



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Sidnei Emilio Bordignon Jr.

**Bioprocesso de produção de etanol celulósico via tratamento com
ozônio e hidrotérmico**

São José do Rio Preto
2017

Sidnei Emilio Bordignon Jr.

**Bioprocesso de produção de etanol celulósico via tratamento com
ozônio e hidrotérmico**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Capes

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo de Aquino
Ximenes

São José do Rio Preto
2017

Bordignon Júnior, Sidnei Emilio.

Bioprocesso de produção de etanol celulósico via tratamento com ozônio e hidrotérmico / Sidnei Emilio Bordignon Jr. -- São José do Rio Preto, 2017

186 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Roberto da Silva

Coorientador: Eduardo de Aquino Ximenes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Biocombustíveis. 3. Etanol – Indústria.
4. Enzimas - Aplicações industriais. 5. Fermentação. 6. Hidrólise.
7. Bagaço de cana. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 620.91

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Sidnei Emilio Bordignon Jr.

**Bioprocesso de produção de etanol celulósico via tratamento com
ozônio e hidrotérmico**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Capes

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva (orientador)
UNESP – São José do Rio Preto, SP

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto, SP

Prof. Dr. Michel Brienzo
UNESP – Rio Claro, SP

Prof^a. Dr^a. Sarita Candida Rabelo
CNPEN/CTBE – Campinas, SP

Prof. Dr. Maurício Boscolo
UNESP – São José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
23 de fevereiro de 2017

*É na educação dos filhos que se revelam as virtudes
dos pais.* (Coelho Neto)

Dedico e compartilho este título àqueles que alicerçaram a construção desta conquista e sempre apoiaram os sonhos ao longo do caminho. Com amor e gratidão, Sra. Mariluci e Sr. Sidnei Bordignon.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos Mestres que me instruíram ao longo do curso de doutorado, em especial, ao Dr. Roberto da Silva, que me acolheu na função de orientador, dividindo seu conhecimento e me aconselhando para a formação do meu caráter profissional. Em especial, também sou grato ao Dr. Eduardo Ximenes pela recepção e sábias orientações durante o período de intercâmbio. Aos demais professores que colaboraram na formação em sala de aula, ou na discussão de ideias e resultados, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço carinhosamente aos meus familiares e pessoas amadas que, pelos bastidores, sempre apoiaram e motivaram a realização deste trabalho, sendo especialmente valiosos nos momentos de maior dificuldade emocional como um refúgio e fortaleza incomparáveis, em especial, à Maria Heloisa pela paciência e amor.

Agradeço especialmente àqueles que colaboraram diretamente com o desenvolvimento de alguns experimentos ou de ensaios analíticos, em nome dos colegas: Márcio Laranja, Olavo Perrone, Josiani Pereira, Haley Roos, Christianne Nunes, Daehwan Kim e Deise Lima.

Agradeço aos queridos amigos, colegas de curso e companheiros de laboratórios do Ibilce/Unesp, do Lorre/Purdue e do Ctbe/Cnpem que dividiram comigo suas aspirações & conquistas, suas metas & frustrações, seus cafés & almoços, a bancadas, uma carona, algum equipamento, uma viagem, seu conhecimento, enfim... Estou convicto de que cada pessoa que passa em nossa vida nos deixa um pouco de si e leva um pouco de nós, por isso estamos fadados a sermos o produto das experiências e dos convívios que nos permitimos ter ao longo do caminho. Obrigado pelas suas companhias.

Agradeço ainda às instituições de ensino e pesquisa que me receberam e permitiram o desenvolvimento deste trabalho, oferecendo a sua estrutura física e o seu pessoal técnico. Sou grato ao Ministério da Educação do Brasil que, através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (Capes), financiou este trabalho e o intercâmbio internacional.

Com carinho, deixo registrado aqui meu agradecimento a cada um que, de alguma maneira, acompanhou e/ou participou deste trabalho:

Adelayda Siria	Gisele Nunes Rodrigues	Marina Moro
Alex Antonio dos Santos	Guilherme Lorencini	Maurício Boscolo, Dr.
Amanda Kreger	Haley Roos	Michael Ladisch, Dr.
Ana Carolina Santos	Iasnaia Tavares	Natália Righetti
Ana Lúcia Ferrarezi	Iman Beheshti	Neal Hengge
Ana Paula F. Morais	Irene R. Freitas	Neuza Jorge, Dr ^a .
Antonio C. F. Santos	Isabel Zapparoli	Natália S. Janzantti, Dr ^a .
Ariane Zanchetta	Janaína Pires	Olavo Micali Perrone
Carla S. Carie	Jaqueline Bordignon	Pedro Lucas
Carolina Bezerra	Jinsha Li	Priscila Atique
Carolina Perez Henao	João Cláudio Thomeo, Dr.	Priscila Delabona, Dr ^a .
Christianne C. Nunes	José Geraldo Pradella, Dr.	Rafael Dominguez
Daniela Oliveira Lisboa	Josiani de Cássia Pereira	Rafael Pedroza Nogueira
Daehwan Kim	Julia Burchell	Rafaela Ladeira
David Orrego	Juliana Ferreira	Rafaela Rodrigues
Deise Juliana Lima	Juliana Foltin	Raissa Déli de Oliveira
Diego Monteiro	Lady Rosana Palomino	Renata Bittencourt
Eduardo Ximenes, Dr.	Leititia de Nagornoff	Roberto da Silva, Dr.
Eleni Gomes, Dr ^a .	Leyu Zhang	Robson Diaz
Erick Galindo	Luciene Mendes da Silva	Rosana Maia
Érik Morais	Luis Fernando Rangel	Rosemar R. C. Brena
Fabício Mendes	Maitê Bernardo	Sarita Rabelo, Dr ^a .
Fernanda Cordeiro	Manish Nepal	Silvia Emiko
Fernando Barbosa	Márcia Moretti	Studie Red Corn
Flávia Cutrim	Márcio Justi Laranja	Tommy Kreke
Geizecler Tomazetto	Maria Cecília Maia	Vanildo L. Del Bianchi, Dr.
Geraldo Cesar Zambrzycki	Maria Heloisa D. Batista	Victor Novaes Rufino
Gisele Martins	M. Aparecida Mauro, Dr ^a .	Xingya Liu (Linda)

RESUMO

A necessidade de mitigação dos efeitos adversos resultantes da industrialização nos últimos três séculos é evidente e representa hoje um dos maiores desafios para a continuidade do desenvolvimento econômico sustentável. A produção de biocombustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos opõe-se ao modelo extrativista de recursos fósseis e oferece uma alternativa de energia limpa e renovável para os combustíveis líquidos. Esta tese apresenta uma proposta de produção de etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar utilizando uma combinação dos pré-tratamentos ozonólise e hidrotérmico. O bagaço gerado apresentou propriedades químicas e estruturais favoráveis à hidrólise enzimática e fermentação alcoólica requeridas para a síntese de etanol por rota bioquímica. Os efeitos de deslignificação e solubilização da hemicelulose foram potencializados pela combinação de ozonólise ao pré-tratamento hidrotérmico, gerando uma biomassa com baixa quantidade de hemicelulose residual (4%), porcentagem mediana de lignina (14%) e enriquecida com até 80% de celulose de fácil digestibilidade por enzimas comerciais celulolíticas, acumulando mais de 50 g L^{-1} de glicose a partir de 100 g L^{-1} de bagaço, ou seja, com rendimento de cerca de 67% de conversão de glucana. O meio de cultivo hidrolisado foi fermentescível por leveduras industriais *Saccharomyces cerevisiae* com eficiência de fermentação superior a 90%. A combinação dos pré-tratamentos sobre o bagaço gerou um licor rico em xilose como subproduto e que pode ser utilizado como substrato para o cultivo de leveduras e fungos filamentosos no desenvolvimento de processos paralelos.

Palavras-chave: Bioenergia. Etanol. Bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação. Hidrólise. Enzima. Renovável. Bioprocesso.

ABSTRACT

*Mitigation of negative effects accumulated from industrialization in the last three centuries is nowadays demanded and it is one of the biggest challenges to support a sustainable economic development. Production of biofuels from lignocellulosic residues opposes to the traditional extractive model from fossil sources and it offers an alternative of clean and renewable liquid fuels. This thesis shows a proposal for production of second-generation ethanol from sugarcane bagasse by combining ozonolysis and hydrothermal pretreatments. The pretreated bagasse showed chemical and structural properties favorable to enzymatic hydrolysis and suitable for alcoholic fermentation required for the synthesis of ethanol by biochemical route. Effects on delignification and hemicellulose solubilization were potentiated by the combination of ozonolysis to hydrothermal process, generating a biomass with a low amount of residual hemicellulose (4%), medium composition of lignin (14%), and enriched to 80% of cellulose of high digestibility by commercial cellulolytic enzymes, reaching more than 50 g L⁻¹ of glucose from 100 g L⁻¹ of pretreated bagasse. It achieved around 67% of glucan conversion yield. The hydrolysate medium was fermentable by industrial yeasts *Saccharomyces cerevisiae* with fermentation efficiency up to 90%. The combination of pretreatments also generated a xylose-rich by-product (liquor), which was compatible with C5-yeasts and filamentous fungi cultivation as a substrate for putative side processes.*

Keywords: Bioenergy. Ethanol. Sugarcane bagasse. Fermentation. Hydrolysis. Enzyme. Renewable. Bioprocess.

LISTA DE EQUAÇÕES

Capítulo 2: Pré-tratamentos e caracterização das biomassas

Equação 1. Medida da concentração de ozônio.....	86
--	----

Capítulo 3: Sacarificação e fermentação alcoólica de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol

Equação 1. Conversão da hidrólise enzimática.	132
Equação 2. Taxa de produtividade de etanol.	134
Equação 3. Rendimento de conversão.	134
Equação 4. Eficiência da fermentação.....	135

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Overview about Pretreatment, Hydrolysis, Fermentation and Co-products

Figure 1. Employment frequency of pretreatments in sugarcane bagasse from 2005 to 2015.	31
Figure 2. Multiple enzymatic actions into lignocellulosic biomass.	34
Figure 3. Prospecting profile of new cellulolytic microorganisms.	36
Figure 4. Employment frequency of microorganisms in fermentation of hydrolysate sugarcane bagasse.	39
Figure 5. The most common biological activities reported to recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains.	40
Figure 6. Microorganisms employed in pentose fermentation from lignocellulosic hydrolysate.	42
Figure 7. Metabolic pathways of xylose, arabinose, and glucose assimilation.	43
Figure 8. Technological routes proposed to cellulosic ethanol production.	50
Figure 9. Main compounds studied for the implementation of bio-refinery integrated to cellulosic ethanol process.	53

Capítulo 2: Pré-tratamentos e caracterização das biomassas

Figura 1. Representação do bagaço de cana-de-açúcar como recebido (A) e padronizado por trituração (B).	83
Figura 2. Representação esquemática das estratégias de pré-tratamento e operações de downstream realizadas para bagaço de cana-de-açúcar.	84
Figura 3. Representação de bagaço de cana-de-açúcar empacotado não-tratado (coluna inferior) e tratado por ozonólise (coluna inferior) em colunas de pré-tratamento.	86

Figura 4. Banho de areia fluidizado para pré-tratamento hidrotérmico (à esquerda); procedimento de separação dos sólidos e licor após o pré-tratamento hidrotérmico (à direita).....	87
Figura 5. Ilustração do material após os pré-tratamentos: (A) bagaço ozonizado; (B) bagaço hidrotérmico; (C) bagaço OHT (combinando ozonólise e hidrotérmico).	92
Figura 6. Mecanismos de ação direta do ozônio sobre fragmentos de lignina.	95
Figura 7. Fluxograma de operações do processo THAO para obtenção de etanol celulósico.	100
Figura 8. Solubilização de compostos fenólicos totais a partir das diferentes estratégias de pré-tratamento estudadas.	101
Figura 9. Remoção de compostos fenólicos totais solúveis por lavagem para bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT.	102
Figura 10. Espectro FTIR-ATR de bagaço ozonizado em comparação ao bagaço não-tratado (controle).	105
Figura 11. Espectro FTIR-ATR de bagaço hidrotérmico em comparação ao bagaço não-tratado (controle).	106
Figura 12. Espectro FTIR-ATR de bagaço OHT em comparação ao bagaço não-tratado (controle).	107
Figura 13. Espectros de FTIR-ATR na região do <i>fingerprint</i> para bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT em comparação ao controle.	108
Figura 14. Difratomogramas de Raio-X e índices de cristalinidade em bagaço ozonizado, hidrotérmico (LHW) e OHT em comparação ao controle (<i>in natura</i>).	110
Figura 15. Eletromicrografias (MEV) de bagaço não-tratado com lentes de 400x, 1000x e 2000x.	112
Figura 16. Eletromicrografias (MEV) de bagaço ozonizado com lentes de 400x, 1000x e 2000x.	112
Figura 17. Eletromicrografias (MEV) de bagaço hidrotérmico com lentes de 400x, 1000x e 2000x.	113
Figura 18. Eletromicrografias (MEV) de bagaço OHT com lentes de 400x, 1000x e 2000x.	113

Capítulo 3: Sacarificação e fermentação alcoólica de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol

