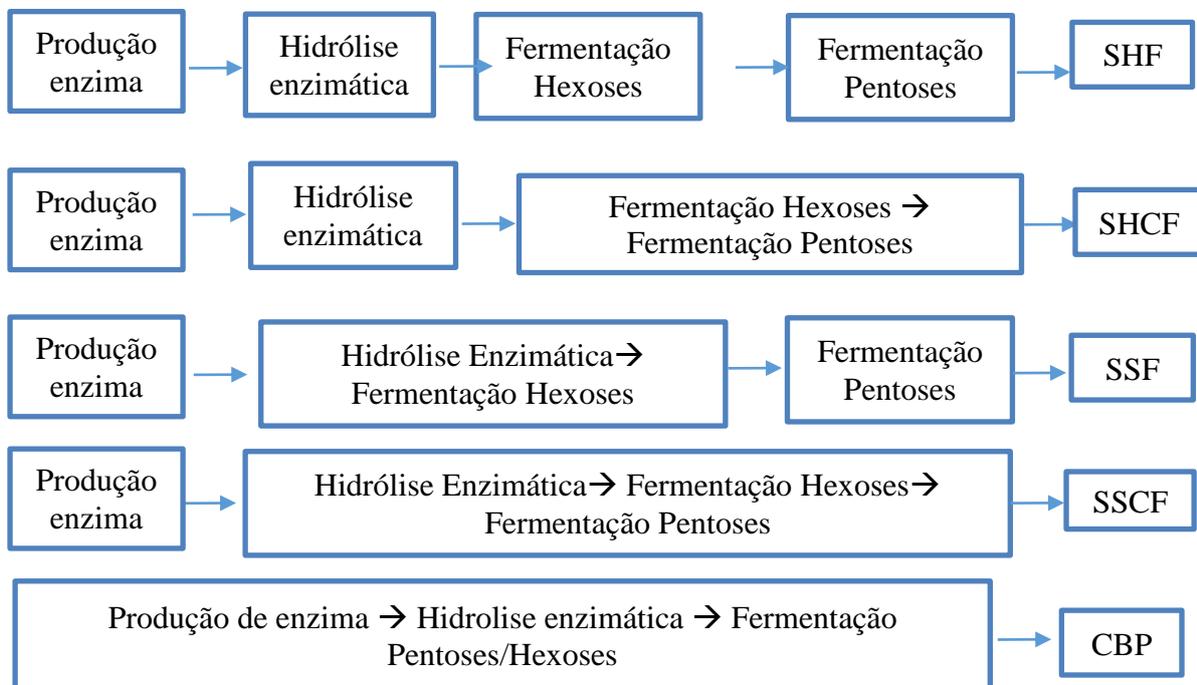
## **2.10 Bioprocesso Consolidado (BPC)**

A implementação de uma biorrefinaria é um processo bem mais ambicioso e desafiante do ponto de vista tecnológico do que uma refinaria convencional. Numa biorrefinaria o processo de separação (destilação) depende da fermentação que por sua vez depende da hidrólise. O derradeiro desafio é conseguir fazer uso da versatilidade dos sistemas biológicos. Pretende-se que tanto a produção de enzimas quanto a de etanol produzido a partir dos açúcares das hemiceluloses e da celulose, sejam conduzidas num único reator e pelo mesmo microrganismo.

O processamento de biomassa lenhocelulósica a bioetanol envolvendo a hidrólise enzimática é composto globalmente por quatro fases: a produção de enzimas que irão hidrolisar os polissacarídeos (celulases e hemicelulases); a hidrólise destes a açúcares fermentáveis pelos microrganismos; a fermentação de hexoses (glucose, manose e galactose); e a fermentação de pentoses (xilose e arabinose)[21]. O Bioprocesso consolidado (BPC) tem por objectivo a ocorrência destes quatro passos no mesmo reactor [21] que difere de outros processos integrados como o SSF onde não há produção de enzimas hidrolíticas.

Esse objetivo pode ser atingido a partir de uma estratégia com duas abordagens, ambas envolvendo engenharia genética. Uma abordagem envolve a modificação de microrganismos naturalmente produtores de etanol, a fim de torná-los produtores eficientes de celulases; a outra consiste em transformar microrganismos bons produtores de celulases em eficientes produtores de etanol.

Na figura 7 encontram-se ilustradas várias abordagens à conversão de resíduos lenhocelulósicos em etanol. O CBP tem como objectivo ser o integrador de todos os processos necessários, desde a produção das enzimas hidrolíticas até à fermentação de pentoses.



**Figura 7-** Abordagens à conversão dos resíduos lenhocelulósicos a etanol. Legenda: SHF-Separated Hydrolysis Fermentation, SHCF-Separated Hydrolysis and co-

Fermentation, SSF-Simultaneous Saccharification Fermentation, SSCF- Simultaneous Saccharification co-Fermentation, CBP- Consolidated Bioprocess. (Fonte: Adaptado de Den *et al.* [22])

### 3. Materiais e Métodos

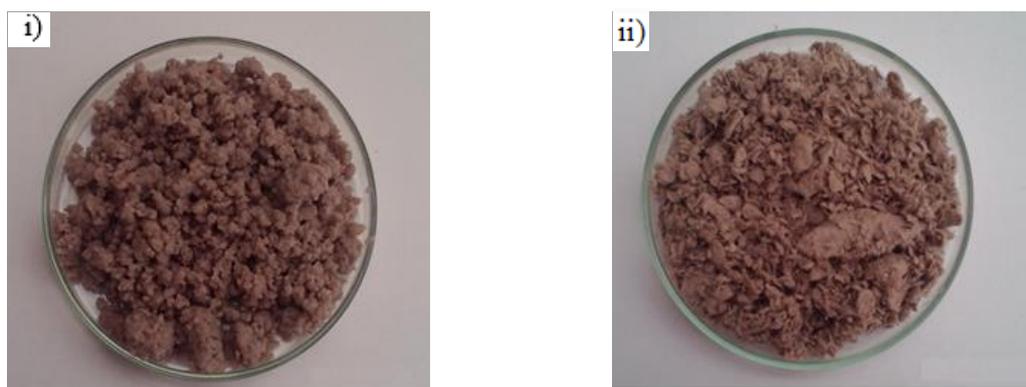
#### 3.1 Matéria-prima: resíduos lenhocelulósicos

Como matéria-prima do processo fermentativo integrado apresentado neste trabalho foram utilizadas as lamas-primárias, provenientes do clarificador primário do processo Kraft, fornecidas por duas fábricas distintas de pasta e papel e aqui designadas por lamas primárias 1 e lamas primárias 2. As lamas-primárias são essencialmente compostas por celulose, hemicelulose (hidratos de carbono), cinzas (inorgânicos) e lenhina residual. As lamas foram armazenadas em frigorífico entre 6°C e 8°C. Procedeu-se à caracterização da matéria-prima, de modo a avaliar o teor de sólidos, de hidratos de carbono, de lenhina (solúvel e insolúvel), e de inorgânicos. As características acima mencionadas foram calculados tendo em conta os seguintes protocolos: LAP-001: “*Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass*”; LAP-003: “*Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass*”; LAP-004: “*Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass*”, e LAP-005: “*Standard Method for Ash in Biomass*”, elaborados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory – NREL) (NREL-LAP 001, 1994; NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996; NREL-LAP 005, 1994). (Anexo I). O teor (em percentagem) de Hidratos de Carbono (HC) foi obtido por diferença para 100.

Na tabela 1 são apresentados os resultados das análises de caracterização das lamas primárias 1 e das lamas primárias 2. As lamas primárias 1 tinham menos teor de sólidos do que as lamas primárias 2. Esta diferença de humidade entre as duas lamas primárias não era detectável à vista desarmada. O teor de lenhina das duas era semelhante. Por outro lado, o seu teor em cinzas era mais baixo e conseqüentemente o teor de HC era bastante superior.

**Tabela 1-** Composição das lamas primárias 1 e lamas primárias 2. Legenda: ST-Sólidos totais; HC-hidratos de carbono; (\*)base seca.

<b>Componentes (%)</b>	<b>Lamas primárias 1</b>	<b>Lamas primárias 2</b>
ST	21	48
HC *	79	60
Lenhina Total*	4,5 ± 0,50	5,0 ± 1,3
Cinzas*	16,7 ± 0,75	29,7 ± 1,2



**Figura 8-** Aspeto das lamas primárias utilizadas i) lamas primárias 1 ii) lamas primárias 2

### 3.2 Microrganismos utilizados na fermentação alcoólica

A fermentação dos açúcares simples em produtos de interesse, nomeadamente o etanol, é realizada através da utilização de microrganismos com capacidade etanólica, sendo a levedura *Sacharomyces cerevisiae* capaz de fermentar hexoses, e tolerar concentrações elevadas de etanol a estirpe mais frequentemente usada, apesar de não ser capaz de metabolizar a xilose. Esta estirpe não cresce a temperaturas elevadas, limitando dessa forma a ação da enzima celulolítica (no processo conjunto) que tem uma temperatura óptima entre os 45-50 °C.

A levedura *Pichia stipitis* apresenta face à *Saccharomyces cerevisiae*, a capacidade de metabolizar a xilose (pentose presente no hidrolisado da hemicelulose), um dos açúcares presentes em maior concentração nas lamas primárias a seguir à glucose, devido ao facto das lamas primárias serem provenientes de um processo Kraft com madeira de eucalipto.

Na escolha do microrganismo fermentativo, deve considerar-se a capacidade de fermentar os diversos açúcares disponíveis, assim como a tolerância ao etanol e a temperaturas elevadas (hidrólise e fermentação simultâneas), e ainda a rapidez de crescimento da cultura e a capacidade de operar num intervalo de pH tão largo quanto possível. Existem outras leveduras utilizadas em processos fermentativos como a *Kluyveromyces marxianus*, capaz de operar a temperaturas mais elevadas e produzir etanol em concentrações elevadas de glucose. Esta levedura já usada em trabalhos anteriores, não se revelou declaradamente favorável em relação *Saccharomyces cerevisiae* para esta SSF em particular [12].

Este processo só se torna economicamente viável, quando a concentração de etanol formado for superior a 4-5% (v/v) (32-39,5 g/L), tendo em conta a posterior separação por destilação [23].

### 3.3 Suspensão de inóculo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 foi o microrganismo utilizado ao longo do trabalho, apesar de se terem realizado também ensaios com a levedura *Pichia stipitis*. O inóculo de cada ensaio SSF foi preparado em meio líquido, incubado a 38° C a 150 rpm durante cerca de 12 horas. As composições dos meios utilizados encontram-se na tabela 2.

**Tabela 2-** Meio de referência para o inóculo

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Glucose	10
Extrato de Levedura	3
Extrato de Malte	3
Peptona	5
Agar	15
Água destilada	Conforme volume de inóculo pretendido

### 3.4 Extrato Enzimático

A hidrólise dos hidratos de carbono a açúcares metabolizáveis é feita com recurso a um extrato enzimático comercial em solução aquosa proveniente da Novozymes e

designado por NS 22192. O extrato é um consórcio enzimático composto por celulases, hemicelulase,  $\beta$ -glucosidases, que operam em condições óptimas entre 45° e 50 °C e pH entre 5 e 5,5.

De modo a aferir a actividade enzimática realizaram-se dois estudos, seguindo o protocolo LAP- 006 “Measurement of Cellulase Activities”, efetuado pelo NREL (NREL – LAP 006, 1996) (Anexo II). Um dos estudos pretendia calcular a actividade enzimática a 50 ° C e o outro a 38° C, que foi a temperatura de operação. A unidade de actividade enzimática é expressa em FPU (Filter Paper Unit) correspondente à velocidade de produção de 2 miligramas de glucose a partir da hidrólise de 50 mg de papel de filtro durante 1 h de reação.

Na tabela 3 encontram-se as actividades enzimáticas do complexo enzimático à temperatura óptima e à temperatura de operação dos ensaios SSF, 50 e 38°C, respetivamente.