Figura 1. Esquema de pré-tratamentos empregados em bagaço de cana-de-açúcar destinado à hidrólise enzimática.....	128
Figura 2. Ilustração do conteúdo de bagaço com tampão antes da hidrólise enzimática.	131
Figura 3. Ilustração do procedimento de preparo de inóculo para a fermentação alcoólica.....	133
Figura 4. Cinética de hidrólise enzimática baseada no rendimento de conversão de glicose usando Cellic CTEC2 e HTEC2 (<i>total de 9 mg de proteína /g glucana</i>).....	138
Figura 5. Relação entre composição química de carboidratos estruturais e lignina com a conversão de celulose a glicose em bagaço de cana-de-açúcar.....	139
Figura 6. Influência do licor do pré-tratamento na conversão de bagaço OHT e celulose comercial Solka Floc® durante hidrólise enzimática de 96 h com Cellic CTEC2 e HTEC2 (<i>9 mg proteína / g glucana</i>).....	143
Figura 7. Relação entre lavagem de bagaço e conversão de celulose a glicose em hidrólise enzimática de 72 horas utilizando Cellic CTEC2 e HTEC2 (<i>11 mg proteína /g glucana</i>).	144
Figura 8. Eletromicrografias (MEV) de bagaço pré-tratado com lente de 1000x.	145
Figura 9. Sacarificação de bagaço OHT submetido a lavagem simples e extrativa seguida de hidrólise em diferentes concentrações enzimáticas de Cellic CTEC2 e HTEC2 em 96 horas.	148
Figura 10. Conversão de sacarificação de bagaço OHT a partir de ozonólise em meio ácido e alcalino em hidrólise enzimática com Cellic CTEC2 e HTEC2 (<i>9 mg proteína /g glucana</i>) em 72 horas.	150
Figura 11. Composição dos licores resultante dos pré-tratamento combinado (ozonólise com hidrotérmico) em diferentes condições ácidas e alcalinas para obtenção de bagaço OHT.	153
Figura 12. Cultivo comparativo de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> industriais em meio sintético de sacarose e meio natural de hidrolisado de bagaço ozonizado.	155

Figura 13. Cinética de fermentação alcoólica da levedura JP-1 em meio hidrolisado de bagaço ozonizado.	156
Figura 14. Cinética de fermentação alcoólica da levedura CAT-1 e PE-2 em meio hidrolisado de bagaço ozonizado.....	157
Figura 15. Cinética de fermentação alcoólica em meio hidrolisado de bagaço ozonizado para leveduras JP-1 e Y-150.....	160
Figura 16. Cinética de fermentação alcoólica em meio hidrolisado de bagaço hidrotérmico para leveduras JP-1 e Y-150.	161
Figura 17. Cinética de fermentação alcoólica em meio hidrolisado de bagaço OHT para leveduras JP-1 e Y-150.....	161

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Overview about Pretreatment, Hydrolysis, Fermentation and Co-products

Table 1. Characteristics of promising pretreatments proposed for sugarcane bagasse. . 31

Table 2. Main compounds from lignocelluloses with inhibitory action against *Saccharomyces cerevisiae*. 46

Capítulo 2: Pré-tratamentos e caracterização das biomassas

Tabela 1. Índices de rendimento em cada pré-tratamento em bagaço de cana-de-açúcar. 93

Tabela 2. Análise de composição química para amostras de bagaço de cana-de-açúcar gerados por diferentes estratégias de pré-tratamento e amostra não-tratada. 93

Tabela 3. Quadro comparativo do índice de deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar obtido por diferentes autores utilizando pré-tratamento por ozonólise. 97

Tabela 4. Sinais de vibração em infravermelho típicos para bagaço de cana-de-açúcar. 104

Capítulo 3: Sacarificação e fermentação alcoólica de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol

Tabela 1. Cinética de hidrólise enzimática baseada na liberação de glicose usando Cellic CTEC2 e HTEC2 (*total de 9 mg de proteína /g glucana*). 137

Tabela 2. Composição química dos inibidores presentes em licor resultante do processo de pré-tratamento combinado de ozonólise e hidrotérmico. 141

Tabela 3. Conversão de celulose a glicose obtidos na sacarificação de bagaço OHT lavado por lavagem simples e extrativa. 147

Tabela 4. Concentrações de glicose obtidas pela sacarificação do bagaço OHT a partir de ozonólise em meio ácido e alcalino submetido à hidrólise enzimática com Cellic CTEC2 e HTEC2 (*9 mg proteína /g glucana*) em 72 horas. 149

Tabela 5. Resumo de indicadores da fermentação alcoólica de hidrolisado de bagaço ozonizado por leveduras industriais.	158
Tabela 6. Composição química de meios hidrolisados obtidos dos diferentes pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar.	159
Tabela 7. Resumo de indicadores da fermentação alcoólica dos três meios hidrolisado de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT pelas leveduras JP-1 e Y-150.	162
Tabela 8. Balanço de massas para processo THAO.	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX – *ammonium fiber expansion*
CBH – celobiohidrolase / *cellobiohydrolase*
CBM – *carbohydrate binding module*
CBP – *consolidated bioprocess*
CFT – compostos fenólicos totais
DNS - *dinitrosalicylic acid*
EAG – equivalente de ácido gálico
EC – *Enzyme comittee*
ENG – endoglucanase
FTIR-ATR - *Fourier transform infrared spectroscopy - Attenuated total reflection*
GH – *glucan hydrolase*
HMF – hidroximetilfurfural / *hydroxymethylfurfural*
Icr – índice de cristalinidade
LHW – *liquid hot water*
MEV – microscopia eletrônica de varredura
OHT – denominação para bagaço pré-tratado por ozonólise e hidrotérmico combinados
PDA – *potato dextrose agar*
PMO – *polyssacharide monooxygenase*
Rpm – rotações por minuto
SHF – *separated saccharification and fermentation*
SSCF – *simultaneous saccharification and co-fermentation*
SSF – *simultaneous saccharification and fermentation*
STEX – *steam explosion*
THAO – Tratamento Hidrotérmico Acidificado por Ozônio
WO – *wet oxidation*
XOS – xilo oligossacarídeos / *xylooligossacharides*
YEPX – *yeast extract peptone xylose*
YEPXAD – *yeast extract peptone xylose arabinose dextrose*
YM – *yeast malt*

SUMÁRIO

Introdução Geral	19
Objetivos.....	21
Objetivo Geral.....	21
Objetivos Específicos	22
Estrutura da Tese	23
Capítulo 1: Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Overview about Pretreatment, Hydrolysis, Fermentation and Co-products.....	24
<i>ABSTRACT</i>	25
1. Introduction	26
2. Lignocellulosic biomass: sugarcane bagasse composition.....	27
3. Applied pretreatments to lignocellulosic biomass.....	28
4. Enzymatic hydrolysis of biomass	33
5. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates.....	37
5.1. Hexose fermentation	38
5.2. Pentose fermentation	41
5.3. Limitations in alcoholic fermentation of hydrolysates.....	45
6. Technological routes to cellulosic ethanol	48
7. Biorefinery and biomass fractionation	52
8. Final considerations and perspectives	54
References.....	56
Capítulo 2: Pré-tratamentos e caracterização das biomassas	77
RESUMO.....	78
<i>ABSTRACT</i>	79
1. Introdução.....	80
2. Materiais e Métodos	83
2.1. Materiais.....	83
2.2. Métodos.....	84
2.2.1 Estratégias de pré-tratamento para bagaço de cana-de-açúcar	84

2.2.2.	Pré-tratamento de bagaço por ozonólise.....	85
2.2.3	Pré-tratamento de bagaço por tratamento hidrotérmico	86
2.2.4.	Procedimentos de lavagem de bagaço	88
2.2.5.	Caracterização química de biomassa	88
2.2.6.	Caracterização estrutural de biomassa.....	89
3.	Resultados & Discussão	91
3.1.	Respostas dos pré-tratamentos e caracterização química das biomassas.....	91
3.1.1.	Deslignificação	94
3.1.2.	Solubilização das hemiceluloses	97
3.1.3.	Solubilização de compostos fenólicos totais	100
3.2.	Caracterização estrutural por FTIR-ATR	103
3.3.	Caracterização estrutural por difração em raio-X.....	109
3.4.	Caracterização estrutural por microscopia eletrônica de varredura.....	110
4.	Conclusões.....	114
	Referências.....	115
Capítulo 3: Sacarificação e fermentação alcoólica de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol		121
	RESUMO.....	122
	ABSTRACT.....	123
1.	Introdução.....	124
2.	Materiais e Métodos	127
2.1.	Materiais.....	127
2.2.	Métodos.....	128
2.2.1.	Pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar.....	128
2.2.2.	Procedimentos de lavagem de bagaço pré-tratado	130
2.2.3.	Experimentos de hidrólise enzimática	130
2.2.4.	Experimentos de fermentação alcoólica	132
2.2.5.	Ensaio analítico	135
3.	Resultados & Discussão	137
3.1.	Conversão enzimática para bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT	137
3.2.	Efeito da lavagem do bagaço pré-tratado na conversão enzimática.....	143

3.3.	Lavagem e conversão enzimática do bagaço OHT	146
3.4.	Conversão enzimática do bagaço OHT a partir de ozonólise em meio ácido e alcalino	148
3.5.	Cultivo de leveduras em meio hidrolisado de bagaço ozonizado	154
3.6.	Fermentação alcoólica de hidrolisados de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT	158
3.7.	O processo global	163
4.	Conclusões.....	165
	Referências.....	166
Anexos: Dados suplementares de utilização biológica do licor de pré-tratamento		
		170
	Apresentação.....	171
	Anexo 1 – Cultivo de leveduras em licor.....	172
	Anexo 2 – Cultivo de fungos filamentosos em licor.....	179

Introdução Geral

O conceito de energia é amplamente reconhecido como a capacidade de realizar trabalho e, portanto, está envolvido no desenvolvimento de inúmeras funções, garantindo desde a realização de atividades metabólicas em nível celular, até a execução de atividades econômicas e industriais em nível global. São diferentes formas de energia que compartilham da mesma singularidade: são essenciais para as atividades às quais se relacionam! Na sociedade, não necessariamente na biologia, essa importância determina uma relação de poder, que se materializa na forma de controle e, conseqüentemente, estabelece o domínio energético. Ao longo da história, este domínio tem sido restrito a poucas nações que, devido ao uso de um modelo energético extrativo baseado no petróleo, limita geograficamente a distribuição do poder. Tal modelo, atualmente desgastado e impopular, sobrevive pela conveniência de um mercado bem estabelecido, de relações institucionais robustas, e pela falta de concorrência. Parece caber à ciência o papel de liderar e conduzir a novos tempos uma sociedade mais racional, que preza pela produção sustentável de energia e pela pulverização do poder, permitindo a soberania energética das nações.

A produção científica na área de bioenergia foi intensamente impulsionada em 2005, com notório incremento no número de publicações científicas anuais, que continuam a crescer exponencialmente até a atualidade, chegando a mais de 6.000 artigos por ano¹. As maiores contribuições absolutas são da China (16%) e dos Estados Unidos da América (15%) sobre a produção científica global, enquanto o Brasil responde por apenas 4%. Por outro lado, o Brasil detém a maior produção relativa de artigos na área de bioenergia, sendo 6,5 de cada 1.000 publicações. Neste ponto, se nota intensa dedicação dos pesquisadores nacionais na busca por soluções para a produção de energia sustentável na última década, especialmente no desenvolvimento do bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, já que este é o substrato de baixo custo de maior oferta no país. A especialização da pesquisa nacional em bioenergia parece atender a uma vocação natural, mas é também fruto de incentivos governamentais. De maneira geral, há uma relação

direta entre a produção de conhecimento científico e tecnológico e o estabelecimento de políticas públicas favoráveis às energias renováveis, que por sua vez oscilam conforme aspectos econômicos em nível nacional e global.

Em uma recente perspectiva, originada pelo aumento da oferta de derivados do petróleo pelos processos de fratura hidráulica (*hydrofracking*) na América do Norte, os investimentos em projetos de pesquisa em bioenergia ao redor do globo têm reduzido. Este novo cenário, sensivelmente diferente dos últimos 10 anos, exige dos pesquisadores propostas mais ousadas e de elevada eficiência, produtividade e inovação capazes de consolidar o uso dos recursos renováveis em processos bioquímicos como uma opção economicamente viável e, conseqüentemente, levar a uma revolução tecnológica com novas tendências de mercado. Dados recentes demonstraram que iniciativas estabelecidas na produção industrial para a redução dos gases de efeito estufa não estão associadas à redução da atividade econômica². Ao contrário, hoje vislumbra-se o desenvolvimento de uma grande cadeia de produtos e serviços originados a partir de plataformas verdes, capazes de potencializar o uso da biomassa por disponibilizar bioprodutos de alto valor agregado e bioenergia simultaneamente. Estes novos sistemas industriais emergentes são definidos como biorefinarias, ou biofábricas, e devem atender aos objetivos econômicos, ambientais e sociais para se estabelecer de maneira sustentável e duradoura³.

Dessa maneira, há um vasto campo profissional no desenvolvimento de tecnologias comerciais que vão de encontro aos anseios da sociedade em termos de produção de energia limpa e sustentável, trazendo impactos positivos de melhoria da qualidade de vida, conforto, segurança e desenvolvimento em longo prazo através da pesquisa científica. Neste sentido, a vanguarda do desenvolvimento tecnológico e da soberania nacional da ciência brasileira encontra, possivelmente, seu maior potencial no beneficiamento de resíduos agroindustriais pela biotecnologia.

¹Azadi, P., Malina, R., Barrett, S.R.H., Kraft, M., 2016. The evolution of the biofuel science. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 0–1. (*in press*)

²Obama, B., 2017. The irreversible momentum of clean energy. *Science* (80-.). 6284.

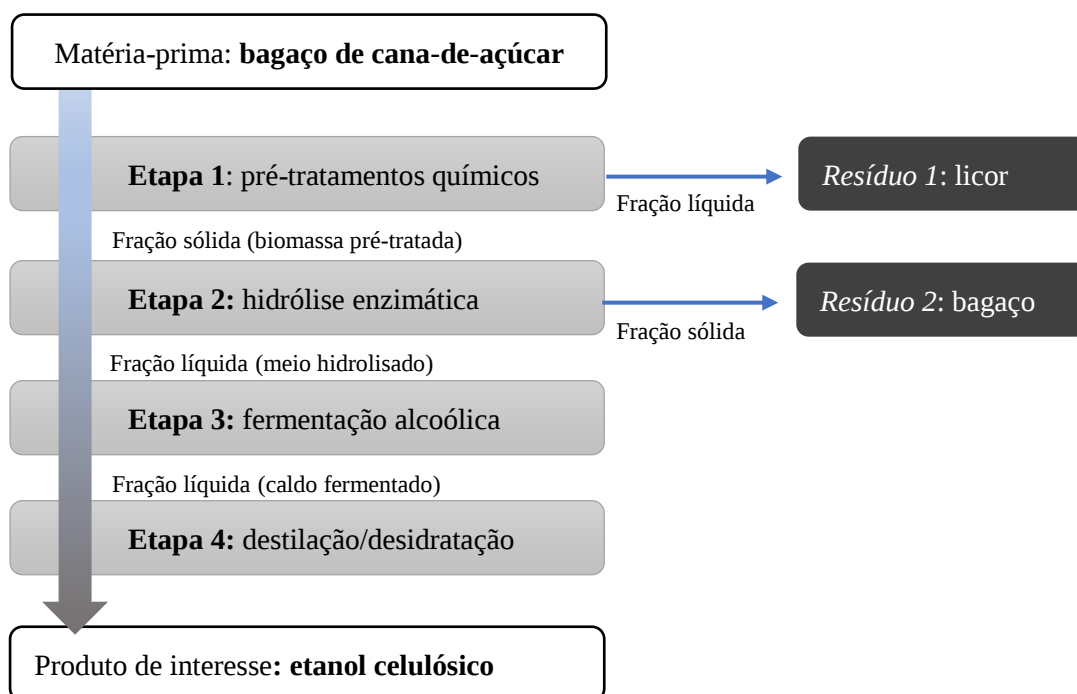
³Budzianowski, W.M., 2016. High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* (*in press*)

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar empregando duas técnicas de pré-tratamento, que incluem a ozonólise e o processo hidrotérmico, além de enzimas celulolíticas comerciais e três diferentes linhagens de leveduras industriais para estabelecer condições operacionais compatíveis para um processamento em nível laboratorial que contemple tanto a obtenção do produto de interesse, quanto o aproveitamento dos subprodutos gerados neste processo, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma apresentando a visão geral do projeto incluindo as etapas operacionais com seus produtos e resíduos.



Fonte: elaborador pelo autor.

Objetivos Específicos

A seguir estão apresentados os principais passos requeridos para o desenvolvimento do projeto e para o alcance do objetivo principal:

- Avaliar as etapas de pré-tratamento por ozonólise e hidrotérmico de maneira individual e combinada como estratégias para aumentar a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar submetido à hidrólise enzimática;
- Determinar as alterações químicas e estruturais promovidas por cada técnica de pré-tratamento de modo a caracterizar as biomassas pré-tratadas;
- Promover a hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas empregando enzimas celulolíticas comerciais em condições de interesse industrial, que incluem baixa carga enzimática e elevado teor de sólidos totais em suspensão;
- Atestar a fermentabilidade de cada meio hidrolisado gerado a partir dos bagaços ozonizado, hidrotérmico e combinado frente à levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Determinar a linhagem de levedura industrial mais bem adaptada fisiologicamente aos meios de cultivo hidrolisado de bagaço ozonizado e hidrotérmico;
- Analisar a formação de inibidores em cada técnica de pré-tratamento e realizar procedimentos de remoção de subprodutos dos bagaços pré-tratados por lavagem;
- Avaliar a utilidade biológica do licor de pré-tratamento para o cultivo microbiano de leveduras e fungos filamentosos.

Estrutura da Tese

A tese está organizada em 3 capítulos e dados suplementares organizados a partir da seguinte estrutura:

1. O **Capítulo 1** foi idealizado como uma publicação no formato de revisão da literatura buscando caracterizar a temática de produção de bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar em uma abordagem ampla que contemplasse todas as etapas do processo produtivo em questão, tal qual se desenvolveu este trabalho de doutorado. Neste conteúdo estão reunidos dados de um levantamento bibliográfico de artigos científicos sumarizados através de figuras originais e apontamentos descritos em língua inglesa. A autoria do capítulo 1 é compartilhada com os colegas: Dr^a. Priscila Atique, Dr^a. Gisele Martins e Msc. Olavo Perrone.
2. O **Capítulo 2** contempla o desenvolvimento dos pré-tratamentos e as análises de caracterização das biomassas de bagaço de cana-de-açúcar. Ozonólise e tratamento hidrotérmico foram as técnicas escolhidas para aumentar a digestibilidade do substrato e prepará-lo para o procedimento de hidrólise posterior. O foco deste capítulo concentra-se na determinação das características químicas e estruturais dos bagaços e propõe um fluxo de operações para a produção do bagaço com os melhores atributos.
3. O **Capítulo 3** avalia os potenciais de sacarificação e fermentabilidade dos bagaços pré-tratados através de experimentos de hidrólise empregando enzimas comerciais, e ensaios de fermentação alcoólica envolvendo quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. O foco do capítulo é determinar os índices de conversão de glucana e estudo de seleção de leveduras a partir dos meios hidrolisados buscando determinar a linhagem mais bem adaptada às condições composicionais geradas pela ozonólise e pelo pré-tratamento hidrotérmico sobre bagaço de cana-de-açúcar.
4. **Anexos:** contém resultados preliminares de utilização do licor de pré-tratamento como substrato de cultivo de leveduras e fungos filamentosos com perspectivas de utilização deste subproduto do pré-tratamento para futuros trabalhos.

Capítulo 1: Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Overview about Pretreatment, Hydrolysis, Fermentation and Co-products

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is the main green carbon source feasible to be converted into renewable energy and chemicals through a biochemical platform that includes steps of pretreatment, hydrolysis, and fermentation. Sugarcane bagasse is one of the most available substrates and it has been strongly studied along last 10 years focused on traditional pretreatment approaches (i.e. acid, alkaline, liquid hot water, steam explosion) or emerging technologies (oxidative, ultrasound, microwave, ionic liquids) to increase biomass digestibility and prepare it to enzymatic saccharification. Cellulases and some other auxiliary enzymes are able to depolymerize cellulose leading the accumulation of monomeric sugars, mainly glucose, which is addressed to fermentative processes. Several new microorganisms isolated from natural resources have shown potential to produce hydrolases and different other high-value compounds from hydrolysate bioconversion. We are presenting a data collection from scientific publication between 2005-2015 aimed to characterize the production of bioethanol from sugarcane bagasse and its current perspectives about biomass fractionation in the biorefinery concept.

Keywords: Lignocellulose. Bioethanol. Biorefinery. Pretreatment. Hydrolysis. Fermentation. Bioproducts.

1. Introduction

The industrial development has been consolidated in our environment since last three centuries and currently, the energy demand takes place as the main concern to support a continuous growing worldwide. There is a consensus that sustainable practices need to be urgently replaced instead of the traditional extractive concept applied until now, but there are also many challenges to be overcome along this way. Another general agreement concerns about the central and essential role of plant biomass to reach a sustainable world in energy production in the next decades. Biofuels obtained from cellulosic crops are by far the most promising and available resource of carbon and they have been studied since the late 1970s when the first diluted acid pretreated was proposed as a solution to surpass the first big issue, the high recalcitrance of lignocellulosic biomasses composed of cellulose, hemicellulose, and lignin. Another concern has appeared more recently and it refers to the land-use and its potential competition with food production. This second issue looks more easily resolvable if we consider some agricultural practices to improve the land productivity (i.e. fast growing grasses, crop rotation), and mainly, the use of agricultural wastes already widely available after food production. Therefore, the recalcitrance remains until nowadays as the major trouble and it has required quite efforts in research and technology development to improve the accessibility to carbohydrates presents in lignocellulose. Basically, there are two ways to access these sugars and convert them into biofuels: (1) the thermochemical approach, which hydrolyzes them under high temperatures and oxygen-limited conditions generating smaller fragments from polymers as oily or gaseous compounds that are able to be converted into fuels by downstream operations; and (2) the biochemical processing involving multiple cellulolytic enzymes to break down the polymers and release monomeric sugars to ethanologenic microorganisms, traditionally very competent in hexose conversion to ethanol. Both technologies have been extensively evaluated in all aspects, which include conversion yield, environmental impact, commerciality, flexibility and scale-up, and economic ratio, obviously aiming for an industrial application. The biochemical approach seems more feasible as a potential proposal to produce biofuels

from cellulosic biomass due to some clear advantages in comparison to the thermochemical way, such as its lower environment impact, lower-cost processing, and higher specificity in product accumulation. These advantages have helped researchers to support their studies in biofuels and it has been extensively incremented in the past 10 years, with the fast increase of a number of scientific publications worldwide. In this review, we are presenting an overview based on original data extracted from scientific publications to create scenarios and current perspectives about bioethanol production from sugarcane bagasse over different approaches including pretreatment, hydrolysis, fermentation and co-products related to cellulosic biofuels.

A data collection of 308 original publications was extracted from Science Direct database (available on website: <http://www.sciencedirect.com/>), combining the word “ethanol” to the following keywords for search: “cellulose”, “enzyme”, “sugarcane bagasse”, “pretreatment”, “hydrolysis”, “fermentation”, and setting the time interval between 2005 and 2015 for all sources. Both original articles and review articles were considered as the source of data from any journal present in the database. The number of publications about biofuels from sugarcane bagasse has been increasing exponentially since 2005, with a higher amount of studies reported from 2011 ahead. Fewer publications were found between 2005 to 2010, except to pretreatment approaches, because these studies started first than hydrolysis and fermentative steps.

2. Lignocellulosic biomass: sugarcane bagasse composition

Sugarcane (*Saccharum* L.) bagasse is composed of three main components distributed approximately as 38% of cellulose, 27% of hemicellulose, and 20% of lignin (Szczerbowski et al., 2014). Research with 115 different cultivars of sugarcane shows that these components can range considerably between species obtained from classical and precision breeding. The amount of cellulose can vary from 32 to 40%, the amount of hemicellulose (including xylose, arabinose, galactose, anidropentoses, and acetyl groups) from 23 to 28%, and lignin from 15 to 23% (Benjamin et al., 2013).

Cellulose is a linear homopolysaccharide of approximately 12,000 D-glucose units linked by $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic bonds and organized in crystalline or amorphous

forms. Considering that the crystalline cellulose is structurally more organized, insoluble, and persistent, its access to water and enzyme is more difficult than in the amorphous form (Aliyu; Hepher, 2000). Hemicellulosic has a heterogeneous composition including pentose sugars (i.e. xylose, rhamnose, arabinose), hexose sugars (i.e. glucose, mannose, galactose), and uronic acids (i.e. 4-O-methylglucuronic and galacturonic acid), where xylose is the main component of polymers as xylan and xyloglucan (Ramos, 2003). Lignin is another polymer composed of p-coumaryl, coniferyl, and sinapil alcohols, besides crossed links of phenylpropanoids, which plays an important role in plant tissue resistance, but also increases the difficulty of processing by enzymatic hydrolysis in lignocellulosics (Aro et al., 2005; Sun & Cheng, 2002). Basically, lignocellulose recalcitrance is associated to cellulose crystallinity index, lignin content and distribution on cell wall, and cross-links between hemicellulose and lignin (Li et al., 2010; Mosier et al., 2005). Carbohydrate chains can be easily hydrolyzed by enzymes or chemicals since they are accessible; on the other hand, lignin solubilization is a complex process which involves nonspecific degrading enzymes able to catalyze redox reactions in different sites of lignin molecule. Otherwise, a physical or chemical approach is required to promote selective changes in the chemical fiber structure, resulting in increased carbohydrate polymer surface contact, and reduced lignin content before the enzyme action (Mosier et al., 2005). On this step, named pretreatment, three concerns should be considered for selecting the most appropriate technique: 1) carbohydrate moieties must be preserved for saccharification and fermentation ahead; 2) by-products potentially inhibitory to enzymes and fermentative yeasts must be minimally generated or released from biomass; 3) lower cost process must be preferred (Sun; Cheng, 2002; Alvira et. al., 2010).