**Tabela 3-**Actividade enzimática do complexo enzimático NS 22192

<b>Temperatura /°C</b>	38	50
<b>FPU /mL solução de enzima</b>	78,7	160,9

**Tabela 4-** Concentração de proteína (equivalentes BSA) e de açúcares simples (equivalentes de glucose) no complexo enzimático NS 22192

<b>Enzima</b>	<b>[Eq. BSA] (g/L)</b>	<b>[Eq. Glucose] (g/L)</b>
NS 22192	73	80

### 3.5 Procedimento SSF

As experiências foram efetuadas em regime descontínuo, durante aproximadamente 72 horas, com acesso limitado ao oxigénio, e em agitação orbital ou mecânica.

O meio reacional era composto por:

- Lamas primárias (substrato),
- Tampão citrato (0,05 M), pH = 5,5
- Inóculo da levedura,
- Extrato enzimático NS 22192
- Solução de meios (suplementos)

De modo a ficar claro ao longo deste trabalho, é apresentada na tabela 5 a designação atribuída a cada ensaio assim como os detalhes dos ensaios SSF, a proveniência das lamas, o volume, a consistência e as condições de agitação.

**Tabela 5-** Ensaio de SSF, para o estudo da mudança de escala, substrato utilizado, designação do ensaio (o dígito árabe 1 ou 2 designa a origem das lamas; o dígito romano designa o número do ensaio efectuado com cada uma das lamas), volume útil, consistência, reator, agitação, tipo de agitador. Legenda <sup>(a)</sup> inóculo misto de *S. cerevisiae* e *P. stipitis*; <sup>(b)</sup> meio de cultura de referência; <sup>(c)</sup> meio de cultura estudado A; <sup>(d)</sup> meio de cultura estudado B.

Lamas Primárias	Reactor	Ensaio	Volume (mL)	Consistência (%m/m)	Agitação (rpm)	Agitador
Fábrica 1	Erlenmeyer	1.I	80	15	150	Orbital
		1.II	100	15	150	Orbital
		1.III <sup>a</sup>	100	15	150	Orbital
	BSTF	1.IV	1 000	15	150	Hélice
		1.V	1 000	17	100	Rushton 45°
	Biostat	1.VI	2500	10	150	Turbina rushton
Fábrica 2	Erlenmeyer	2.I <sup>b</sup>	100	21	150	Orbital
		2.II <sup>c</sup>	100	21	150	Orbital
		2.III <sup>d</sup>	100	21	150	Orbital
	BSTF	2.IV <sup>c</sup>	1 400	28	150	Hélice
		2.V <sup>c</sup>	1 400	28	100	Rushton 45°
	Biostat	2.VI <sup>c</sup>	2 500	15	150	Turbina rushton
		2.VII <sup>c</sup>	2 500	21	150	Turbina rushton
		2.VIII <sup>c</sup>	2 500	28	150	Turbina rushton
		2.IX <sup>c</sup>	4 000	28	150/250	Turbina rushton

As amostras de todos os ensaios foram recolhidas com uma frequência de duas vezes por dia. A primeira amostra era recolhida, se já liquefeita a mistura, às 18 horas, e as seguintes às 24, 42, 54, 66 e 72 horas. Eram retirados 2,5 mL de amostra que foram sujeitos a uma centrifugação de 5 000 rpm durante 10 minutos, após essa separação, as amostras eram sujeitas a análise através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e quantificação de açúcares redutores através do método DNS dos açúcares redutores.

Os ensaios SSF foram adaptados do protocolo LAP-008 "SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation" (NREL-LAP-008,2001)

### 3.5.1 Efeito da consistência

O processo SSF foi realizado em descontínuo e um dos objetivos era tratar a quantidade máxima possível de mistura reacional por unidade de tempo e volume. Assim, um dos efeitos estudados foi o da consistência. A consistência é a razão percentual de sólidos totais por volume total de mistura reagente. Foi estudada a melhor relação hidratos de carbono por volume de trabalho *versus* a sua operacionalidade, ou seja, era necessário saber até que ponto era possível aumentar a consistência da mistura sem prejuízo dos fenómenos de transferência de massa e calor (capacidade de agitação) e na quantidade de etanol final, sendo a descrição desse estudo feita na tabela 6.

**Tabela 6-** Estudo da consistência e respectivos volumes úteis, com as lamas primárias 2.

Reactor	Ensaio	Volume (mL)	Consistência (% m/m)	Concentração HC/L
Biostat®	2.VI	2 500	15	90
	2.VII	2 500	21	126
	2.VIII	2 500	28	168

As lamas primárias 1 são as que têm menos sólidos, ou seja maior teor de humidade. Esta característica tem implicações operacionais. Para um determinado volume de reação não foi possível tratar uma massa tão elevada de hidratos de carbono nas lamas primárias 1 como nas lamas 2, ou seja, houve um limite operacional para a consistência

da mistura reaccional (dado que não se pretendia usar as lamas tal qual sem qualquer tratamento adicional que diminuísse o conteúdo de água).

### 3.5.2 Composição dos meios de cultura

O meio da cultura utilizado para o crescimento das leveduras a nível laboratorial para a preparação do inóculo deve ser homogéneo e capaz de fornecer os nutrientes necessários precursores e vitaminas para suportar o crescimento celular. Em escala industrial tais requisitos são igualmente necessários, porém a utilização de suplementos seletivos e dispendiosos como extratos de levedura e de malte assim como peptona, não são economicamente viáveis.

Uma das abordagens ao estudo de viabilidade da produção de bioetanol a partir de lamas primárias, consistiu no estudo de meios alternativos aos normalmente empregues em laboratório. A tabela 7 apresenta a composição do meio de cultura habitualmente empregue e os novos meios testados nas tabelas 8 e 9, baseados e adaptados de Pereira e Guimarães [24].

**Tabela 7-** Meio de cultura de referência

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Glucose	10
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5

**Tabela 8-** Meio de cultura estudado A

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Glucose	10
Ureia	2,3
Sulfato de magnésio Heptahidratado	3,8
Extrato de levedura	3

**Tabela 9 -** Meio de cultura estudado B

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Glucose	10
Ureia	2,3
Sulfato de cobre	3,8
Extrato de levedura	3
Sulfato de magnésio heptahidratado	3,8
Peptona	3

A principal razão para testar estes meios de cultura alternativos, foi a de encontrar fontes de azoto e micronutrientes mais económicos para implementação a uma escala maior. Estes meios foram usados quando o inóculo da levedura era preparado, e no arranque do SSF, onde era fornecida uma quantidade diluída em água destilada, que no volume total do SSF perfizesse a concentração indicada nas tabelas. Após o consumo da glucose presente no inóculo, fornecida para auxiliar o seu crescimento, a *Saccharomyces cerevisiae* apenas teria como fonte de carbono os açúcares provenientes da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono das lamas.

### 3.5.3 Mudança de Escala

Para o estudo de viabilidade da mudança de escala do processo SSF, foram realizados os ensaios apresentados na tabela 5 (atrás referida) para as duas lamas primárias utilizadas.

O aumento de escala foi realizado em dois vasos reacionais, com volumes de 3,4 L (BSTF) e de 5 L no reator automatizado Biostat<sup>®</sup> B-Plus, da marca Sartorius, descritos em detalhe na tabela 10. O Reactor BSTF foi mergulhado num banho de água de temperatura controlada e mantido durante todo o ensaio a 38°C, o Biostat<sup>®</sup> tem a temperatura regulada automaticamente por uma camisa de aquecimento por onde passa água vinda da unidade central de controlo do fermentador. Foram estudados três níveis de consistência para as lamas provenientes da fábrica 2 e volumes úteis compreendidos entre os 80 e 4000 mL no sentido de estudar fenómenos decorrentes do aumento de escala, assim como a influência das relações geométricas do biorreator e dos agitadores na concentração de etanol e na viabilidade do aumento de escala. A maior mudança de escala foi para as lamas primárias 2, onde se aumentou o volume reacional em 40 vezes. Na tabela 5 está descrito para cada volume reaccional, as respectivas lamas primárias utilizadas, consistência, velocidade de agitação e o agitador e a designação de cada ensaio. Nas tabelas 10 e 11 estão descritas as dimensões dos reatores e as relações geométricas.

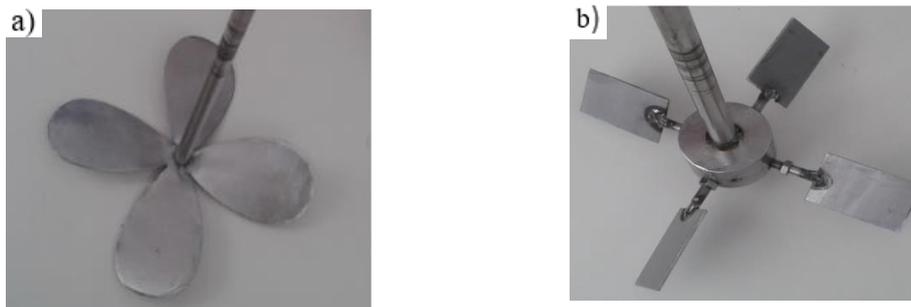
**Tabela 10-** Detalhes das dimensões e configurações geométricas dos dois reatores. Legenda: VL – volume de trabalho; Dt – diâmetro interno do reactor; Da – Diâmetro da turbina de agitação; Hl – altura do líquido; Hi – distância entre o agitador e o fundo do recipiente; Ha-a – distância entre as turbinas de agitação. BSTF- Batch Stirred Tank Fermentor; Biostat- fermentador comercial da Sartorius.

Ensaio	BSTF				Biostat		
	1.IV	1.V	2.IV	2.V	1.VI	2.VIII	2.IX
VL (L)	1	1	1,4	1,4	2,5	2,5	4
Dt (cm)	19	19	19	19	15,5	15,5	15,5
Da (cm)	13,5	17	13,5	17	6,5	6,5	6,5
Hl (cm)	4,4	4,4	6,2	6,2	32	32	50
Hi (cm)	2	2	2	2	5	5	5

**Tabela 11-** Relações adimensionais entre os diferentes volumes e agitadores utilizados.

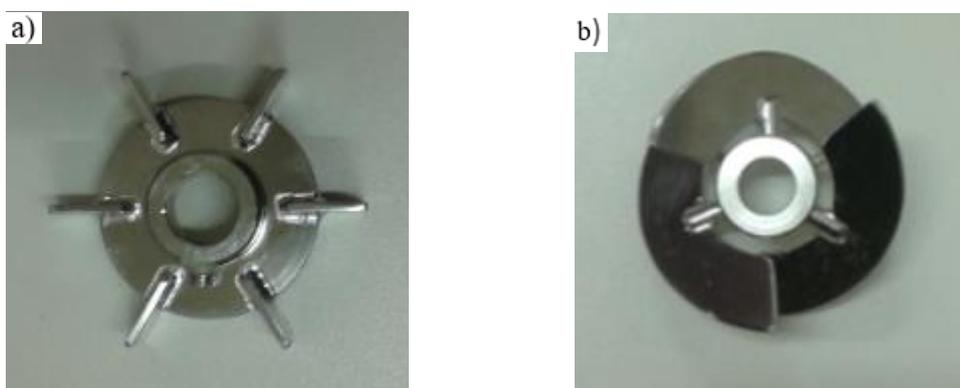
Ensaio	BSTF				Biostat		
	1.IV	1.V	2.IV	2.V	1.VI	2.VIII	2.IX
VL (L)	1	1	1,4	1,4	2,5	2,5	4
Ha-a (cm)	-	-	-	-	10	10	20
Da/Dt	0,71	0,91	0,71	0,91	0,42	0,42	0,42
Da/Hl	3,03	3,86	2,17	2,77	0,204	,204	0,12
Hl/Dt	0,23	0,23	0,33	0,33	2,06	2,06	3,23

No decurso do trabalho foram usados quatro agitadores, dois no BSTF e dois no Biostat. No BSTF utilizou-se um agitador do tipo hélice representado na figura 9 a), com 4 pás 13,5 cm de diâmetro, e um outro agitador *Rushton* de 17 cm de diâmetro no qual as 4 pás faziam um ângulo de 45°, representado na figura 9 b).