3. Applied pretreatments to lignocellulosic biomass

Many options of pretreatments have been studied through the application of biological, physical, chemical, physicochemical, and combined techniques. These operations are normally employed in dried and ground biomass aiming to reduce its recalcitrance. Biological pretreatments are based on enzymatic systems to perform lignin oxidation by peroxidases and laccases, enzymes mainly produced by filamentous fungi,

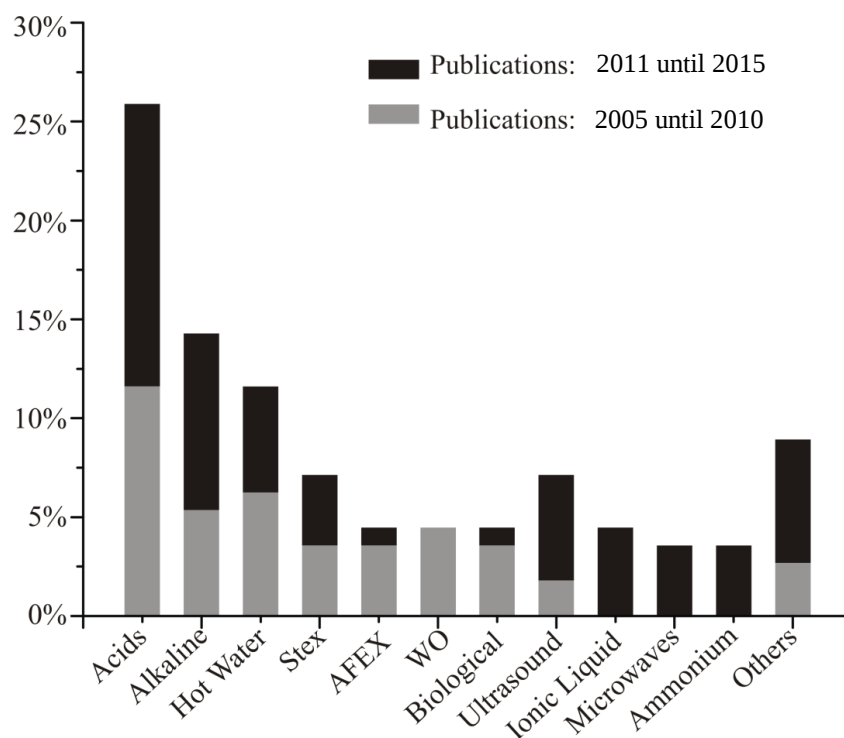
usually rot white group. However, this technique usually presents low rate of delignification and requires a long time in fungi cultivation, making it unattractive for industrial application. On the other hand, physicochemical processes have been the most popular options for lignocellulosics and they usually apply extreme conditions of temperature and pressure, in presence or absence of chemicals. Some examples are the acid and alkali pretreatments (Gurgel et al., 2014; Yu et al., 2013; Rocha et al., 2013), steam explosion (STEX) (Oliveira et al., 2013; 2014), ammonia fiber expansion (AFEX) (Li et al., 2010; Krishnan et al., 2010), and hydrothermal or liquid hot water (LHW) pretreatment (Kim et al., 2009; Ko et al., 2015). Together, these techniques represent the majority of studies involving pretreatment of sugarcane bagasse in the last decade (Figure 1), correlated to some advantages, such as the high recovery level of glucose, simplicity, and short time of operation; however, low specificity and high energy demand are their typical bottlenecks. Due to the low specificity of reactions, the most critical point is the intense formation of by-products with strong inhibitory action to cellulases or hemicellulases during enzymatic hydrolysis, such as vanillin, syringaldehyde, coumaric, and ferulic acid from lignin disruption (Ximenes et al., 2011), or to fermentative yeasts, such as acetic and formic acid, and furan compounds, i.e. furfural and hydroxyl methylfurfural originating from xylose and glucose dehydrogenation, respectively, besides phenolic compounds (Palmqvist, 2000). When inhibitory compounds are generated in high concentrations, additional procedures to detoxify pretreated feedstock are required, increasing operational costs. Concentration and nature of residuals byproducts are directly related to the severity or intensity of pretreatment, being typically more aggressive in acid condition or high temperatures. Some procedures in alkaline medium have been proposed to minimize generation of inhibitory compounds, such as Ammonium Fiber Expansion (AFEX), which use ammonia gas at temperatures around 100°C. The high volatility of ammonium is an advantage because it facilitates its recovery and reuses in the process. Furthermore, residual ammonium remained into the lignocellulosic matrix can serve as nitrogen supplement to yeasts in subsequent fermentation step, avoiding additional washing or neutralization procedures, typical in acid pretreatments (Krishnan et al., 2010; Li et al., 2010).

The scientific research review related to pretreatment of sugarcane bagasse realized by this work shows a commonly used type of treatments, including especially the acid, alkaline, LHW and STEX techniques (Figure 1). These ones could be classified as “classical pretreatments”, since they were the first ways proposed to treat biomass, and are still being studied. In the last 10 years, other pretreatments have been more limitedly studied, such as wet oxidation (Mart; Thomsen, 2007; Martín et al., 2007), AFEX and biological (Singh et al., 2007; Camassola & Dillon, 2009). There is also a third group of pretreatments that have been studied more recently, approximately in the last five years, such as: ultrasound (Sindhu et al., 2013; Ramadoss; Muthukumar, 2014), ionic liquids (Zhu, Z. et al., 2005; Zhang et al., 2012; Yoon et al., 2012), microwave (Moretti et al., 2014; Binod et al., 2012; Bundaleska et al., 2012), ammonium (Zhang & Wu, 2014; Cao & Aita, 2013; Zhu et al., 2012), organosolv (Zhao et al., 2009; Dias et al., 2009), ozonolysis (Travaini et al., 2013; Panneerselvam et al., 2013; Barros et al., 2013; Gitifar et al., 2013), and other chemical oxidizing substances employing glycerol (Novo et al., 2011) and alkaline hydrogen peroxide (Rabelo et al., 2011). Generally, they are characterized by higher selectivity of reaction and lower operational time. Additional information about each technique is presented in Table 1.

Many pretreatments of lignocellulosic biomass are continuously investigated, but none has been efficient enough for general application in industrial scale. Each technique has its own advantages and disadvantages, depending on nature or condition of operation. More information comes from diluted acid hydrolysis, which is proven to release a high concentration of glucose, especially due to partial solubilization of hemicellulose, thus, allowing great access to cellulose fibers by enzymes after pretreatment. On the other hand, it is limited by the formation and retention of residual toxic compounds, requiring heedful treatment and recovery of effluents. Use of organic acids (i.e. maleic or fumaric acid) has been suggested as an alternative to sulfuric acid (H_2SO_4) to minimize the toxicity in acid treatments (Alvira et al., 2010). In addition, processes in alkaline medium are simpler and less aggressive to carbohydrates than acid, because alkaline solutions have more affinity to lignin fraction, promoting a partial delignification of material. However, in most cases, alkaline treatments have a lower yield than acid pretreatments. The interest in new pretreatments technologies (i.e. ionic liquids, microwave, ultrasound, ozonolysis) have

increased in scientific research and require further studies of characterization and optimization of these processes because generally, they share the same bottlenecks related to high operating cost, difficulties to scale-up or operational restrictions.

Figure 1. Employment frequency of pretreatments in sugarcane bagasse from 2005 to 2015.



Source: elaborated by the authors.

Table 1. Characteristics of promising pretreatments proposed for sugarcane bagasse.

Pretreatment	Way of work	Strengths	Weaknesses	References
Ultrasound	Formation of microbubbles in solution with temperatures up to 5000K and pressure 1000 ATM, leading to the formation of free radicals inside of bubbles formed by sonolysis of water	Acoustic cavitation in liquid medium helps solvents penetration and increase mass transfer into cellulosic materials, improving enzymatic hydrolysis	Need more detailed studies for operation and scaling-up	Nitayavardhana et al., 2008; Velmurugan, Muthukumar, 2012; Benazzi et al., 2013; Sindhu et al., 2013; Suslick et al., 1986; Wood, 1997; Liu et al., 2007; Sun et al., 2004; Perrone et al., 2016a

Bioprocesso de produção de etanol celulósico via tratamento com ozônio e hidrotérmico

(Table 1 – continuation)

Organosolv	Selective dissolution of polymers employing organic solvents under acidic and heating conditions, such as short chain alcohols, acetone, or ethylene glycol.	High solubilization of hemicellulose, and high delignification rate, due to most affinity between solvent and lignin, making possible recover lignin as a solid fraction	High cost of solvents, requiring additional steps of removal by evaporation and fibers detoxification to avoid residual inhibitory effects on enzymes and yeasts	Zhao et al., 2009 Dias et al., 2009
Ionic liquids	Employment of anionic salt solutions to disrupt non-covalent interactions between structural polymers.	None inhibitory effects on fermentation. Possibility of recovery solutions for reuse	High cost	Zhu et al., 2012; Karatzos et al., 2012
Ozonolysis	Lignin oxidation promoted by ozone gas (O ₃)	High-affinity reaction with lignin and few reactions with carbohydrates. Low formation of inhibitory compounds. Operation at room temperature and pressure. Easy generation and decomposition of ozone gas	Need more studies on energy consumption, scaling-up, and reactor design	Travaini et al., 2013; Barros et al., 2013; Gitifar et al., 2013; Cassia Pereira et al., 2016; Perrone et al., 2016a, 2016b
Microwaves	Water molecules in intense rotational movement generates frictional heating	Obtaining high temperatures in few seconds (approximately 160°C) and heating uniformity	Need more studies for operation and scaling-up	Binod et al., 2012; Bundaleska et al., 2000; Chen et al., 2011; Moretti et al., 2014
Oxidative treatments	Use of glycerol or hydrogen peroxide to reduce lignin and hemicellulose content at high temperatures	Glycerol increases the enzyme yield and produce low amount of inhibitor compounds	Requires high temperatures. Microwave can be an interesting alternative to using with glycerol	Zhang et al., 2013; Moretti et al., 2014; Martín et al., 2011; Rabelo et al., 2011

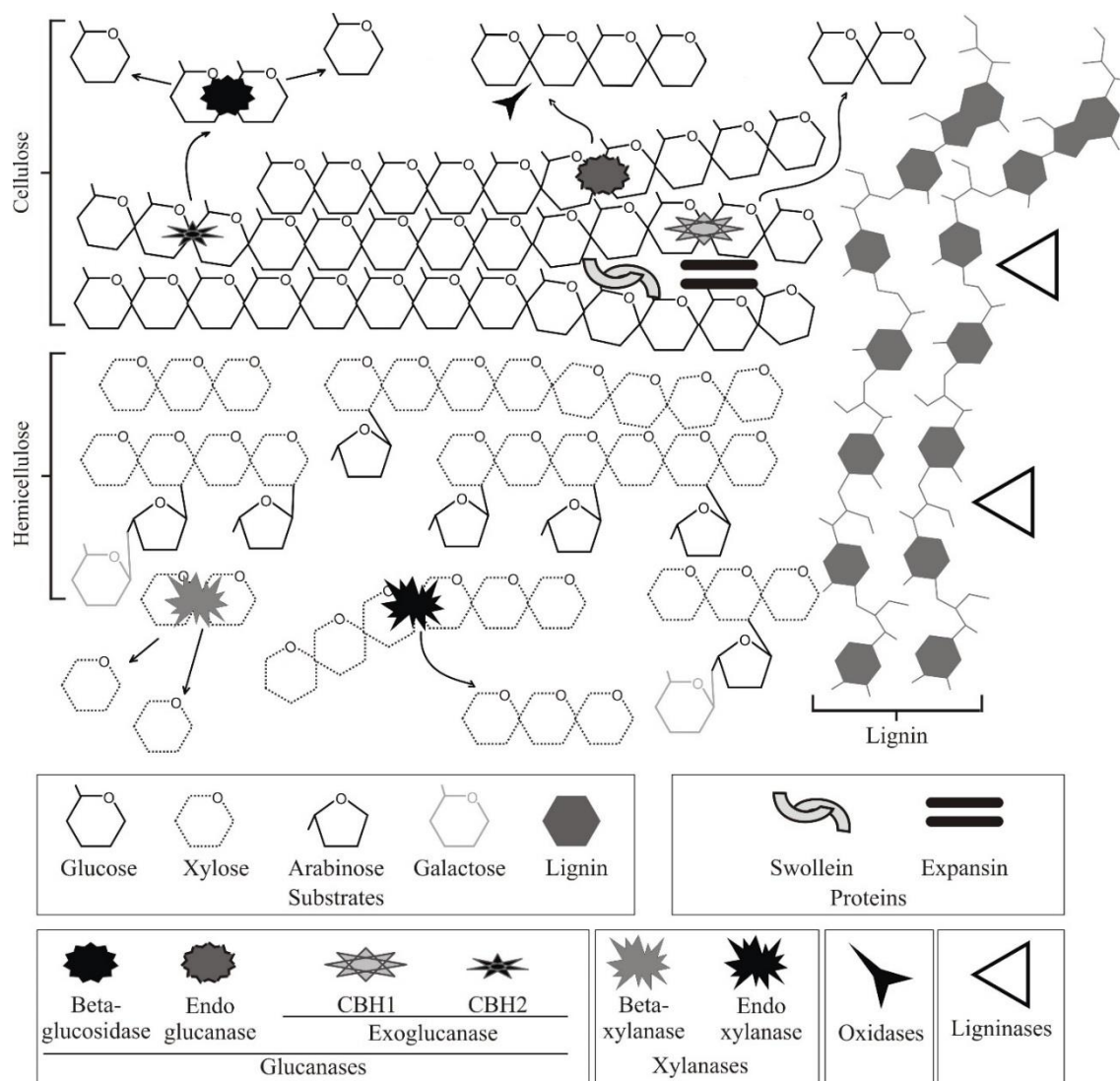
Source: elaborated by the authors.

4. Enzymatic hydrolysis of biomass

After the pretreatment, the recalcitrance of biomass is reduced due to modifications on the matrix that facilitate biochemical conversion by cellulolytic enzymes. The access of enzymes to carbohydrate polymers is improved and the degradation process starts by the adsorption of enzymes into the substrate, such as cellulose or xylan. Enzymes can bind to the solid surface through either specific or non-specific linkages. These interactions can be formed with any component of the biomass through non-covalent interaction (i.e. hydrogen bonding), hydrophobic, or electrostatic (Palonem et al., 2004; Zheng, 2007). The adsorption still can be performed by the association between cellobiohydrolases (CBH) and endoglucanases (ENG) enzymes with non-catalytic structures, called CBM (Carbohydrate Binding Modules), which are able to maintain the enzyme bound to fiber, increasing the enzyme concentration on cellulose surface (Chundawat et al., 2011).

Enzymatic deconstruction of lignocellulosics involves three major classes of hydrolases acting in synergism, as well another auxiliary enzymes and proteins that promote different catabolism reactions. This multiple action of enzymes into biomass is illustrated in Fig. 2. The required hydrolases to provide conversion of cellulose to glucose are: (I) endoglucanases: initiate cellulose hydrolysis by cleaving internal β -1,4-glycosidic bonds on amorphous portion, releasing oligosaccharides with different degrees of polymerization, and providing new reducing and non-reducing terminals; (II) exoglucanases divided in cellobiohydrolases – CBHI, that acting in the outer region of cellulose through reducing ends, and CBHII, specific for non-reducing ends. Lastly, (III) β -glucosidase or cellobiase is necessary to avoid cellobiose accumulation, which acts as an inhibitor to endo- and exoglucanases. The β -glucosidases are hydrolytic enzymes generally classified as: (1) specific substrate or (2) identical nucleotide sequence (Henrissat, Bairoch, 1996). Another way to classify them is according to their specific substrate required, where true cellobiases hydrolyze only cellobiose, while others with broad specificity act on several substrates.

Figure 2. Multiple enzymatic actions into lignocellulosic biomass.



Source: elaborated by the authors.

Loss of productivity during enzymatic saccharification can happen due to irreversible adsorption and non-specific adsorption effects. In a regular action, enzyme adsorbs on cellulose surface, performs its biodegradation, and thus it desorbs and remain available for a new catalysis. Once desorption does not occur, the connection between substrate and enzyme gets irreversible (Lu et al., 2002). This effect can be successfully minimized by employing surfactant substances, such as the commercial products: Tween 20, Tween 80, and Emulgem 147 (Irfan et al, 2012; Fang et al., 2013). However, in non-specific adsorption, the enzyme binds non-productively to lignin surface since its surface

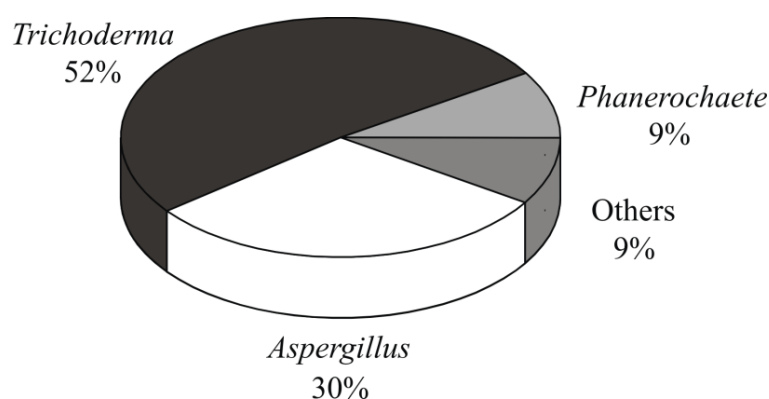
stays inaccessible (Seo et al., 2011; Huang, Penner, 2002). Even cellulases have higher affinity to bind with cellulose than lignin, this adsorption can happen easier if hydrophobic amino acids present on enzyme surface can interact with hydrophobic lignin surface. This effect has been observed in several cellulases of *Trichoderma reesei* (Reinikainen et al., 1995).

Nowadays commercial cellulolytic extracts are mainly obtained from filamentous fungi cultivation, mostly *T. reesei* and *Aspergillus niger*. However, there are also studies reporting cellulase production by yeasts (Ridruejo et al., 1989; Khelila, Cheba, 2014), and by bacteria (Mawadza et al., 2000; Shanmughapriya et al., 2010). The mesophilic fungi *T. reesei* is able to synthesize multiple enzymes and it is the most studied cellulolytic system for cellulose hydrolysis (Merino, Cherry, 2007), composed by seven main cellulases including endoglucanases (EG I-V or Celm7B; Cel 5A; Cel 12A; Cel 61A; Cel 45A), and cellobiohydrolases (CBHI-Cel 7A; CBH II-Cel 6A), but it is inefficient in β -glucosidase synthesis (Rosgaard et al., 2007b; Shoemaker et al., 1983). More effective β -glucosidases are generally obtained from the cultivation of *Aspergillus* spp. (Gunata, Vallier, 1999; Riou et al., 1998), *Penicillium* spp. (Krogh et al., 2010; Chen et al., 2010), *Phanerochaete chrysosporium* (Tsukada et al., 2006), or *Paecilomyces* sp. (Yang et al., 2009).

Three corporations that represented more than 75% of the market consolidate world trade of enzymes for biofuels: Novozymes (Denmark), Genencor-DuPont (USA), and DSM (The Netherlands) (Li et al., 2012). Consequently, the majority of scientific studies make use of their cellulolytic enzymes to lignocellulose saccharification, especially the cocktails: Celluclast[®], Novozym[®], Cellic[®], and Accellerase[®]. On the other hand, new enzymatic extracts obtained by wild strains collected from different environments continues being studied, especially aiming to reduce process costs by developing own technologies as an alternative for new biorefineries. The cost of enzyme technology is still a major challenge for cellulosic bioethanol viability. In the production of bioethanol from corn stover, for example, the cost for enzymatic hydrolysis is approximately 40% of the final cost of biofuel, according to a technical-economic study of Department of Energy of the United States of America (Kazi et al., 2010). Thus, saccharification is a key step in these processes, where high yields of cellulose to glucose

conversion are required. Over the last 10 years, scientific research has studied extensively the fungi *Trichoderma* spp. and *Aspergillus* spp. They represent more than 80% of cited microorganisms in enzyme prospection and production to biofuels and the main species observed in this scientific review were: *T. reezei*, *T. harzianum*, *T. viride*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. awamori*, *A. terreus*, and *A. candidus* (Abo-State et al., 2013; Delabona et al., 2013; Mood et al., 2013). New promising species have been prospected, such as *Phanerochaeta chrysosporium* (Ruane et al., 2010; Pal et al., 2013), *Myceliophthora thermophila* (Moretti et al., 2014), *Penicillium janthinellum* (Adsul et al., 2004), and *Phlebia* sp. (Khuong et al., 2014), as showed in Fig. 3.

Figure 3. Prospecting profile of new cellulolytic microorganisms.



Source: elaborated by the authors.

Recently the progress in enzyme technology for biofuels have focused in the selection of metabolites with high specificity and stability (Pereira et al., 2014; Moretti et al., 2012), as well as the improvement of production yields using genetically engineered strains (Merino, Cherry, 2007; Zhang et al, 2006). Main improvements comprise increase in expression capability, and greater complexity of synthesized compounds, generating more complex extracts with essential activities (i.e. endo-, exoglucosidases, β -glucosidases, endoxylanases, β -xilosidases), and secondary activities able to contribute in enzymatic hydrolysis through synergistic effects, such as: β -mannanase, amyloglucosidase, α -arabinofuranosidase, α -glucuronidase, polysaccharide

monooxygenase (PMO's), and important proteins, especially expansin and swolein (Bunterngsook et al., 2015; Hu et al., 2014). However, more studies are still necessary to a complete knowledge about the mechanisms of interaction between multiple enzymes (Van Dyk, Pletschke, 2012).

Other approaches have been proposed to improve enzymatic hydrolysis, such apply ultrasound during the enzymatic action, where cavitation allows a better transportation of enzymes to the substrate (Li et al., 2004; Yachmenev et al., 2009). Other work reports the higher concentration of reducing sugar associating supercritical CO₂ to ultrasound technique (Benazzi et al., 2013). The fed-batch operation can be performed in hydrolysis to extend the time of action of cellulases by recycling them. In this way, an enzymatic process is sequentially feed with the pretreated substrate, increasing gradually the solids loading and, consequently, increasing the reducing sugars with the same initial enzyme load (Wanderley et al., 2013). However, the main disadvantage is related to a probable enzymatic retro-inhibition when high glucose accumulates, typical in the hydrolytic system of β -glucosidases. One way to avoid this effect is developing both steps together through a Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), where the glucose consumption by yeasts prevents retro-inhibition of enzymes. Due to its complexity involving a catalytic and a fermentative process, SSF needs great operational control and have been developed only in experimental scale (Mesa et al., 2011; Vásquez et al., 2007).

5. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates

The ethanol bioconversion by solubilized sugars extracted from lignocellulosic matrix can be more simply performed when only hexoses are present in the liquid hydrolysate. Pentose sugars require more efforts because they are not metabolized by traditional strains of *Saccharomyces cerevisiae*. This fact represents the main technological challenge in alcoholic fermentation of hydrolysate products.

The utilization of xylose and arabinose did have not a priority in the initial fermentation studies, especially due to the low resistance of hemicellulose in the extreme conditions initially proposed in biomass pretreatments. Thereby, low concentrations of

these sugars were observed as result of hydrolysis. However, recently the application of less aggressive pretreatments have preserved hemicellulose chains, and consequently, the interest in pentose assimilation as a substrate for different products by fermentation is increasing. In some pretreatments is possible to obtain separated C6 and C5 carbohydrates fractions, and use either to increase the global yield of bioethanol process or to diversify the options of technological bioproducts from biomass.

5.1. Hexose fermentation

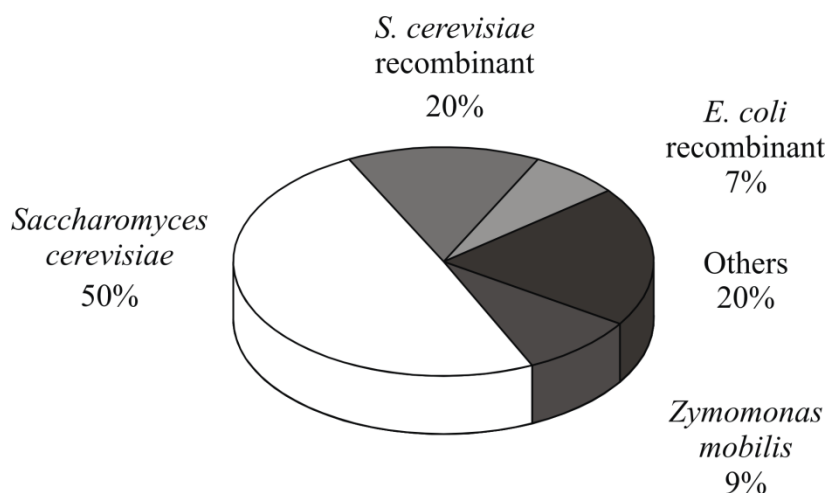
Technological development of alcoholic fermentation is largely based on extensive knowledge about *S. cerevisiae* metabolism, which is the main option for the fermentative microorganism. *Zymomonas mobilis* could be considered the second option in cellulosic ethanol production, and this bacterium has been extensively studied in different cultivation strategies in the last years (Singh et al., 2014; Pentjuss et al., 2013; Wirawan et al., 2012; Vasan et al., 2011; Fu et al., 2009; Velmurugan & Muthukumar, 2012). However, bacteria generally present lower tolerance to the inhibitor compounds released in pretreatment, and their utilization has been avoided in industrial processes (Lin, 2006).