**Figura 9** – Representação dos agitadores utilizados nos ensaios em BSTF a) agitador do tipo hélice, b) agitador do género *Rushton* com 4 pás a 45°.

No reactor Biostat utilizaram-se dois agitadores ao mesmo tempo, um Rushton de 6 pás verticais com 7,5 cm de diâmetro e uma hélice corta espumas do tipo *Pitched blade turbine* de 8 cm de diâmetro, representados respectivamente nas figuras 10 a) e b) ambos acoplados ao mesmo veio de agitação.



**Figura 10** – Representação dos agitadores utilizados em conjunto nos ensaios em Biostat® a) agitador do género Rushton de pás verticais, b) agitador “corta espumas” do género *Pitched blade turbine*.

### 3.5.4 Efeito da *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma das limitações da *Sacharomyces cerevisiae* é a sua incapacidade em fermentar pentoses nomeadamente a xilose, uma vez que esse açúcar aparecia em concentrações apreciáveis nos hidrolisados das lamas primárias e que na presença de etanol era convertido a xilitol e não a bioetanol. Foi então estudada em paralelo a produção em dois sistemas

biológicos distintos. A *P. stipitis* metaboliza a xilose, sendo uma das pretensões neste estudo canalizar um substrato não usado para o produto de interesse. O primeiro meio reacional foi inoculado apenas com a *Sacharomyces cerevisiae*, o segundo foi inoculado com volumes iguais de *Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*.

Na tabela 12 estão representados os detalhes do estudo, como a proveniência das lamas, os hidratos de carbono tratados, a estirpe usada em cada inóculo e respectivo volume. Ambos os ensaios foram realizados em Erlenmeyer, a 38°C e com agitação orbital a 150 rpm.

**Tabela 12-** Estudo da metabolização da xilose com *S. cerevisiae* e *P. stipitis* em conjunto

Lamas	Ensaio	Levedura	Hidratos de Carbono (g)	Inóculo (mL)	Enzima (mL)
Fábrica 1	1.II	<i>S. cerevisiae</i>	11,9	10	2,3
	1.III	<i>S. cerevisiae</i> . <i>P. stipitis</i> .	11,9	5 5	2,3

### 3.5.5 Efeito do regime *Fed-batch*

O maior custo operacional desta reação é o da enzima, que depende da quantidade de hidratos de carbono presente na reação. A cinética da reação é limitada pelo acesso da enzima aos hidratos de carbono. Uma vez que o processo é integrado, interessa favorecer a aceleração da primeira parte do processo para que haja melhorias na produtividade e nos custos. A quantidade de enzima a fornecer é função dos HC na mistura. Se a quantidade inicial de HC for reduzida e o seu fornecimento for faseado, é possível tratar uma quantidade de HC elevada com pouca quantidade de enzima. A metodologia para a redução da quantidade de enzima está apresentada na tabela 13, na qual foram usadas as lamas primárias1 (Anexo III).

**Tabela 13-** Ensaio SSF – batch vs fed-batch

	Erlenmeyer		BSTF	
	Batch	Fed-Batch	Batch	Fed-Batch
Volume (mL)	100	100	1400	1400
Consistência (%m/m)	15	15	27	27
Agitação (rpm)	150	150	100	100
Tipo de agitador	Orbital	Orbital	Hélice	Rushton 45°
Enzima (mL)	1,6	0,8	41	13

### 3.6 Métodos Analíticos

#### 3.6.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC)

O acompanhamento de cada ensaio SSF foi feito com recurso a cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), utilizada para quantificar a produção de etanol em cada amostra. O equipamento utilizado consistia no modelo Knauer K-301 composto por uma coluna Hi-Plex Ca 8  $\mu$ m, de 300  $\times$  7,7 mm (Agilent) que operava a 80°C e juntamente com um detetor de índice de refração (Knauer). O eluente era água ultrapura filtrada e degaseificada, bombeada a um caudal de 0,6 mL/min. O etanol foi identificado através do seu tempo de retenção previamente calibrado na coluna, sendo a sua concentração calculada em função da curva de calibração construída. Assim como para o etanol foram também construídas as curvas de calibração para glucose, xilose, celobiose, glicerol e xilitol.

#### 3.6.2 Quantificação dos açúcares redutores através do método DNS modificado

A concentração global dos açúcares redutores (glucose, frutose, galactose) foi determinada através do método DNS modificado. O processo consiste em adicionar a um tubo de ensaio: 1 mL de solução de tampão citrato 0,05 M, 0,5 mL de amostra (diluída com tampão 1:5) e 3 mL de reagente DNS modificado. Agita-se bem a mistura e coloca-se o tubo num banho de água a ferver durante 5 minutos e, logo de seguida, num banho de gelo durante 5 minutos.

Após o arrefecimento no banho de gelo, pipeta-se 0,2 mL de mistura para uma cuvete e adiciona-se 2,5 mL de água destilada. A absorvância foi medida num espectrofotómetro UV-Visível com um comprimento de onda a 540 nm.. A concentração dos açúcares redutores foi calculada através da equação da curva de calibração do DNS modificado realizada a quando das calibrações, que relacionava a absorvância com a concentração. (Anexo IV).

### 3.7 Parâmetros de fermentação

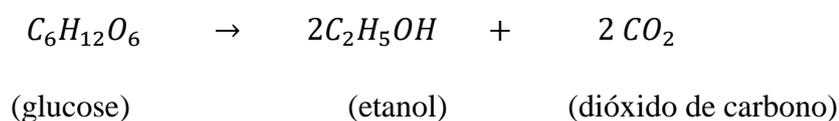
#### 3.7.1 Rendimento em etanol (Y)

O objetivo dos vários ensaios é avaliar de que forma uma determinada variável afeta a produção de etanol. Foram calculados dois parâmetros de caracterização da fermentação. O mais importante é o rendimento da conversão dos hidratos de carbono a etanol em percentagem relativamente ao rendimento teórico. O outro é a produtividade do processo em g etanol / L h.

- $$\text{Rendimento em etanol} = \frac{[EtOH]_t}{0,51 \times 1,1 \times [HC]_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

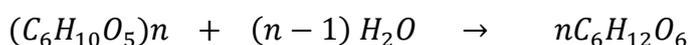
Na qual:

- $[EtOH]_t$  é o etanol formado ao fim de um determinado tempo t em g;
- $[HC]_{inicial}$  é a quantidade de hidratos de carbono no volume de trabalho até ao tempo t em g;
- 0,51 é o fator de conversão da glucose a etanol;



Como 1 mole de glucose (PM=180 g/mol) dá origem teoricamente a 2 moles de etanol (PM=46 g/mol), o factor de conversão mássico é  $2 \times 46/180 = 0,51$ , pelo que o fator de conversão da glucose a etanol é  $f=0,51$ .

- 1,1 é o fator de conversão da celulose e hemicelulose em xilose e glucose:



(celulose)

(água)

(glucose)

Exemplificando para  $n=2$ , uma molécula de celobiose (PM=360 g/mol) mais água (PM=18 g/mol) dá origem a duas moléculas de glucose (PM=180 g/mol), o fator de conversão mássico é  $180 \times 2/(360-18)=1,052$  pelo que o fator de conversão da celulose a glucose é  $f=1,1$ .

### 3.7.2 Razão de etanol produzido por hidratos de carbono disponíveis (R)

A razão de etanol produzido face aos hidratos de carbono fornecidos exposta na equação 2, é um outro indicador, mais global e transversal, que ajuda a comparar os vários ensaios entre si. Na verdade os HC não convertidos não são aproveitados.

$$\bullet R \frac{[\text{EtOH}]}{[\text{HC}]} = \frac{[\text{g etanol}]}{[\text{g hidratos de carbono}]} \quad (\text{Equação 2})$$

### 3.7.3 Produtividade em etanol (P)

A produtividade representada na equação 3 relaciona o etanol produzido (g/L) com o tempo de duração da reação até aquele instante  $t$  de amostragem onde  $[\text{EtOH}]_t$  é a concentração de etanol no instante  $t$

$$\bullet P = \frac{[\text{EtOH}]_t}{t} \quad (\text{Equação 3})$$

### 3.7.4 Cálculo do teor enzimático a fornecer à mistura

O teor enzimático fornecido à mistura era função dos hidratos de carbono na mistura reacional. Mostra-se um exemplo do processo de cálculo da enzima necessária, para um ensaio hipotético.

1. massa de lamas húmidas (g) x teor de sólidos da lama (%) = massa de lamas em base seca (g)
2. massa de lamas secas (g) x teor de HC da lama primária (%) = massa de HC (g)
3. Actividade do complexo enzimático =  $\frac{78,7 \text{ FPU}}{1 \text{ mL}}$

4.  $FPU = \frac{15 \text{ FPU}}{\text{g HC}} * \text{massa de HC (g)}$

5.  $\text{Volume de enzima necessário} = FPU \times \frac{1 \text{ mL}}{78,7 \text{ FPU}} = \dots \text{ mL}$



## 4. Resultados e Discussão

O sistema reacional é caracterizado pela sua heterogeneidade, atendendo à natureza física dos resíduos usados como matéria-prima. No início de cada ensaio eram carregados no reactor (Erlenmeyer, BSTF ou Biostat) as lamas, o inóculo da *Saccharomyces cerevisiae* (10 % v/v), a solução diluída do complexo enzimático (o volume de solução original de enzima dependia da massa de HC associados às lamas presentes na mistura reaccional) e os suplementos nutritivos.

O acompanhamento da reacção foi feito retirando 2,5 mL de amostra às 18, 24, 42, 48, 66 e 72 horas. Após centrifugação da amostra, durante 10 minutos e 5 000 rpm, a fim de separar os sólidos do sobrenadante, um volume de 0,5 mL era filtrado para posterior injeção no HPLC, (Anexo V) onde se pode observar uma ilustração de um cromatograma e quantificação da concentração dos açúcares simples (glucose, xilose, celobiose) e dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e xilitol), enquanto o restante do sobrenadante era sujeito a análise pelo método dos açúcares redutores DNS.

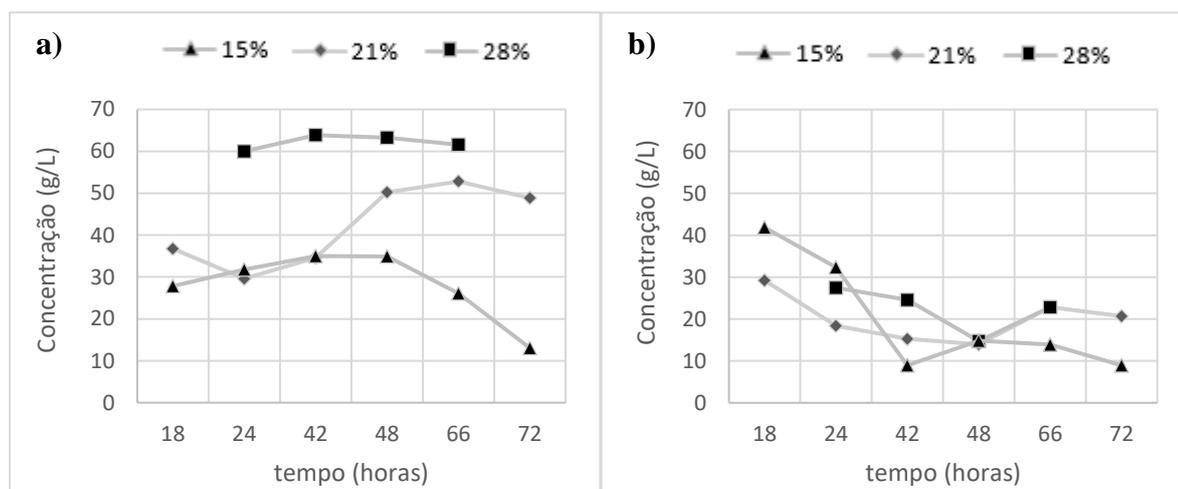
Sendo um processo integrado, a quantificação de açúcares simples fermentáveis (seja pelo método DNS ou HPLC) apenas dá uma estimativa relativamente às cinéticas dos dois bioprocessos envolvidos, a hidrólise enzimática e a fermentação. Idealmente a concentração destes açúcares deveria ser muito baixa, mostrando que à medida que vão sendo produzidos por hidrólise são logo consumidos. As lamas primárias 1, por estarem armazenadas há aproximadamente um ano, mesmo a 6 - 8 °C, foram alvo de esterilização prévia na autoclave, enquanto as lamas primárias 2 mais recentes, foram usadas directamente do frigorífico.