In this data collection, the predominance of the utilization of *S. cerevisiae* is confirmed, according to Fig. 4. The use of recombinant microorganisms is rising, especially engineered strains of *S. cerevisiae* and *Escherichia coli*. Others less habitual strains employed are the yeasts *Kluyveromyces marxianus*, a thermotolerant species, (Moreno et al., 2013; Lin et al., 2013), *Scheffersomyces (Candida) shehatae* (Chandel et al., 2007), and also the ethanologenic bacterium *Klebsiella oxytoca* (Shields & Boopathy, 2011; Tran et al., 2013). Other studies have investigated use of promising microorganisms to be able to perform both cellulolytic and ethanologenic activities, such as the fungi *Fusarium verticillioides*, *Acremonium zeae* (Almeida et al., 2013), *Phlebia* sp. (Khuong et al., 2014; Kamei et al., 2012), and *Flammulina velutipes* (Maehara et al., 2013). The anaerobic bacteria *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacter pentosaceus* perform the same function, however, they have not been studied in sugarcane bagasse

hydrolysate, only in corn stover fermentation (Shao et al., 2011; Balusu et al., 2005), and in the synthetic substrate (Sittijunda et al., 2013).

This massive preference for *S. cerevisiae* is due to well-known advantages, such as: 1) high yield of conversion of hexoses to ethanol, allowing highly efficient processes; 2) safe microorganism (non-pathogenic) with vast knowledge about its physiology, genetic, and metabolism; 3) main yeast currently used in refineries, allowing a simpler integration of ethanol production from first and second generation; 4) more resistant strains screened along last decades to industrial stressing conditions; 5) easily genetic handling microorganism, with possibility of obtaining recombinants capable of assimilating pentose and/or synthesize cellulolytic complex for enzymatic saccharification, besides other genetic manipulations of interest.

Figure 4. Employment frequency of microorganisms in fermentation of hydrolysate sugarcane bagasse.



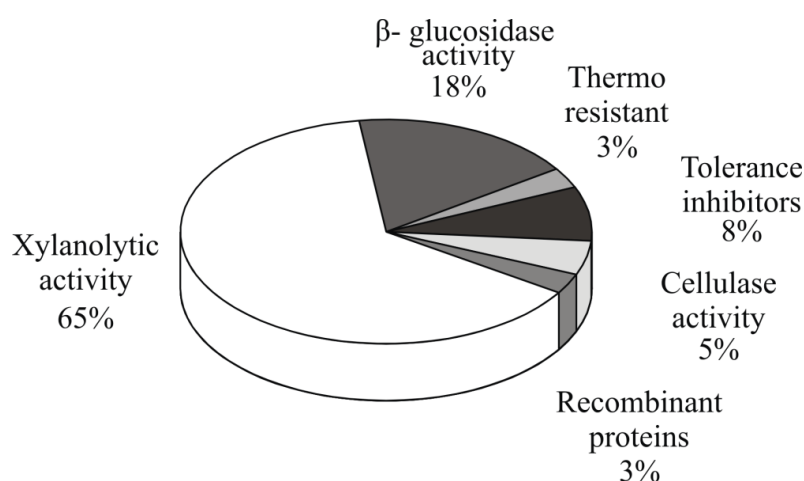
Source: elaborated by the authors.

Many studies have focused on the genetic improvement of *S. cerevisiae* strains when the objective is applying it in hydrolysate material to perform alcoholic fermentation. In Fig. 5, we present the diversity of genetic strategies from 40 scientific publications that employed this technique. The genetic engineering became gradually one of the main ways to improve productivity rates and obtain more robust and complex strains. The most usual modification is related to manipulation of genes responsible for

the xylose transport and metabolism (Moon et al., 2013; Khattab et al., 2013; Kim et al., 2013). Generally, these studies have introduced genes of xylose reductase (XYR) and xylitol dehydrogenase (XDH), extracted from *Scheffersomyces stipitis*, or they have inserted genes of xylose isomerase (XI), that result in xylulose accumulation. This is a natural metabolism typical in some bacteria, such as (examples of bacteria). Xylulose can be regularly fermentable by *S. cerevisiae* by Pentose Phosphate Pathway (Agbogbo, Coward-Kelly, 2008; Tomitaka et al., 2013).

Other strategies observed in recombinant *S. cerevisiae* refers to disruption of genetic markers for resetting yeast metabolism (Wei, Xu, et al., 2013), obtainment of mutants able to co-ferment cellobiose (Kim et al., 2013; Ha et al., 2011) and others cello-oligosaccharides, such as cellotriose, cellotetraose and cellopentaose (Liang et al., 2013), acquirement of inhibitor resistance (Gao, Xia, 2012; Alriksson et al., 2010; Hasunuma et al., 2014), greater thermo-resistance (Shahsavarani et al., 2013), besides to the capacity of express cellulolytic complex (Yamada et al., 2013; Khramtsov et al., 2011; Den Haan et al., 2007) or other recombinant proteins (Soares-Costa et al., 2014).

Figure 5. The most common biological activities reported to recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains.



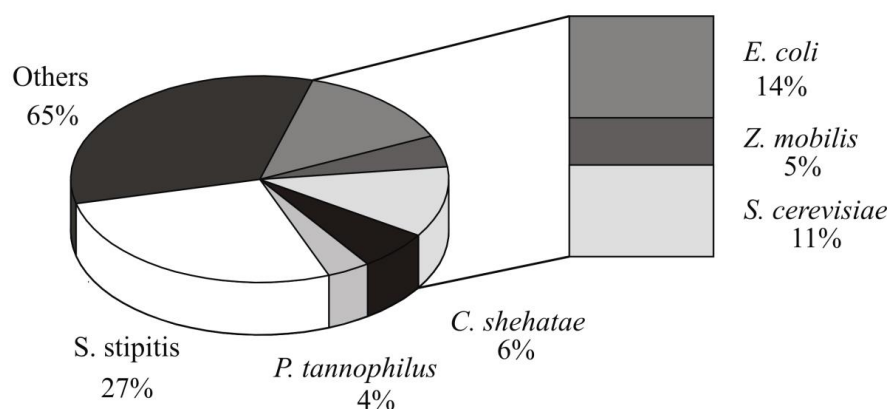
Source: elaborated by the authors.

5.2. Pentose fermentation

Xylose and arabinose, the main carbohydrates derived from hemicellulose hydrolysis, have been continuously studied for bioethanol production, especially xylose because it is the most abundant pentose. The first experiments employing yeasts to L-arabinose fermentation began 20 years ago (Dien et al., 1996), while the ethanol production from xylose is largely reported since the early 80's (Gong et al., 1981, 1983; Nigam et al., 1985; Toivola et al., 1984).

The most representative species naturally assimilators of these C5-carbohydrates are: *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Scheffersomyces (Candida) shehatae*, and *Pachysolen tannophilus*. *S. stipitis* has been the recurrent specie in the scientific publications about cellulosic bioethanol over the last decade, according to this data collection. Another cultures, including filamentous fungi, yeasts and bacteria, are still applied with less frequency in these studies, such as *Spathaspora arborariae* (Cunha-Pereira et al., 2011; Hickert et al., 2014), *Pichia guilliermondii* (Chao et al., 2013), *Hansenula polymorpha* (Voronovsky et al., 2009), *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp. (Millati, Edebob, Taherzadehc, 2005; Sues et al, 2005; Karimi, Emtiazi, Taherzadeh, 2006; Karimia, Edebob, Taherzadehc, 2008; Abedinifar et al., 2009), *Fusarium* spp., and *Acremonium* spp. (Panagiotou et al., 2005; Almeida et al., 2013). Okamoto and collaborators reported utilization of two basidiomycete species: *Trametes hirsuta* (2011) and *Neolentinus lepideus* (2012). The main ethanologenic bacteria able to use pentose as a carbon source are *Caloramator boliviensis* (Crespo et al, 2012) and those from genera *Thermoanaerobacter* spp., *Thermoanaerobacterium* spp., and *Caldanaerobacter* spp. (Qiang et al., 2009; Sittijunda et al., 2013; Zhao et al., 2013). In Fig. 6, these species are presented in according to their most frequent usage in scientific publications, including some engineered species, mainly *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* and *Escherichia coli*.

Figure 6. Microorganisms employed in pentose fermentation from lignocellulosic hydrolysate.



Source: elaborated by the authors.

The induction of D-xylose catabolism initiates with its transport to the inside of cells, where it is reduced to xylitol by D-xylose reductase (aldose reductase, EC 1.1.1.21). It is subsequently oxidized to D-xylulose by D-xylitol dehydrogenase (D-xylose reductase, EC 1.1.1.9), and, then, through D-xylulokinase (EC 2.7.1.17.) action, D-xylulose is converted to D-xylulose-5-phosphate. The ethanol synthesis occurs after a non-oxidative rearrangement of glyceraldehyde-3-phosphate and fructose-6-phosphate, which are reaction products of ribulose-phosphate-3-epimerase (EC 5.1.3.1), transaldolase (EC 2.2.1.2), and transketolase (EC 2.2.1.1) enzymes upon D-xylose-5-phosphate, respectively (Chandel et al., 2011). Similarly to D-xylose, L-arabinose generates D-xylulose-5-phosphate after five steps. Initially four redox reactions occur: two oxidations coupled to NAD^+ consumption, in which L-arabinose is first converted to L-arabinitol by aldose reductase (EC 1.1.1.21), and this is converted to L-xylulose by L-arabinitol-4-dehydrogenase (EC 1.1.1.12); after that, occurs two reductions with NADPH consumption, where L-xylulose is reduced to D-xylulose by L-xylulose reductase (EC 1.1.1.10). Then, D-xylulose is phosphorylated and forms D-xylulose-5-phosphate by xylulokinase (EC 2.7.1.17) enzyme, which can be metabolized in Pentose Phosphate Pathway (Richard et al., 2003). These metabolic pathways of xylose and arabinose are described in Fig. 7, integrated to glucose oxidation route.

The diagram illustrates the metabolic pathways for the conversion of various sugars to ethanol and their entry into the TCA cycle and Respiratory chain. The pathways are as follows:

- Xylose Pathway:** Xylose is converted to Xylitol by XR (NAD(P)H to NAD(P)⁺). Xylitol is then converted to Xylulose by XD (NAD⁺ to NADH). Xylulose is converted to Xylulose 5P by XK. Xylulose 5P is then converted to Glyceraldehyde 3P by TKT.
- Arabinose Pathway:** Arabinose is converted to Ribulose by AI. Ribulose is converted to Ribulose 5P by RK. Ribulose 5P is then converted to Ribose 5P by RPI. Ribose 5P is converted to Ribulose 5P by RPE. Ribulose 5P is then converted to Glyceraldehyde 3P by TKT.
- Glucose Pathway:** Glucose is converted to Glucose 6P by HK. Glucose 6P is converted to Fructose 6P by G6PI. Fructose 6P is converted to Fructose 1,6 biphosphate by 6PFK. Fructose 1,6 biphosphate is then converted to Glyceraldehyde 3P and Dihydroxyacetone P by FPA. Dihydroxyacetone P is converted to Glyceraldehyde 3P by TPI. Glyceraldehyde 3P is converted to Pyruvate by GAPDH (NADH to NAD⁺). Pyruvate is then converted to Acetaldehyde by PD and to Acetyl CoA by PDC. Acetaldehyde is converted to Ethanol by ADH (NAD⁺ to NADH) and to Acetate by AD (NAD⁺ to NADH). Acetate is converted to Acetyl CoA by ACS. Acetyl CoA enters the TCA cycle.
- Other Pathways:** Fructose 6P is converted to Fructose 6P by G6PD (6P Glucolactone to NADH to NAD⁺). Fructose 6P is converted to Fructose 6P by PGLS (NADH to NAD⁺). Fructose 6P is converted to Fructose 6P by 6PGD (NADP⁺ to NADPH). Fructose 6P is converted to Fructose 6P by 6PGD (NADP⁺ to NADPH).
- Final Products:** Ethanol and Acetyl CoA are the final products of the metabolic pathways. Ethanol is converted to Acetyl CoA by ADH (NAD⁺ to NADH). Acetyl CoA enters the TCA cycle, which is coupled with the Respiratory chain (NADH to NAD⁺).

None of these metabolic pathways is present in *S. cerevisiae*, therefore researches are continuously searching for new natural strains with high capacity to ferment C5-carbohydrates. This metabolism is not completely understood and it requires more knowledge to improve yield rates and productivity, similarly to glucose fermentation. Furthermore, the detection of new species could generate additional source of genes to new recombination strategies (Cadete et al., 2013; Lorliam et al., 2013; Morais et al.,

2013), especially because the productivity in ethanol reported for recombinant strains remain still low, similar to native C5-carbohydrate strains (Guo; Jiang, 2013; Hector et al., 2013; Kato et al., 2013; Moon et al., 2013).

Xylitol is a secondary product from pentose metabolism, and it can be secreted instead of ethanol, reducing the yield of the process. This fact occurs because the enzyme xylose reductase utilizes both NADH and NADPH as a cofactor, but predominantly NADPH is used. On the other hand, the enzyme xylitol dehydrogenase is NAD^+ dependent, so, when occurs an imbalance of these cofactors (NAD(P)H/NAD^+), the accumulation of xylitol is favored, because the required cofactor (NAD^+) to xylitol dehydrogenase is not available due to an impossibility to recycling it. As showed in Fig. 7, NADP^+ can be recycled to NADPH in the reaction of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate, while the balance of recycling NADH usually can be alleviated by respiratory chain reactions, since there is no transhydrogenase activity ($\text{NADP}^+ + \text{NADH}^+ \leftrightarrow \text{NADPH}^+ + \text{NAD}^+$). Thus, the equilibrium of redox potential into the cell is mandatory to get a successful fermentative process with pentose sugars (Liang et al., 2013).

The yield of ethanol from pentose is also influenced by concentration and by the composition of carbohydrates in the culture medium. Usually, higher concentrations of sugars result in more ethanol; however, the conversion rate (yield) is higher in lower xylose concentrations (Farias et al., 2013; Unrean, Nguyen, 2013). Another typical particularity is related to inhibition of xylose assimilation when there is glucose in the same medium. Generally, yeasts do xylose consumption only after glucose exhaustion (Matsushika, Sawayama, 2013; Santos et al., 2013). Some studies have supplemented the pentose media with galactose (Park et al., 2013), or added nitric acid in their pretreatment, as a supplementary nitrogen source (Kim et al., 2014), to increase the xylose utilization during fermentation experiments. Furthermore, it is well known that a high concentration of salts in the culture medium promotes inhibitory effects on carbohydrates metabolism, and the xylose consumption is more affected than the glucose by salts (Casey et al., 2013).

5.3.Limitations in alcoholic fermentation of hydrolysates

Large scale processing of sugarcane bagasse still needs to overcome challenges not present in laboratory or pilot-scale experiments, especially because the industrial environment is much more hostile than experimental conditions. The first refineries to be able to processing biomass are being installed, and they are starting operations in 2014/2015 crop in Brazil, but they are not still convincing about their viability. Some studies of technical and economic feasibility of cellulosic bioethanol recommends an integrated processing model including first and second generation routes, especially aiming to minimize costs of new industrial plants, to reducing business risk, and for recognize the high performance and yields in traditional fermentation processes developed with juice sugarcane (Dias et al., 2013; Renó et al., 2014; Lennartsson et al., 2014).

Industrial fermentations of sugarcane juice are performed in continuous or sequential (fed-batch) operations in refineries currently. Both these operations require cell recycling of yeasts, allowing their reuse during the entire crop. This practice reduces time and nutrients required in the initial propagation of inoculum of each productive cycle along the crop, making the process more dynamic by keeping a high cell density inside fermenters (Matano et al., 2013; Sanda et al., 2011). Consequently, this practice promotes an important natural selection of more robust and better-adapted strains over time (Basso et al., 2008). In a possible integrated production of cellulosic bioethanol, including cell recycling, some concerns emerge about hydrolysate fermentation. For example, the chemical composition of sugarcane juice is very different from hydrolysates, while the first contains essentially hydro-soluble carbohydrates (sucrose, glucose, fructose) easily fermentable, the second would be composed of both C6 and C5 carbohydrates, besides several kinds of phenolic compounds, furan derivatives, and organic acids. These potentially inhibitory substances to yeasts are present according to the type and aggressiveness of pretreatment, and, obviously, for the reasons already discussed, pretreatments with the lower generation of toxic compounds are preferred. However, the presence of inhibitors is inherent in this process due to nature of raw material containing lignin. Table 2 summarizes the main inhibitory compounds for fermentative yeast.

Table 2. Main compounds from lignocelluloses with inhibitory action against *Saccharomyces cerevisiae*.

Inhibitory compound	Source	Inhibitory concentration (g L ⁻¹)	Typical growth inhibition	Reference
Acetic acid	Acetil groups from hemicellulose depolymerization	10.0	48%	Delgenes et al. (1996)
Formic acid	5-Hydroxymethylfurfural degradation under acidic and high temperature conditions	2.7	80%	Maiorella et al. (1983)
Furfural	Hemicellulose degradation by-product	6.0	100%	Liu et al. (2004)
5-Hydroxy-methylfurfural	Cellulose degradation by-product	15.0	100%	Liu et al. (2004)
Vanillin	Lignin degradation by-product	1.0	86%	Delgenes et al. (1996)
Syringaldehyde	Lignin degradation by-product	1.5	81%	Delgenes et al. (1996)
p-Hydroxy-benzaldehyde	Lignin degradation by-product	1.5	87%	Delgenes et al. (1996)

Source: elaborated by the authors.

The physiologic behavior of *S. cerevisiae* has been individually evaluated against several phenolic classes usually found in lignocellulosic hydrolysates, such as phenolic aldehydes, phenolic ketones, phenolic acids, and phenolic alcohols. Among these, generally the phenolic aldehydes seem to promote stronger inhibitory effects on yeasts; however, there is no consensus about which of them is the most harmful (Adeboye et al., 2014; Almeida et al., 2007). Their injurious effects are not only on cell multiplication but also on the production of ethanol, glycerol, and acetate by yeasts. Furthermore, until recently few studies have evaluated the tolerance of fermentative yeasts against those compounds simultaneously, especially from the perspective of recycling cells by 200 times or more on a large scale (Brethauer, Wyman, 2010). Some experiments tried to simulate the recycling of cells by employing repeated batches of alcoholic fermentations, but it remains as a laboratory estimative (Demeke et al., 2013; Landaeta et al., 2013; Lee

et al., 2011). Therefore, there is a lack of knowledge about the behavior of fermentative yeasts in this operational system over time.

Some authors propose preventive actions to minimize microbial stress at fermentation by hydrolysate detoxification employing different compounds, such as lime (Calcium Oxide-CaO), ion exchange resins, or laccase enzymes (Moreno et al., 2013; Takahashi et al., 2013). On the other hand, others strategies work to increase yeast tolerance to those compounds, aiming the obtainment of more robust strains (Almeida et al., 2007). The main ways to perform it are by the engineering of redox system (ASK et al., 2013), by mutation, genetic, and evolutionary engineering (Demeke et al., 2013; Lulu et al., 2013; Sato et al., 2013; Sehnem et al., 2013; Zha et al., 2013; Zuo et al., 2013), or by development of tolerance by gradual exposition to inhibitors compounds (FAN et al., 2013), or to ethanol (Liang, Kim et al., 2013). The pentose-fermenting yeasts are also constantly studied by metabolic engineering, especially to solve oxygen requirement to permit a regular respiratory chain action. Some studies aim to mitigate redox unbalance since an undesirable redox condition can be explored to conduct desirable metabolic reactions and improve production and yield rates. For example, an excess of NADH can be useful to conduct acetate reduction to ethanol (Wei, Quarterman et al., 2013).

Despite the recent increase in academic studies that propose the application of several genetically engineered yeasts, there are many barriers to their use in industrial processes. Major challenges refer to difficulties of control and prevention of their dispersion in large scale, and their impact and alleged consequences when in contact with the natural environment. Another unanswered question is how it would be in the persistence of genetically modified strains during the manufacturing process, taking into account the high biological competitiveness in this environment, and the possibility of resistance acquisition to inhibitory compounds over the processing time. Thus, the application of genetically modified microorganisms on large scale remains without perspective in the sugarcane refineries.

6. Technological routes to cellulosic ethanol

Different proposals have been suggested in recent years to describe the best processing strategy to obtain bioethanol from lignocellulosic residues, as illustrated in Figure 8. Evidently, pioneering studies predict a simpler process developed in independent and sequentially stages of pretreatment, hydrolysis, and fermentation, until finally carry out the distillation. This model has been named as Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF). In the recent years, an increasing number of studies are considering to perform the steps of hydrolysis and fermentation together, especially aiming an optimized alternative able to improve the economics of this viability process. In this scenario, the enzymatic extract is added in the same reactor used to develop the alcoholic fermentation, and the process is named as Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). Its main advantages are related to a reduced operating time, less expenditure of equipment and tanks in procedures of transportation and processing, and to minimize the typical inhibition of β -glucosidase enzymes by glucose accumulation, since the released monomers begin to be assimilated by yeasts immediately. Similarly, SSF model also can be added to an on-site production of cellulolytic enzymes, allowing a cost reduction of purchase of enzymes, which is critically expensive in the process. In the case SSF requires a mixed cropping between a cellulolytic and an ethanologenic microorganism, for example, using *Acremonium cellulolyticus* for cellulase synthesis, and *S. cerevisiae* to ethanol conversion (Park et al., 2012). Another co-culture reported is between a *Bacillus* sp. with cellulolytic activity, and a fermentative *Klebsiella oxytoca* strain (Tran et al., 2013). However, these mixed systems generally cannot obtain high yields as in separated steps, since the appropriated temperature to cell growth of yeasts is lower than the optimum temperature to get a maximal enzyme performance, typically around 50 °C. This lack of both temperatures is the main bottleneck in SSF, and generally, it can be overcome using thermotolerant yeasts able to ferment at elevated temperatures, such as *Kluyveromyces marxianus* and *Hansenula polymorpha*, or any recombinant strain endowed of thermo-tolerance (Hasunuma & Kondo, 2012).

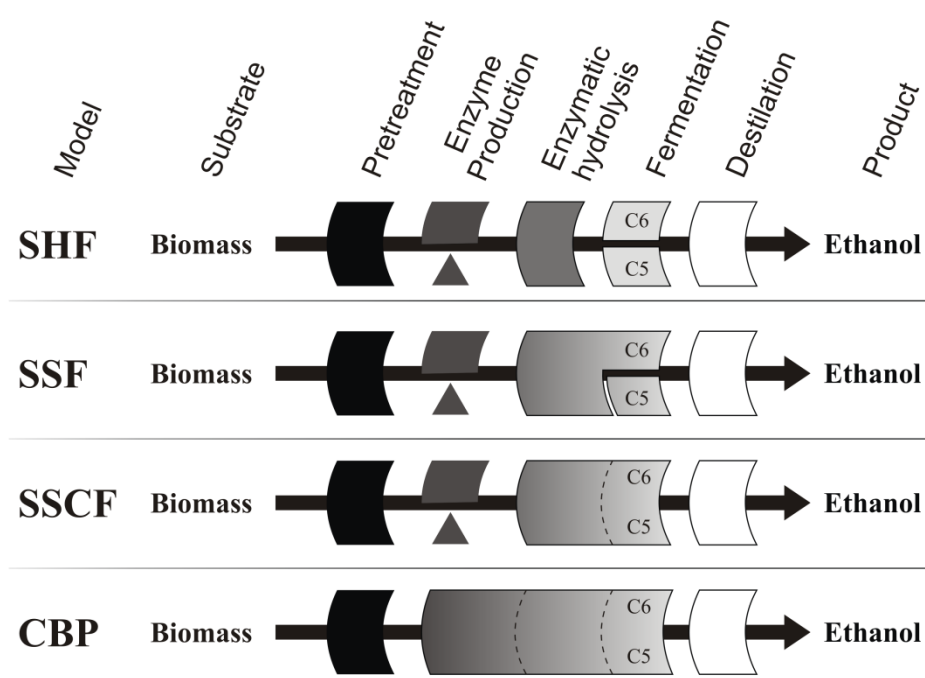
Though SSF model contemplates saccharification and fermentation of hexoses together, the pentose fermentation requires an additional step, since the current industrial

fermentative microorganisms are unable to assimilate xylose and arabinose. Considering also pentoses as a carbon source, the model named Simultaneous Saccharification and Co-fermentation (SSCF) makes use of two fermentative micro-organisms simultaneously in a single reactor, one for C6 sugars, and another one responsible for C5 consumption. In SSCF, many metabolisms occur simultaneously, including multiple enzymatic catalysis besides fermentative reactions. Usually, this model requires tightening of operational controls, in comparison to SHF or SSF. For example, in a co-culture is assumed that the metabolism of different substrates is mutual, though it may be complex to maintain this balance since every type of demand has its own requirements and physiological characteristics. Therefore, the biggest challenge in these mixed systems is to obtain physicochemical conditions favorable and similar to the development of both strains. In SSCF, the main microbial association to ferment lignocellulosic hydrolysates refers to *S. cerevisiae* and *S. stipitis* (Suriyachai et al, 2013; Hanly, Henson, 2013; Yadav et al, 2011; Delgenes et al., 1998; Taniguchi et al, 1997). In this co-culture, for example, yeasts have different requirements according to their oxygen demand, which can be regulated in the process through aeration level inside the reactor, resulting in different speed catalysis of pentoses and hexoses. The close dependence of pentose yeasts to oxygen availability represents the most critical point to establish mixed fermentations with them. For example, if a microaerophilic condition is required by *S. stipitis* for cell multiplication and ethanol accumulation, an anaerobic condition is more favorable to reach high yields with *S. cerevisiae*. One successful way to overcome these metabolic differences in a mixed culture is employing a mutant strain of *S. cerevisiae* with respiratory failure (Taniguchi et al., 1997; Handy, Henson, 2013). Another drawback for pentose yeasts is the ethanol concentration since the xylose consumption tends to start only after complete exhaustion of glucose in the media. The ethanol produced from glucose can act as an inhibitor on *S. stipitis*; then strains with increased tolerance to alcohols are usually preferred for SSCF.

Another microorganism interactions have been proposed for the same purpose in SSCF, such as: *S. cerevisiae* and *Scheffersomyces (Candida) shehatae* (Hickert et al., 2013a), *Zymomonas mobilis* and *S. shehatae* (Delgenes et al., 1996), *Z. mobilis* and *S. stipitis* (Fu et al, 2009; Singh et al, 2013), *Z. mobilis* and *C. tropicalis* (Patle, Lal, 2007),

S. cerevisiae and *Spathaspora arborariae* (Hickert et al., 2013b). The minimum requirement to establish a co-cultivation is that both cultures should be able to grow together, however, there are many other physiological characteristics that must be evaluated preliminarily, due to a high complexity of possible interactions between them, either by cell-to-cell or by signaling substances secreted in the medium (Chen, 2011).