### 4.1 Efeito da consistência

A avaliação desta variável operacional foi levada a cabo no reactor Biostat, com as lamas primárias 2, que devido ao seu baixo teor de humidade, permitiram aumentar a concentração de HC (consistência) dentro de um volume reaccional disponível. As condições foram iguais entre os ensaios, tipo e velocidade de agitação configuração geométrica do reator, variando apenas a consistência da mistura reagente entre os ensaios.

O estudo da consistência tinha como objectivo encontrar um ponto óptimo da relação hidratos de carbono / volume útil. As lamas primárias 2 foram as mais utilizadas pela sua menor humidade (52%) em relação às lamas primárias 1 (79%) facilitando o estudo de várias consistências sem ter de usar reatores com volumes grandes. Por outras palavras, quanto menor o teor em água das lamas mais hidratos de carbono por unidade de volume se pode tratar.

O aumento da consistência foi de 15 até 28%, sendo este limite máximo de 28% aquele onde se obteve maior concentração de etanol, como é possível constatar na figura 11.



**Figura 11** - Evolução da formação de etanol e consumo dos açúcares redutores. a) Evolução do etanol (15% consistência-ensaio 2.VI), (21% consistência-ensaio 2.VII), (consistência 28%-ensaio 2.VIII). b) Evolução da concentração dos açúcares redutores 2.VI (15% consistência), 2.VII (21% consistência) 2.VIII (consistência 28%).

Observando os três perfis é possível afirmar que houve proporcionalidade entre o aumento de consistência e o aumento da concentração máxima de etanol (Tabela 14). O grande obstáculo a uma concentração de etanol razoável ao fim de algumas horas, era a viscosidade que no início do SSF era bastante elevada e poderia dificultar a dispersão e acesso da enzima aos polissacarídeos e das leveduras aos açúcares simples. No entanto o ensaio com maior consistência conseguiu satisfazer os objectivos, (aumentar a concentração de etanol) indicando assim, que é possível a este processo integrado, operar com a consistência de 28%. Dos três ensaios, aquele que tratou uma quantidade menor de HC foi o que obteve menor concentração de etanol, assim como o rendimento em relação ao substrato (Y) mais baixo (Tabela 14), a baixa concentração de etanol face aos outros ensaios seria de esperar pois foi

fornecido uma menor quantidade de HC. O ensaio 2.VII apesar de ter ficado abaixo da concentração máxima de etanol atingida pelo ensaio 2.VIII, foi o que alcançou um melhor rendimento em relação ao substrato.

O aumento de concentração de HC, revelou-se capaz de em pouco tempo (42 horas) dar origem a concentrações de etanol elevadas e um rendimento em relação ao substrato muito satisfatório de 70%, tendo em conta que a matéria-prima é um resíduo, há elevada viscosidade nas primeiras horas de SSF, e o processo é integrado. Os valores do ensaio 2.VIII são bastante animadores.

**Tabela 14-** Parâmetros de rendimento máximo da fermentação e tempo em que foram atingidos

Ensaio	Consistência (m/m)	R[EtOH/HC] (g/g)	Y [EtOH] (%)	EtOH (g/L)	P (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	tempo (h)
2.VI	15	0,39	68	35	0,8	42
2.VII	21	0,43	77	52	0,8	66
2.VIII	28	0,38	70	64	1,52	42

## 4.2 Efeito dos suplementos ao meio de cultura

As leveduras para se multiplicarem e metabolizarem os açúcares fermentáveis necessitam de fontes de azoto e fósforo para além de fontes de carbono, assim como outros elementos essenciais, presentes no meio reacional, sendo muitas vezes suficiente a presença de micronutrientes associados à água de diluição (suspensão neste caso) dos substratos. Noutros casos é preciso uma adição extra mesmo que em pequenas concentrações. A adaptação da *S. cerevisiae* a suplementos, não tão específicos, mas por outro lado mais viáveis do ponto de vista económico, foi estudada.

**Tabela 15-** Ensaios com três meios de cultura diferentes: 2.I ) meio de referência; 2.II) meio estudado A; 2.III) meio estudado B.

Ensaios	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Y [EtOH] (%)
2.I	33,8	3,25	49,3
2.II	29,4	9,80	42,9
2.III	28	9,1	40

Os resultados expostos na tabela 15 referem-se às concentrações de etanol e xilitol e o rendimento em etanol ao fim de 66 horas com as lamas primárias 2 em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de volume útil. Os resultados, apesar de ficarem ligeiramente aquém dos valores esperados (rendimentos inferiores) foram capazes de confirmar a adaptação da *S. cerevisiae* a meios com maior potencial de aplicação industrial. Dos três meios de cultura testados para avaliar o efeito dos suplementos, o meio A (Tabela 8) foi o meio que melhor relação rendimento etanol/custo dos suplementos obteve, uma vez que dos três meios foi o que usou menos compostos laboratoriais e obteve um rendimento semelhante, quer ao meio de referência, quer ao meio alternativo B (Tabela 9). Daqui em diante todos os ensaios usaram o meio A, como está descrito na Tabela 8.

Um composto também avaliado foi o xilitol, dado que a aparição deste composto em ensaios prévios com lamas primárias 1 era recorrente e em concentrações apreciáveis. Aparentemente um dos componentes usados nos meios estudados A e B favorece a produção de xilitol uma vez que a sua concentração quase que triplicou comparativamente ao do meio de referência mais virado para a escala laboratorial.

### 4.3 Aumento de escala

Foram realizados ensaios em dois biorreatores de bancada (BSTF e Biostat<sup>®</sup>), com o objetivo de avaliar o processo SSF num aumento de escala. Usou-se o Biostat<sup>®</sup>, com capacidade de 5 L, mas como volume útil para os ensaios apenas 2,5 L e 4 L e no BSTF de 3,4 L utilizaram-se os volumes uteis de 1 L e 1,4 L. A levedura usada foi a *S. cerevisiae* ATCC 26602, juntamente com a celulase NS 22192 com uma carga enzimática de 15 FPU/g HC.

De forma a entender a adaptação deste processo integrado de um volume de Erlenmeyer a um volume útil de um biorreactor de bancada, realizaram-se ensaios SSF onde as condições operacionais eram mantidas e aumentando o volume de trabalho. As lamas primárias 1 foram sujeitas a um aumento de escala de 80 mL para 2500 mL, enquanto as lamas primárias 2 foram de 1400 mL a 4000 mL. As lamas primárias 2 demonstraram ser mais adequadas ao estudo de aumento de escala, devido à sua menor humidade, que permitiu o estudo do tratamento de uma maior quantidade de sólidos por unidade de volume e tempo. Tipicamente um biorreactor é dividido em volume útil (de trabalho) e em *headspace*. O volume útil, ocupado pelo meio reacional, é uma fracção de 70-80% do volume total, este valor pode variar dependendo da tendência da mistura reaccional para formar espumas, ou se for o caso, evitar a acumulação de gases que sejam borbulhados no sentido ascendente na mistura.

No caso dos ensaios SSF, não era fornecida à cultura nenhum tipo de gás, e a formação de espumas era desprezável. À medida que a mistura se ia liquefazendo ia adquirindo um tom acinzentado como é possível observar através da figura 12. Ambas as lamas estavam liquefeitas até às 18 horas de SSF.

Ao longo dos ensaios SSF, o carbonato de cálcio e outros inorgânicos iam depositando-se no fundo do biorreactor. No fim dos ensaios havia um depósito de carbonatos, que constitui uma vantagem deste bioprocessos integrado, uma vez que não há libertação de CO<sub>2</sub>, ficando este retido na forma de carbonato.



**Figura 12-** Meio reacional em liquefação no Biostat<sup>®</sup>

Na tabela 16 encontram-se expostos os parâmetros de fermentação dos ensaios SSF com as respectivas designações e várias escalas. A partir da análise da tabela 16, pode observar-se que as lamas primárias da fábrica 2 deram origem a maior concentração de etanol final. A sua baixa humidade se por um lado contribuiu para uma maior viscosidade no início do SSF parece ter contribuído para um melhor desempenho da enzima, favorecendo o contacto entre esta e os polissacarídeos.

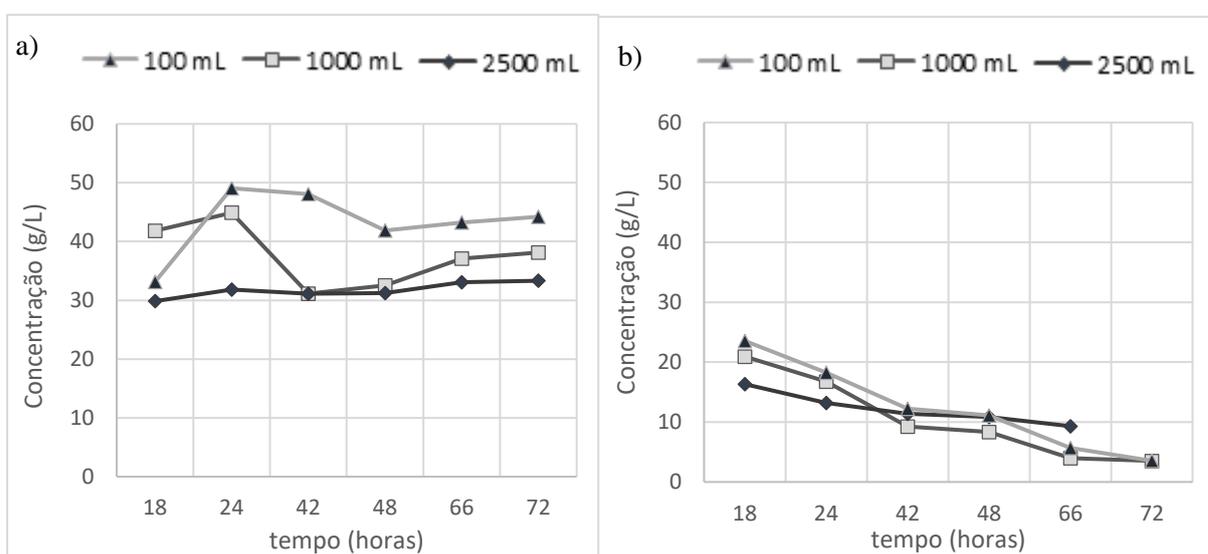
**Tabela 16** - Resumo dos ensaios de mudança de escala.

Lamas	ensaio	Volume (mL)	Tempo (h)	[EtOH] (g/L)	Y [EtOH] (%)	R[EtOH/HC] (g/g)
Fábrica 1	1.I	80	24	52	82	0,460
	1.II	100	24	49	74	0,414
	1.IV	1000	24	45	68	0,378
	1.V	1000*	48	52	78	0,393
	1.VI	2500	72	33	75	0,420
	Fábrica 2	2.IV	1400	18	53	61
2.V		1400*	42	59	68	0,258
2.VI		2500	42	35	68	0,393
2.VII		2500	66	53	77	0,431
2.VIII		2500	42	64	70	0,382
2.IX		4000	42	56	64	0,349

Observando a Tabela 16, é possível afirmar que os parâmetros de produtividade, rendimento e concentração de etanol estão dentro do economicamente viável (mínimo 32-39 g/L) (4%-5% v/v) [23], com a exceção do ensaio 2.VI de 2500 mL com as lamas primárias da fábrica 2 que aparentemente terá sido contaminado, ou ocorreu algum outro contratempo experimental não identificado.

- Lamas primárias 1

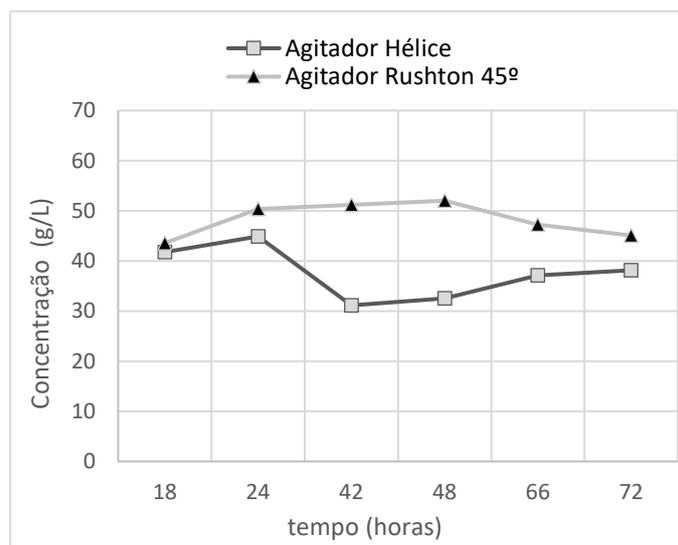
As lamas primárias 1 foram sujeitas a um aumento de escala de 80 mL para 2500 mL com uma consistência entre 10 e 17 %, dada a sua elevada humidade (79 %). Analisando a figura 13 que mostra o perfil dos resultados da mudança de escala, e tomando como referência os resultados obtidos em Erlenmeyer, verifica-se alguma proporcionalidade inversa entre aumento de volume e a concentração de etanol, que terá mais a ver com a hidrodinâmica da mistura reagente do que propriamente com o aumento de volume reaccional, tal como se pode observar na figura 13.



**Figura 13-** Evolução da concentração de etanol e dos açúcares ao longo do tempo para três volumes diferentes ensaio 1.II erlenmeyer 100 mL, ensaio 1.IV BSTF 1000 mL, ensaio 1.VI Biostat 2500mL; a) Evolução da formação do etanol, b) Evolução da concentração de açúcares.

Uma característica que terá contribuído para que o ensaio 1.VI tivesse um perfil mais estável de etanol em comparação com o ensaio 1.IV, terá sido a configuração geométrica dos dois reatores. O ensaio 1.IV realizado em BSTF tem uma relação de altura/diâmetro de 0,2:1 que é um valor fora do convencional para reactores enquanto essa relação para o ensaio 1.VI realizado Biostat é de 2,0:1, mais próxima do recomendado de 3:1 na literatura [25]. Apesar de menor concentração de etanol no ensaio 1.VI, este obteve melhores valores de rendimento comparado aos de 1.IV.

O efeito da velocidade de agitação nas primeiras horas de SSF não parece afetar a concentração de etanol; porém, a menor dispersão nas primeiras horas da reação podem influenciar os resultados, dado que nesse período era notório um volume significativo de ‘zonas mortas’ onde a velocidade do agitador nada influenciava. De modo a caracterizar essa influência realizou-se um estudo simples, no qual para o mesmo sistema se usam dois agitadores com configurações semelhantes, mas com dimensões diferentes descritos na tabela 17.



**Figura 14-** Evolução da concentração ao longo do tempo com agitadores diferentes referentes aos ensaios 1.IV (agitador Hélice) e 1.V (Agitador Rushton de 4 pás 45°) com as lamas primárias 1

**Tabela 17-** Relações adimensionais entre os diferentes volumes e agitadores utilizados nas lp1 VL – volume de trabalho; Dt – diâmetro interno do reactor; Da – Diâmetro da turbina de agitação; Hl – altura do líquido; Hi – distancia entre o agitador e o fundo do recipiente; Ha-a – distancia entre as turbinas de agitação.

	BSTF		Biostat
Ensaio	1.IV	1.V	1.VI
VL (L)	1	1	2,5
Ha-a (cm)	-	-	10
Da/Dt	0,71	0,91	0,42
Da/Hl	3,03	3,86	2,04
Hl/Dt	0,23	0,23	2,06

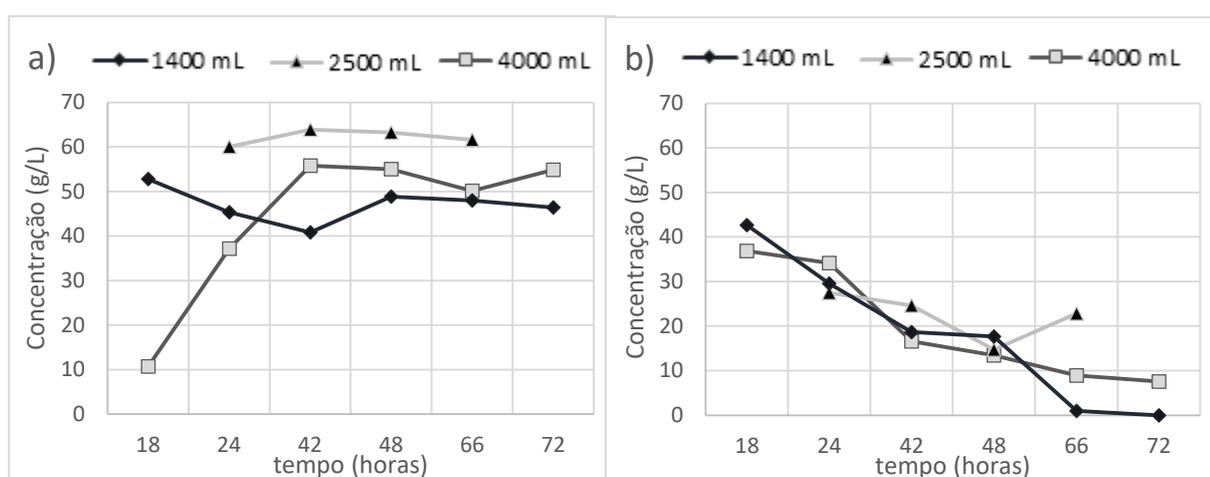
A relação  $Da/Dt$ , que aumentou de 0,71 para 0,91 do ensaio 1.IV para o ensaio 1.V (Tabela 17), parece de facto afetar a concentração de etanol, não só na concentração máxima de etanol (Figura 14), como na manutenção dessa concentração ao longo do tempo, através de uma melhor dispersão. A partir das 24 horas a concentração em etanol no reator com agitador Rushton de 4 pás a 45° atinge um patamar começando a decair às 48 horas de reação, enquanto os resultados do reactor com o agitador hélice sofrem um decaimento ao fim de um período de crescimento como foi recorrente em vários ensaios. Apesar de os ensaios de 1.VI não atingirem concentrações de etanol assinaláveis (Tabela 18), foi o que obteve a melhor razão de etanol por hidratos de carbono disponíveis e um rendimento (relativamente ao teórico), em relação ao substrato apreciável na casa dos 70 %.

**Tabela 18** – Parâmetros dos ensaios de aumento de escala para as lamas primárias 1

<b>Volume (mL)</b>	<b>Ensaio</b>	<b>[EtOH] g/L</b>	<b>tempo (h)</b>	<b>R [EtOH/HC] (g/g)</b>	<b>Y [EtOH] %</b>	<b>P [EtOH] g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
100	1.II	49	24	0,460	74	2,04
1000	1.IV	45	24	0,378	68	1,87
1000	1.V	52	48	0,393	78	1,08
2500	1.VI	33	72	0,420	69	0,46

- Lamas primárias 2

Na figura 15 está representada a evolução dos sistemas reacionais com as lamas primárias 2, que possibilitaram um estudo de aumento volume maior do que as lamas primárias 1, devido ao seu baixo teor de humidade permitindo tratar maiores quantidades de lamas húmidas por volume e tempo. Os resultados no global, tiveram melhor rendimento do que os ensaios corridos nas outras lamas como se pode observar. Todos os ensaios (2.IV, 2.VIII e 2.IX) foram realizados com a mesma consistência (28%), os ensaios 2.VIII e 2.IX foram realizados no Biostat e o ensaio 2.IV no BSTF.

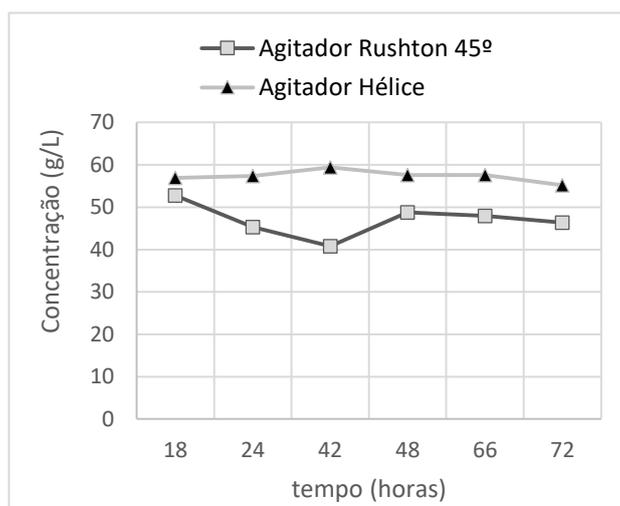


**Figura 15** – Nesta figura encontram-se representados os ensaios 2.IV (1400 mL), 2.VIII (2500 mL) e 2.IX (4000 mL) em a) evolução da concentração de etanol mediante aumento de volume) consumo dos açúcares redutores. b) evolução da concentração dos açúcares redutores.

Observando a figura 15 o ensaio 2.IV, foi o que menos etanol gerou, em comparação aos outros ensaios, sendo possível observar também que as concentrações máximas de etanol dos ensaios 2.VIII e 2.IX foram melhores do que as do ensaio 2.IV (Tabela 20). Estes valores máximos nos ensaios de maior volume corroboram ensaios semelhantes encontrados na literatura, que referem a razão Hl:Dt de 3:1 como a melhor razão [26]. O ensaio 2.IX tinha em relação aos demais a melhor razão geométrica de semelhança mencionada na literatura, de 3,23:1, o ensaio 2.IV era o que tinha essa razão mais desviada, cerca de 0,33 daí ter atingido resultados piores. Apesar disso o ensaio 2.IV atingiu resultados razoáveis devido à razão Dt/Da favorecer mais a dispersão do que os ensaios 2.VIII e 2.IX. O ensaio exposto na figura

2.IX teve alguns percalços experimentais no decorrer da fermentação, nomeadamente na manutenção da temperatura de operação, que só às 24 horas se estabilizou nos 38°C, no entanto obteve resultados bastante satisfatórios. Apesar de no final os rendimentos terem sido animadores para o ensaio 2.IX como se pode constatar na tabela 20, é dos três volumes o que exhibe melhor relação altura: diâmetro do agitador ( $H/Da$ ), como é possível observar na tabela 19. Os resultados demonstram que apenas respeitando as razões geométricas de *aspect ratio* (razão entre semelhanças dimensionais que deve ser respeitada em aumentos de escala) aconselhadas na literatura [25], o SSF pode ser viável em escalas superiores.

De modo a avaliar a razão diâmetro da turbina de agitação /diâmetro do tanque ( $Da: Dt$ ), repetiu-se o ensaio 2.IV que havia utilizado um agitador do género hélice com 13,5 cm de diâmetro, num outro ensaio designado 2.V com um agitador Rushton com 4 pás a 45° e 17 cm de diâmetro. Os perfis do ensaio 2.IV e 2.V encontram-se representados na figura 16, onde todas as condições processuais foram mantidas, o agitador.



**Figura 16** – Nesta figura encontram-se representados a evolução da concentração de etanol nos ensaios 2.IV (agitador hélice) e 2.V (agitador Rushton), ambos os ensaios com 1400 mL.

A diferença na razão diâmetro da turbina de agitação /diâmetro do tanque que aumentou de 0,71 para 0,91, entre os ensaios 2.IV e 2.V ficou expressa, o melhor perfil obtido foi com o agitador hélice em que a razão  $Da/Dt$  é maior.

**Tabela 19** – Relações adimensionais entre os ensaios realizados para as lp2. Legenda: VL – volume de trabalho; Dt – diâmetro interno do reator; Da – Diâmetro da turbina de agitação; Hl – altura do líquido; Hi – distancia entre o agitador e o fundo do recipiente; Ha-a – distancia entre as turbinas de agitação.

	BSTF		Biostat	
<b>ensaio</b>	2.IV	2.V	2.VIII	2.IX
<b>VL (L)</b>	1,4	1,4	2,5	4
<b>Ha-a (cm)</b>	-	-	10	20
<b>Da/Dt</b>	0,71	0,91	0,42	0,42
<b>Da/Hl</b>	2,17	2,77	0,204	0,12
<b>Hi/Dt</b>	0,33	0,33	2,06	3,23

**Tabela 20** – Parâmetros dos ensaios do aumento de escala para as lamas 2

<b>Volume (mL)</b>	<b>Ensaio</b>	<b>[EtOH] g/L</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>R [EtOH/HC] (g/g)</b>	<b>Y [EtOH] %</b>	<b>P [EtOH] g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
1400	2.IV	53	18	0,237	60	2,93
1400	2.V	59	42	0,267	68	1,41
2500	2.VIII	64	24	0,382	70	1,52
4000	2.IX	56	42	0,349	64	1,32

Os ensaios SSF tiveram a todos a mesma duração, 72 horas. Ficou claro que as reações tinham um máximo de rendimento em relação ao substrato, e uma concentração máxima de etanol num intervalo de tempo específico e a concentração de etanol não é proporcional à duração do SSF. O volume de reação assim como a consistência não parecem estar relacionados com o tempo, para qual os parâmetros atingem o seu máximo. Desde que a mistura se liquefaz, diminuem muitas resistências à transferência de massa e o acesso das enzimas fica facilitado e as condições favorecem a *S. cerevisiae* a produzir etanol.

#### 4.4 Efeito da *Pichia stipitis* na metabolização da Xilose

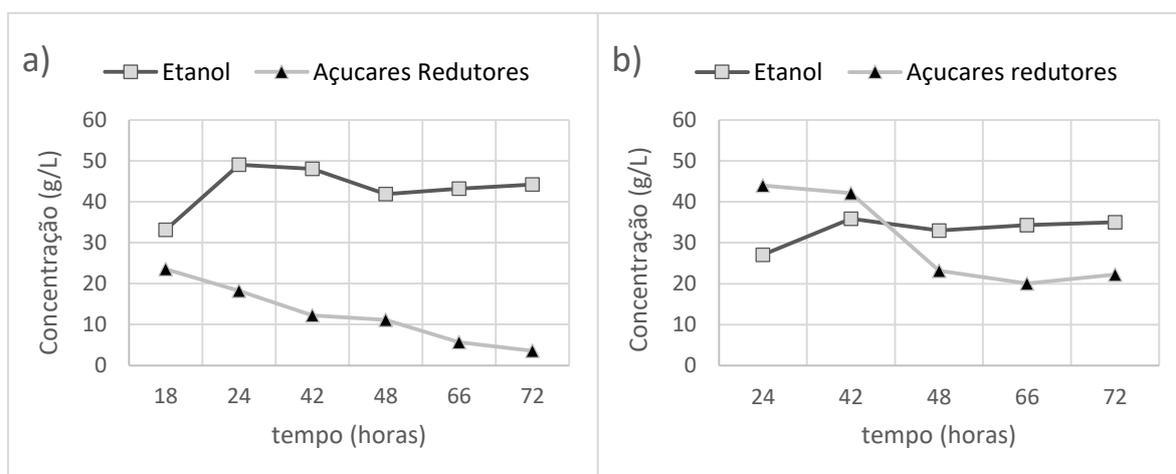
Apesar de alguns microrganismos utilizarem a xilose como fonte de carbono, a fermentação das pentoses em etanol pelos microrganismos não é direta se houver outros

açúcares, o que se reflete em baixos rendimentos de etanol em relação à xilose. Uma das principais áreas de investigação é a descoberta de estirpes que permitam uma grande eficiência na conversão das pentoses a etanol. Em teoria a levedura apenas precisava da enzima para converter a xilose em xilulose, a fim de ser capaz de fermentar xilose.

O objetivo da inclusão da *P. stipitis* no inóculo da cultura era o de metabolizar a xilose a etanol e assim aumentar o rendimento em etanol sob hidratos de carbono disponíveis sem recorrer a estirpes geneticamente modificadas [27] e desfavorecer tanto quanto possível a produção de xilitol. Porém não se atingiu a pretensão de canalizar a xilose para o etanol, na verdade a reação até demorou mais tempo. No ensaio de cultura mista não foi possível retirar amostra as 18 horas, pois não estava ainda liquefeita. A *Pichia stipitis* apesar de metabolizar pentoses e hexoses a etanol, fá-lo mais lentamente do que a *S. cerevisiae*, como se pode observar na figura 17.

Na comparação a partir da figura 17, entre o ensaio 1.II com a 1.III há um atraso na liquefação, dado que um ensaio às 18 horas estava liquefeito enquanto o outro não, possivelmente devido à adaptação das duas estirpes no mesmo meio e conseqüente atraso das respetivas fases exponenciais, transmitindo a ideia de que o ensaio 1.II poderia até ter o mesmo rendimento do ensaio 1.III se tivesse mais tempo.

Na figura 17 o ensaio 1.II mostra que os açúcares redutores sofreram um decaimento ao longo do tempo que se traduziu em etanol mais rapidamente do que no ensaio 1.III,



**Figura 17** -Evolução da concentração de etanol e açúcares redutores ao longo do tempo para os ensaios SSF a) Ensaio 1.II (100 mL) b) Ensaio 1.III (100 mL).

Este estudo tinha como próximo passo a transposição para um volume de trabalho maior, no entanto um dos critérios é a produtividade, ora se este processo com duas leveduras toma mais tempo e aparentemente não se traduz em ganhos na concentração de etanol, a transposição não se justificou.

#### 4.4.1 Produtos Secundários do SSF

O consumo da xilose no SSF era de interesse, pois ia aumentar a concentração final de bioetanol, e por outro lado impedir a contribuição deste para a formação xilitol a partir da xilose.

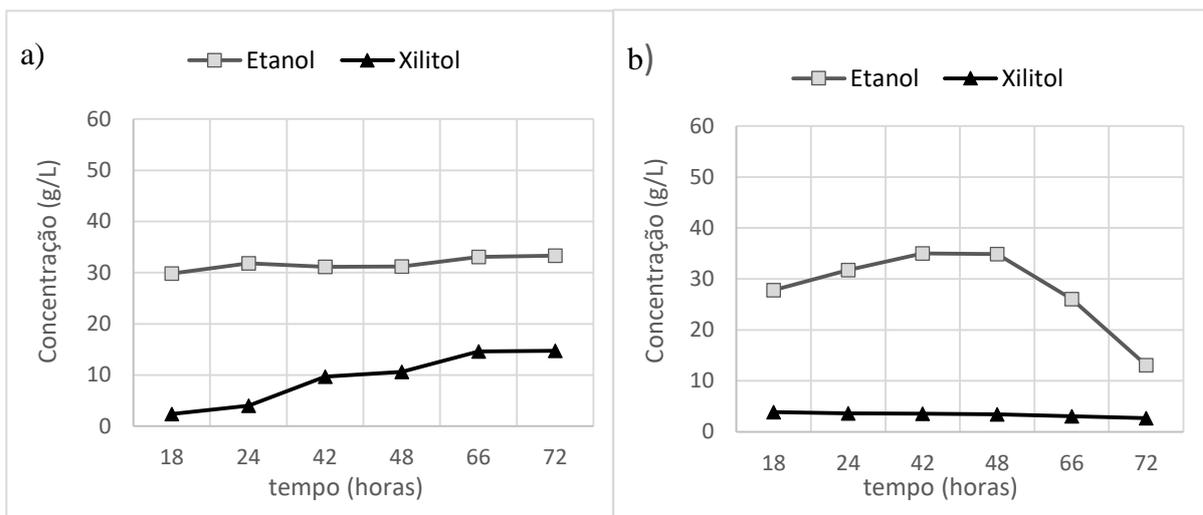
Um fenómeno recorrente de qualquer reação é a produção de produtos parasitas decorrentes de reações paralelas à principal. Durante as 72 horas de reação, o consumo dos hidratos de carbono não convergiu todo para a produção de etanol, tal facto deve-se essencialmente à produção de xilitol que em determinadas concentrações de glucose e etanol, é produzido [28]. O xilitol e o glicerol eram produtos secundários já previamente conhecidos, e como tal, foram construídas curvas de calibração para a concentração e o tempo de retenção de ambos na coluna de cromatografia é conhecido.

O xilitol é um álcool pentahidroxilado de xilose, um açúcar alcoólico produto intermediário do metabolismo de hidratos de carbono na *S. cerevisiae* foi o produto secundário mais recorrente. A estirpe utilizada de *S. cerevisiae* não fermenta pentoses, como a xilose, porém é capaz de reduzir a xilose a xilitol na presença de co-substratos como glucose e etanol[28]. Tal fenómeno foi possível observar, dado que a produção do etanol e do xilitol não eram paralelas desde o início; só após as 24 horas de reação é que a produção de xilitol era notória, assim como também era claro o prejuízo do etanol devido ao xilitol.

As reações secundárias aparentam depender muito das lamas primárias utilizadas, como são de proveniências diferentes, com composições diversificadas (Tabela 1), favorecem a produção de produtos secundários conforme a sua composição (Anexo V). O grau de consistência e a origem das lamas foram os fatores que mais influenciaram a presença do xilitol em concentrações apreciáveis.

Através da análise da Figura 18, referentes a ensaios com as lamas primárias 1 e 2 conclui-se que de facto o xilitol é um co-produto da reação do SSF produzido na presença de

co-substratos como a glucose e o etanol [28], sendo produzido apenas na presença deste e com prejuízo para a sua produção. A produção de xilitol era clara a partir das 24 h quando haviam concentrações apreciáveis de etanol e glucose [29], a consistência neste tipo de lamas foi sempre de 15%, o volume reacional 2,5 L para as lamas primárias 1 e 2, demonstram que a proveniência destas afectou a formação do xilitol.



**Figura 18**-Evolução da concentração de etanol e xilitol ao longo do tempo para os ensaios SSF.a) Ensaio 1.VI, b) Ensaio 2.VI

Observando os perfis da figura 18, referentes aos ensaios 1.VI com as lamas primárias 1 e 2.VI com as lamas primárias 2, ambos realizados no Biostat<sup>®</sup>, com a mesma consistência, volume útil e semelhanças geométricas é perceptível que esses factores influenciaram a produção de xilitol. Por outro lado, a produção do xilitol e outros produtos secundários são, um fenómeno que, aparentemente depende da proveniência das lamas primárias, uma vez que para as lamas primárias 1 o xilitol era produzido em concentrações assinaláveis, tendo esse fenómeno não ocorrido de forma tão significativa nas lamas primárias 2.



## 5. Conclusões e Sugestões de trabalho futuro

O presente trabalho teve como objetivo contribuir para a valorização de resíduos lenhocelulósicos através da abordagem SSF, tendo sido usadas lamas primárias da indústria de pasta e papel. O contributo deste trabalho foi feito através do estudo de:

- Alteração dos nutrientes suplementares da levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 e a respectiva adaptação, seja em Erlenmeyer ou em biorreactor de bancada.
- Estudo da proporcionalidade entre consistência do meio reacional e concentração de etanol.
- Avaliação da concentração do etanol mediante a adição da levedura *Pichia stipitis* ao meio reacional com a *S. cerevisiae* ATCC 26602, de forma a serem consumidos simultaneamente pentoses e hexoses.
- Aumento de escala dos volumes reaccionais: com as lamas primárias 1 foram estudados volumes desde 80 até 2500 mL, ao passo que as lamas primárias 2 foram estudados volumes de 100 mL até 4000mL. O rendimento das lamas primárias 1 atingiu os 82% e 52 g/L de etanol, em Erlenmeyer e 78 % de rendimento e 52 g/L em biorreactor (1000 mL 132 g HC /L;) as lamas primárias 2 em biorreactor atingiram 70 % de rendimento e 64 g/L de etanol (2500 mL 166 g HC /L).
- Avaliação da configuração geométrica no biorreactor, diminuição da relação diâmetro da turbina de agitação/diâmetro do reactor mostrou reduzir alguma inibição na formação de produtos secundários.

O presente trabalho atingiu certos objectivos propostos no início, como a manutenção de etanol dos ensaios em Erlenmeyer até biorreactores de bancada, ficam a seguir algumas sugestões de trabalho futuro:

- Estudo do SSF em Fed-Batch, de modo a estudar a melhor forma de reduzir o teor de enzima no SSF.
- Estudar o tempo útil de SSF, para que se possa tentar este processo em contínuo.
- Estudar a presença dos co-produtos formados e respectiva inibição.
- Realizar ensaios com estirpes geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar também as pentoses.



## 6.Referências

- [1] Key Statistics 2015 European pulp & paper industry; Acedido em 23/05/2016 <http://www.cepi.org/system/files/public/documents/publications/statistics/2016/FINALKeyStatistics2015web.pdf>
- [2] Lange, Jean-Paul (2007) “Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry process and economics” *Biofuels, Bioproducts Biorefinery* 1:39-48
- [3] Caraballo, Jose; 2008: Caraballo, Jose; *Biochemical and Thermochemical Pathways for Ethanol Production from Biomass*, Abengoa Bioenergy New Technologies; Valencia, 2nd June 2008.
- [4] United Nations Conference on Trade and Development; 2008: *Biofuel production technologies: status, prospects and implications for trade and development*; United Nations Conference on Trade and Development; New York and Geneva, 2008.
- [5] Dina Bacovsky; Michal, Dallos ; Manfred, Wörgette (2010) ; *Status of 2nd Generation Biofuels Demonstration Facilities in June 2010, A Report To Iea Bioenergy Task 39*; 27 July 2010
- [6] *BP Statistical Review of World Energy June 2016* Acedido a 20/04/2016 <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2016/bp-statistical-review-of-world-energy-2016-full-report.pdf>
- [7] Akhtar, N, Gupta K, Goyal, D, Goyal A. (2015) “Recent advances in pretreatment technologies for efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass” *Wiley Online Library* DOI 10.1002/ep.12257
- [8] Toon ST, Philippidis GP, Ho NYW (1997) “Enhanced cofermentation of glucose and xylose by recombinant *Saccharomyces* yeast strains in batch and continuous operating modes.” *Applied Biochemistry Biotechnology* 63–65:243–255
- [9] Menon V. , Rao Mala (2012) “Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & Biorefinery concept” , *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4):522-550
- [10] Stanley G., Hagerdal-Hahn B. (2010) “Fuel Ethanol from Lignocellulosic Raw materials using recombinant yeasts”, *Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries*, :261 - 291
- [11] Bin Yang, Ziyu Dai, and Shi-You Ding & Charles E Wyman (2011) “Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass” *Biofuels* 4:421-450

- [12] Menezes F. (2013) “Sacarificação e Fermentação Simultâneas de resíduos lignocelulósicos da indústria da pasta e papel para a produção de bioetanol” Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, Universidade de Coimbra.
- [13] Ogeda e Petri (2010) “ Hidrólise Enzimática de Biomassa” Quim. Nova 33 (7):1549-1558
- [14] Irfan , M , Gulsher M. , Abbas S , Syed Q , Nadeem M, Baig S (2001) “ Effect of various pretreatment conditions on enzymatic saccharification “ 33(4): 397-404
- [15] Huang, X. L. and Penner, M.H. (1991) “Apparent substrate inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase system. Journal of Agriculture Food Chem. 39:2096-2100
- [16] Melanie M. Lane, John P. Morrissey (2010) “*Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow “Fungal Biology Reviews Volume 24 Issues 1-2
- [17] Anuj K. Chandel, Silvio Silvério da Silva and Om V. Singh (2011) “Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production” in Biofuel Production-Recent Developments and Prospects. Cap. 10:226-246
- [18] Agbogbo F., Coward-Kelly G.,(2008) “ Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*” Biotechnology Letters 30(9): 1515-1524
- [19] WF, Suzuki S, Takagi M.,( 1976)”Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments.” Volume 3990944. Issue 610731 Edited by: Office USPT. USA, Bio Research Center Company Limited;
- [20] Dahnum D., Tasum S., Abimanyu H. (2015) “Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch” Energy Procedia 68 :107-116
- [21] Den Haan R, Rose, SH, Lynd, LR, van Zyl WH. (2007) “ Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* “ Metab. Eng. 9 (1):87-94
- [22] Lynd LR, Van Zyl WH, McBride, JE, Laser, M. (2005) “Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: An update” Current Opinion in Biotechnology 16 (5) : 577-583
- [23] Mitsunori Y, Kawai (2013) S., “Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds” Bioengineered 4 :224-235.
- [24] Pereira F., Guimarães M.R.P (2010) “Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs” Bioresource Technology 101 :7856-7863

- [25] Wu, Shu, Wei-Shi (2013) “Aspect ratio of biorreactor on fermentative hydrogen production with immobilized sludge” , International Journal of Hydrogen 38(14):6154-6160
- [26] Palomares, L. , Ramirez ,O. (2009) Bioreactor Scale-up Encyclopedia of Industrial Biotechnology
- [27] Ho NWY, Chen Z, Brainard A. (1998) “Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose.” Applied Environmental Microbiology 64:1852 – 1859
- [28] Latif, F. & Rajoka, M.I., 2001. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. Bioresource technology, 77 (1):57– 63
- [29] Lebeau, T., Jouenne, T. & Junter, G., 1997. “Fermentation of D -xylose by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*”. Biotechnology Letters, 19 (7):615 – 618.



---

---

## Anexos

---

---



## **Anexo I- Determinação da composição química dos materiais lenhocelulósicos**

### **i) Humidade/Sólidos Totais**

A determinação da humidade/Sólidos Totais das lamas primárias foi realizada de acordo com o protocolo LAP-001: “Standard Method for determination of total Solids in Biomass”, efetuado pelo laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory – NREL) (NREL – LAP001, 1994).

Coloca-se um pesa-filtros ou uma pequena forma de alumínio a secar numa estufa a 105°C durante cerca de 3 h. Retira-se para um exsiccador e deixa-se arrefecer. Regista-se o seu peso até valor constante.

Pesa-se uma quantidade de amostra do material ( $\approx 5$  g), colocando no pesa-filtros ou forma. Leva-se a secar à estufa a 105 °C durante a noite. Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso até valor constante.

$$\text{Sólidos Totais (\%)} = \frac{[\text{Pesafiltros e Amostra Seca}] - [\text{Pesafiltros}]}{\text{Amostra húmida}} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

$$\text{Humidade (\%)} = \left(1 - \frac{[\text{Pesafiltros e Amostra Seca}] - [\text{Pesafiltros}]}{\text{Amostra húmida}}\right) \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

### **ii) Matéria Inorgânica (Cinzas)**

Coloca-se um cadinho de porcelana numa mufla a 575°C durante cerca de 3 h, retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso até valor constante.

Pesa-se uma quantidade de amostra seca a 105 °C ( $\approx 1$  g) e coloca-se no cadinho de porcelana. Leva-se à mufla para incineração a 575 °C, durante a noite. Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso até valor constante.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{[\text{Cadinho e Cinzas 575°C}] - [\text{Cadinho}]}{\text{Amostra seca 105°C}} \times 100 \quad (\text{equação 6})$$

### Carbonato de cálcio:

Leva-se à mufla o cadinho com as cinzas a 575°C para incineração a 900 °C, durante a noite. Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso até valor constante.

$$\text{CaCO}_3 (\%) = \frac{([\text{Cadinho e Cinzas } 575^\circ\text{C}] - [\text{Cadinho e Cinzas } 900^\circ\text{C}]) \times \frac{100.1}{44.1}}{\text{Amostra seca } 105^\circ\text{C}} \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

A diferença entre as cinzas a 575 °C e as cinzas a 900 °C indica a quantidade de CO<sub>2</sub> libertada. A quantidade de CaCO<sub>3</sub> existente na amostra é determinada de acordo com a relação estequiométrica.

$$\text{CaCO}_3 = \text{CO}_2 \times \frac{100.1}{44.1} \quad (\text{equação 8})$$

### iii) Matéria Orgânica

Determina-se a fracção orgânica presente na amostra através da diferença entre a massa seca pesada inicialmente e a massa de cinzas resultantes da incineração a 575 °C.

$$\text{Matéria Orgânica } (\%) = \frac{\text{Amostra seca } 105^\circ\text{C} - ([\text{Cadinho e Cinzas } 575^\circ\text{C}] - [\text{Cadinho}])}{\text{Amostra seca } 105^\circ\text{C}} \times 100 \quad (\text{equação 9})$$

Ou seja,

$$\text{Matéria Orgânica } (\%) = 100 - \text{Cinzas } 575^\circ\text{C } (\%) \quad (\text{equação 10})$$

### iv) Lenhina Total (Determinação da lenhina total (lenhina solúvel e insolúvel))

A lenhina solúvel e insolúvel presente nas lamas primárias é determinado segundo os protocolos LAP-004: “Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass” e LAP-003: “Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass”, respetivamente. Foram realizados pelo laboratório NREL (NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996).

### Lenhina insolúvel:

- Coloca-se um cadinho filtrante e um filtro de fibra de vidro a secar na estufa a 105 °C durante cerca de 3 h. Retiram-se para um exsiccador, deixam-se arrefecer e registam-se o seu peso até valor constante.
- Coloca-se o filtro no cadinho filtrante num tubo, adicionam-se 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% m/m a cerca de 0.3 g de amostra seca e coloca-se num banho a 30 °C durante 2 h, agitando a cada 15 min.
- Findo o tempo dilui-se com água destilada (84 mL) até perfazer uma concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 4% m/m. Leva-se à autoclave, a uma temperatura de 121 °C durante 60 min.
- Deixa-se arrefecer e filtra-se a vácuo o hidrolisado resultante através do cadinho filtrante com o filtro.
- Reserva-se o sobrenadante e o resíduo sólido retido é lavado com água destilada quente. O cadinho filtrante, juntamente com o resíduo insolúvel, é levado a secar à estufa a 105 °C durante a noite.
- Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso até valor constante.
- Retira-se com cuidado o filtro de fibra juntamente com o resíduo e coloca-se num cadinho de porcelana (previamente pesado depois de levado à mufla a 575 °C durante 3 h). Coloca-se na mufla a 575 °C durante a noite.

Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso até valor constante.

$$\text{Lenhina insolúvel (\%)} = \frac{([\text{Cadinho e Resíduo}] - [\text{Cadinho e Cinzas } 575^{\circ}\text{C}])}{\text{Amostra seca}} \times 100 \quad (\text{equação 11})$$

### Lenhina solúvel:

A lenhina solúvel é determinada através da leitura da absorvância (Abs) da amostra do sobrenadante resultante (previamente diluída se necessário), a um comprimento de onda de 205 nm num espectrofotómetro Vis-UV, usando como branco uma amostra de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 4% m/m.

$$\text{Lenhina solúvel (\%)} = \frac{\frac{\text{Abs}}{110 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \times \text{Factor diluição} \times 0.87 \text{ L}}{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C (g)}} \times 100 \quad (\text{equação 12})$$

$$\text{Lenhina Total (\%)} = \text{Lenhina insolúvel (\%)} + \text{Lenhina Solúvel (\%)} \quad (\text{equação 13})$$

#### v) Hidratos de carbono (Celulose+Hemiceluloses)

Pode seleccionar-se uma de duas vias para a estimativa dos hidratos de carbono:

##### 1. – Cálculo por diferença

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = \text{Matéria Orgânica (\%)} - \text{Lenhina Total (\%)} \quad (\text{equação 14})$$

##### 2. – Cálculo por análise do sobrenadante no HPLC

- Do sobrenadante resultante da hidrólise ácida efectuada na etapa de determinação da lenhina total, retira-se um determinado volume ( $\approx 5-10$  mL) para um copo e procede-se à sua neutralização com carbonato de cálcio até possuir um valor de pH entre 5 e 6.
- Após a sua neutralização, deixa-se repousar um pouco para a sedimentação dos precipitados formados.
- Com a ajuda de uma seringa retira-se um pouco do líquido neutralizado e filtra-se através de um filtro de seringa de membrana ( $0.2 \mu\text{m}$ ) para um tubo de Eppendorf.
- Injecta-se esta amostra no HPLC e registam-se os valores de concentração correspondentes aos picos de glucose e xilose ( $\text{mg/mL}$ ) obtidos no cromatograma. A partir destas concentrações calculam-se as glucanas e as xilanas presentes na amostra.

$$\text{Glucanas (\%)} = \frac{\text{Glucose (g/L)} \times 0.87 \text{ L} \times 0.9}{\text{Amostra seca (g)}} \times 100 \quad (\text{equação 15})$$

$$\text{Xilanas (\%)} = \frac{\text{Xilose (g/L)} \times 0.87 \text{ L} \times 0.88}{\text{Amostra seca (g)}} \times 100 \quad (\text{equação 16})$$

## Anexo II -Actividade enzimática

A determinação da atividade enzimática dos extratos enzimáticos basearam-se no protocolo LAP-006: “Measurement of Cellulase Activities” (NREL-LAP 006,1996).

Preparam-se várias soluções diluídas da solução das enzimas seleccionadas. A diluição da solução original é efectuada com tampão citrato 0.05 M. Tem-se assim diferentes concentrações volumétricas (mL enzima/mL amostra diluída) de solução de enzima.

- Adicionam-se 0.5 mL de cada concentração enzimática preparada a 1 mL de tampão citrato 0.05 M num tubo de ensaio.
- Estabiliza-se a mistura a 50 °C, adiciona-se uma tira de papel de filtro (1.0 × 6.0 cm ≈ 50 mg) e incuba-se a 50 °C durante 60 min (a determinação pode ser efectuada para outras temperaturas).
- Findo este tempo, adiciona-se 3.0 mL de reagente DNS e coloca-se num banho a ferver, durante 5 min. Arrefece-se num banho de água gelada. Pipeta-se 0.2 mL de amostra para uma cuvete e adicionam-se 2.5 mL de água destilada.
- Efectua-se a leitura da absorvância a 540 nm contra um branco de tampão citrato. Determina-se a concentração de açúcares redutores em equivalentes de glucose presentes na amostra, através de uma curva de calibração anteriormente preparada com soluções de glucose de concentração conhecida.
- Identificaram-se quais as duas concentrações de enzima que levaram à libertação de um pouco mais de 2 mg e de um pouco menos de 2 mg de glucose. Efectua-se uma interpolação dos dois pontos para determinar a concentração de enzima que liberta 2 mg de glucose. A partir da concentração determinada obtém-se a actividade de celulase por mL de enzima.

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{concentração de enzima que liberta 2 mg de glucose}} \text{U/mL enzima} \quad (\text{equação 17})$$

### Cálculo exemplificativo:

Determinação da actividade enzimática de uma celulase a 38 °C:

**Tabela 21** – Dados da recta de calibração da actividade enzimática

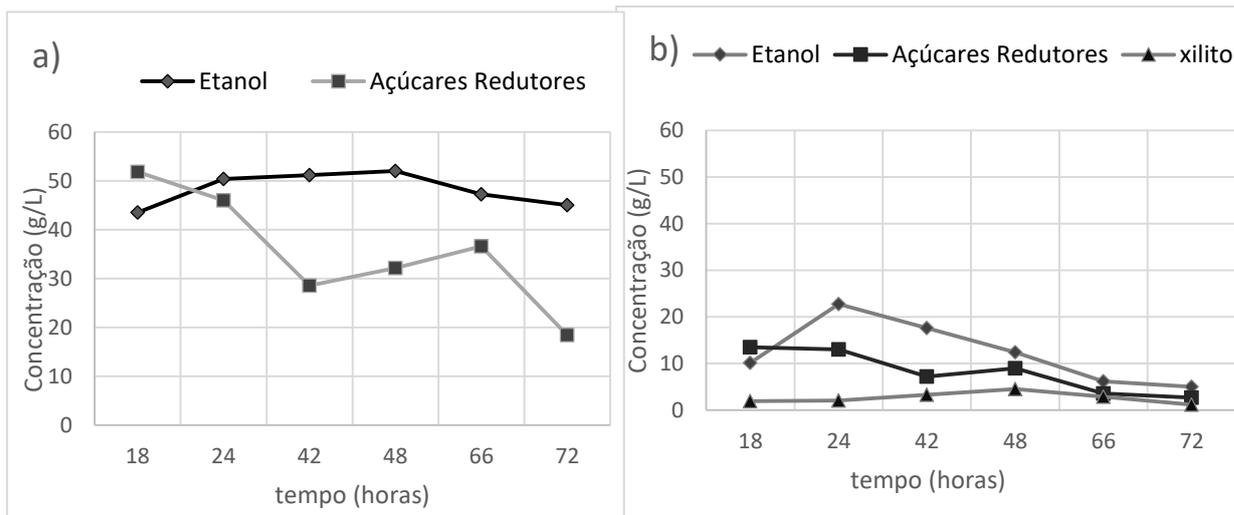
Diluição feita	“ [Enzima] mL enzima/mL solução”	Quantidade de glucose libertada (mg)
1:201	0,0049751	2,24
1:251	0,0039841	1,64

$$[\text{Enzima}] = 0.0017 \times 2 + 0.0013 = 0.0047 \text{ mL enz/mL solução} \quad (\text{equação 18})$$

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{0.0047} = 78,7 \text{ U/mL enzima} \quad (\text{equação 19})$$

### Anexo III – Efeito do regime *Fed-batch*

O estudo do regime *fed-batch*, foi realizado em dois ensaios representados no ensaio a) batch e no ensaio b) fed-batch, ambos trataram 520 g de lp1 a alimentação arrancou com 250g + 135g (24h) +135g (42h). No entanto os resultados foram inconclusivos devido a algum contratempo experimental.



**Figura 19-** Evolução da concentração de etanol nos dois regimes distintos estudados com concentrações de HC semelhantes a) Batch b) Fed-Batch.



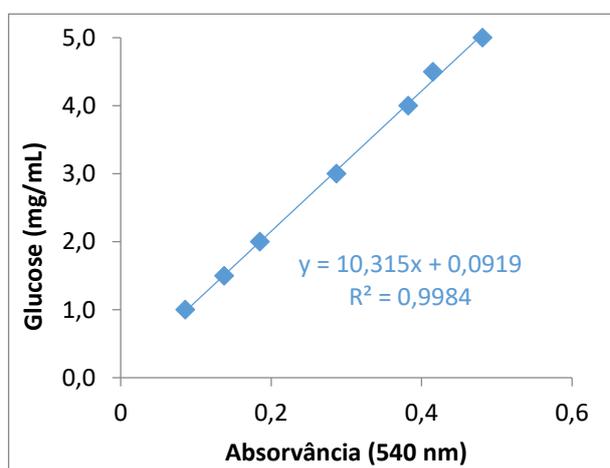
## Anexo IV Método DNS de açúcares redutores

- Adicionam-se 0.5 mL da amostra de solução enzimática (diluída, se necessário), 1 mL de solução tampão citrato 0,05 M e 3 mL de reagente DNS modificado.
- A mistura é colocada num banho de água a ferver por 5 minutos, seguido de arrefecimento num banho de água com gelo por 5 minutos.
- Após o arrefecimento, pipeta-se 0,2 mL da mistura para uma cuvete e adiciona-se 2,5 mL de água destilada. A absorvância da mistura é medida no espectrofotómetro UV-Vis num comprimento de onda de 540 nm, contra um branco de solução tampão citrato 0,05 M que sofreu o mesmo tratamento das amostras.
- A quantidade dos açúcares redutores existente é determinada em equivalentes de glucose através da aplicação da equação da curva de calibração do DNS modificado, que relaciona absorvância com concentração de glucose, para soluções padrão de concentração conhecida.

### Curva de calibração

A curva de calibração é obtida a partir da preparação de soluções conhecidas de glucose, entre 0.1 mg/ml e 5.0 mg/ml, que depois sofrem o tratamento anteriormente descrito.

Exemplo de curva de calibração:

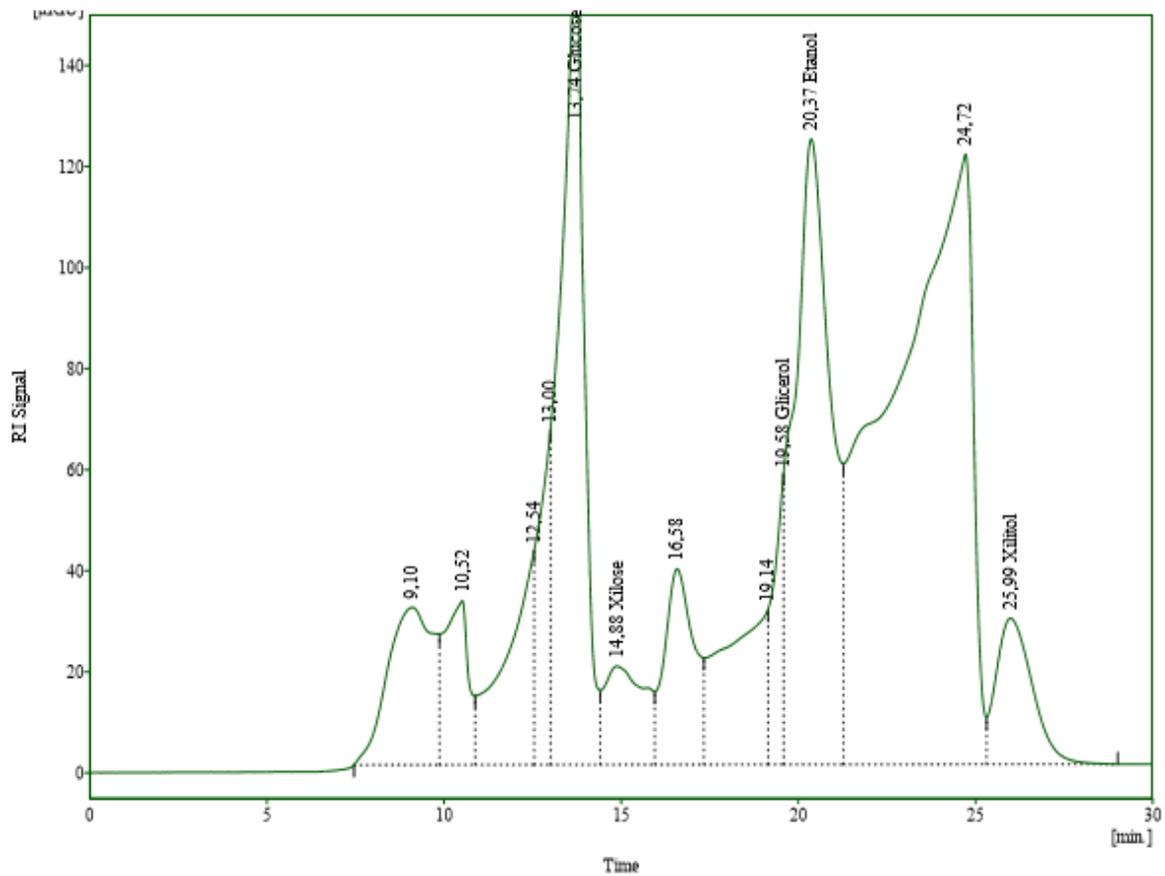


**Figura 20-** Recta de calibração do método dos açúcares redutores



## Anexo V- Ilustração de cromatograma

Na figura 22, está uma ilustração de um cromatograma, na qual é possível observar um pico entre o etanol e o xilitol, aproximadamente aos 24 minutos.



**Figura 21** – Ilustração de um cromatograma (eixo yy- RI Signal [ $\mu$ RIU], eixo xx- tempo [min]).