Figure 8. Technological routes proposed to cellulosic ethanol production.



Legend: SHF: Separated Hydrolysis and Fermentation; SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSCF: Simultaneous Saccharification and Co-fermentation; CBP: Consolidated Bioprocessing. Δ = means external production.
Source: elaborated by the authors.

The most complex processing model proposed by cellulosic ethanol is called Consolidated Bioprocess (CBP). In a CBP, a single microorganism must be able to promote all stages of production, including intrinsic cellulolytic and ethanologenic assignments. This model requires the use of genetic engineering to "manufacture" the micro-organism, which can be manipulated from two ways: (1) CBP-I category comprises cellulolytic strains, especially filamentous fungi, and thermophilic bacteria of the genera *Geobacillus* spp. and *Thermoanero bacterium* spp., which are added with a recombinant

ethanologenic function; or (2) CBP-II category, when fermentative microorganisms are engineered to acquire cellulolytic potential, mainly yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces* spp.) and bacteria (*Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*) (Amore & Faraco, 2012). Considering possible to promote enzymatic synthesis in situ, followed by the saccharification of polymers and, finally, alcohol conversion from all monomers in a single process step, the expectation is to make cellulosic ethanol more commercially competitive (Olson et al., 2012). A significant cost reduction comes mainly from the fact that the addition of commercial enzymatic extracts would not be necessary for a CBP. However, this technological route lies far from an industrial application and still demands a lot of improvement for possible application.

Some authors suggest improvements of fermentation step by the use of immobilized yeast in low cost biomaterials, such as own sugarcane bagasse (Chandel et al, 2009; Yu et al, 2010; Singh et al, 2013) or others vegetable wastes with a compatible chemical composition to the process (Kourkoutas et al, 2004; Genisheva et al, 2011; Pacheco et al., 2010; Razmovski, Vučurović, 2012; Plessas et al, 2007). The main advantages of cell immobilization are its easier operational handling, reduced risk of contamination, and higher biological stability and cell viability between production cycles. Specifically on lignocellulosic fermentation, others benefits of cell immobilization could be expected, such as an increasing in conversion rates of pentoses into ethanol, usually low with free cells, and also an increasing in inhibitors and ethanol tolerance by yeasts during their fermentation activity (Bari et al, 2013;. Zhao, Xia, 2010; Talebnia et al, 2005). On the other hand, it was observed that the use of these matrices highly porous could result in a decrease of ethanol productivity, despite the higher cell density (Yu et al., 2010). In the same study, the researchers did a partial enzymatic hydrolysis in sugarcane bagasse aiming to promote slight modifications on the substrate surface, allowing increasing the adsorption of cells and, consequently, increasing the ethanol production. Also, natural processes of immobilization, known as flocculation, may be an alternative against toxic compounds presents in the media from lignocellulosics (Purwadi et al., 2007). Flocculent yeasts are traditionally applied in the

alcoholic beverage industry and in first-generation ethanol production (Zhao, Bai, 2009; Landaeta et al, 2013).

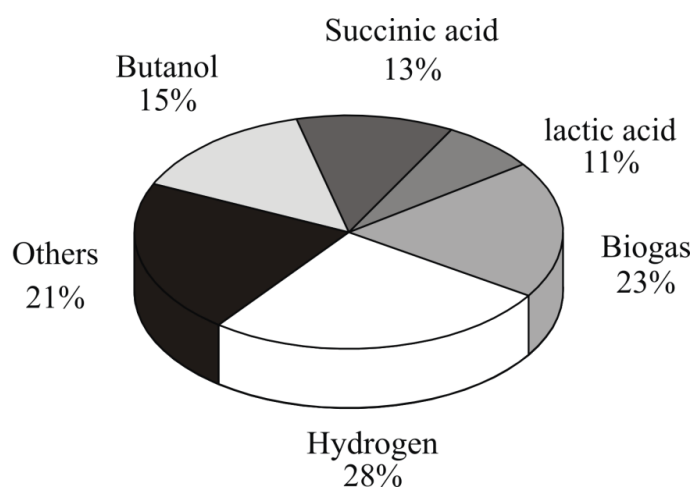
7. Biorefinery and biomass fractionation

The economic viability of lignocellulosic industries for biofuels is still unfeasible and this perception is leading researchers to find solutions to improve the use efficiency of biomass through option of high-value bioproducts as complementary activities to bioenergy using a wider concept of renewable resource platform referred as biorefinery. Biorefineries are emerging industrial units that add a network of processes making use of a several combined technologies focused on the simultaneous production of biofuels, heat energy, chemicals, and high value-added bioproducts from the sustainable and efficient utilization of vegetal biomass as low-cost substrates. The major advantage of these facilities is that they are suitable for maximizing valorization of structural and energetic potentials already available in biomasses. For this reason, cascating approaches are recently suggested as a way to separate naturally synthesized high-value biocompounds – generally sophisticated biomolecules – before processing biomass to save energy and costs in current processes that break them and require to synthesize new ones with their residues (Budzianowski, 2016). These high-value biocompounds cannot be obtained in high amounts because either they appear in low concentrations in vegetal crops or they are synthesized via complex conversion routes with remarkable amounts of by-products. In this sense, there are many needs to develop efficient methods to separate or produce them. On the other hand, biorefineries will generate high-volume of low-value products with well-established technologies, which includes biodiesel, bioethanol, bioelectricity and process bioheat.

Considering that biorefineries will deliver bioenergy and bioproducts, the target biomolecules suitable to be fractionated or synthesized from biomass are biopharmaceuticals, biocosmetics, bionutrients, biochemicals, biofertilizers and biomaterials. If sugarcane bagasse is the substrate, the main compounds that could be produced through integration with new technological routes includes: organic acids (Chen, Zhu, Xia, 2013; Jaros, Rova, Berglund, 2013; Wen et al, 2013; Ye et al, 2013;

Zhao et al, 2013), xylitol (Iverson et al, 2013), lipids for biodiesel production (Babau et al, 2013; Gao et al, 2013; Mondala et al, 2013), isobutanol (Brat, Boles, 2013; Pereira et al, 2014), hydrogen (Zhao, Lu, Wang, 2013), and even electricity (Xia et al., 2013) (Figure 9).

Figure 9. Main compounds studied for the implementation of bio-refinery integrated to cellulosic ethanol process.



Source: elaborated by the authors.

The same biotechnological tools used to improve the production of ethanol are also used to improve the production of these co-products, especially because the yeasts and bacteria are compatible and flexible to a variety of processing. New microorganisms isolated and studied contribute to a higher knowledge of different metabolites able to be industrially explored. For example, the thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, a cellulose degrading strain recently studied, is able to excrete many by-products according to the carbon sources available (D-glucose, D-mannose, L-arabinose, D-arabinose, D-xylose, L-fucose and D-fucose). These by-products are both traditional metabolites (acetate, lactate, glycerol, ethanol), as unusual co-products, such as ethylene glycol (from D-arabinose), acetoin and 2,3-butanediol (from D-glucose, L-arabinose, and D-xylose), and hydroxyacetone (from D-mannose, L-arabinose and D-xylose). The production of ethylene glycol was particularly noteworthy since about 10% of the carbon substrate was converted to it (ISERN et al., 2013). Other studies have reported the

succinic acid production from lignocellulosic hydrolysates (Liang et al., 2013), and hydrogen production from glucose and xylose by *Clostridium beijerinckii* (Ye et al., 2013), or also, from xylose supplemented with anthrahydroquinone-2,6-disulfonate (AH2QDS) in a co-culture system with *Geobacter metallireducens* (Zhang et al., 2013).

8. Final considerations and perspectives

This study relates to an overview of scientific research using sugarcane bagasse as a substrate to second-generation ethanol. It shows that many efforts have been applied to develop feasible pretreatments approaches, to compose efficient enzyme cocktails exploring microbial diversity in nature, and finally to apply and optimize fermentation using the knowledge acquired along four decades in the successful Brazilian first generation ethanol program. All these studies were motivated by the abundance and availability of lignocellulosic biomass as a cheap carbon source, but also because the world claims for a new concept of production where sustainability has a central role. The needs of renewable and clean energy options have stimulated its first studies, but today it is not enough. Currently, cellulosic bioethanol remains unfeasible by technical limitations and uncompetitive to the market due to low prices of petroleum-derived fuels recently dropped by oversupply from hydrofracking processes (Azadi et al., 2016).

A stronger concept of biorefinery has been adopted because it is belief to overcome this scenario with a diversified network of services and products obtained from the same biomass previously aimed only for bioenergy. The success of biorefineries is achieved if it meets economic, environmental and social demands simultaneously (Budzianowski, 2016). Adding value into biotechnological processes from organic wastes to generate high-value biocompounds could turn it feasible to a large-scale production worldwide. A pretentious challenge of biorefineries is how to deliver bioproducts with existing markets but at a reduced cost and/or higher quality. Among all the possibilities of bioproducts, biochemicals represent the largest class of high-value bioproducts readily suitable for biorefineries, especially lactic acid, succinic acid, 3-hydroxypropionic acid (3-HPA), levulinic acid, sorbitol, and xylitol. Carbohydrates represent the main source of substrate for biorefineries, but lignin is also very attractive once it is successful separated

from lignocellulosic biomass. Lignin could generate cheap options of carbon fiber, bioplastics, and bioelastomers based on high-value products as alkyl phenols, dicarboxylic acid and quinone, besides that some lignin-derived phenolic monomers could be implemented as solvents for the extraction of carbohydrate-derived biochemicals, such as formic and levulinic acid, or oxygenated compounds including furfural and hydroxymethylfurfural (Budzianowski, 2016; Azadi et al., 2013). Among others, furfural could be considered one of the most important building blocks originated from lignocellulosic feedstock. Basically, the commercialization of building blocks depends only on the achievement of low-cost production to take place in already existing industries.

Integrated production of bioenergy and bioproducts seems an effective way to achieve industrial processing of sugarcane bagasse to the commercialization of several potential value-added bioproducts. The current ethanol plants in Brazil could be a starting point to integrate new bioprocesses lanes and build flexible facilities which should attend to specific market niches (Santos et al., 2016). Biotechnology industries have a great potential to support economic development with high efficiency and sustainable practices, which make its difference from fossil derived industry.

References

- Abedinifar, S.; Karimi, K.; Et Al. Ethanol Production by *Mucor indicus* And *Rhizopus oryzae* From Rice Straw by Separate Hydrolysis and Fermentation. **Biomass and Bioenergy**, V. 33, N. 5, P. 828–833, 2009.
- Abo-State, M. A. Et Al. Effect of Different Pretreatments on Egyptian Sugar-Cane Bagasse Saccharification and Bioethanol Production. **Egyptian Journal of Petroleum**, V. 22, P. 161–167, 2013.
- Adeboye, P.T.; Bettiga, M.; Olsson, L. The Chemical Nature Of Phenolic Compounds Determines Their Toxicity And Induces Distinct Physiological Responses In *Saccharomyces Cerevisiae* In Lignocellulose Hydrolysates. **Amb Express**, V. 4:46, 2014.
- Adsul, M. G Et Al. Polysaccharides from Bagasse: Applications in Cellulase and Xylanase Production. **Carbohydrate Polymers**, V. 57, P. 67–72, 2004.
- Agbogbo, F. K., & Coward-Kelly, G. Cellulosic Ethanol Production Using the Naturally Occurring Xylose-Fermenting Yeast, *Pichia Stipitis*. **Biotechnology Letters**, V. 30(9), P. 1515–24, 2008.
- Aliyu, M.; Hephher, M. J. Effects of Ultrasound Energy on Degradation of Cellulose Material. **Ultrasonics Sonochemistry**, V. 7, P. 265–268, 2000.
- Almeida, M. N. De Et Al. Direct Ethanol Production From Glucose, Xylose And Sugarcane Bagasse By The Corn Endophytic Fungi *Fusarium Verticillioides* And *Acremonium Zeae*. **Journal Of Biotechnology**, V. 168, N. 1, P. 71–7, 2013.
- Almeida, R. M., Modig, T., Petersson, A., Et Al. Increased Tolerance And Conversion Of Inhibitors In Lignocellulosic Hydrolysates By *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, V. 349, P. 340–349, 2007.
- Alrikssona, B., Horvátha, I.S.; Jönsson, L.J. Overexpression Of *Saccharomyces Cerevisiae* Transcription Factor And Multidrug Resistance Genes Conveys Enhanced Resistance To Lignocellulose-Derived Fermentation Inhibitors. **Process Biochemistry**, V. 45, P. 264–271, 2010.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresour. Technol.** 101, 4851–61, 2010.
- Amorea, A.; Faraco, V. Potential Of Fungi As Category I Consolidated Bioprocessing Organisms For Cellulosic Ethanol Production. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, V. 16, P. 3286– 3301, 2012.
- Aro, N.; Pakula, T.; Pentilla, M. Transcriptional Regulation of Plant Cell Wall Degradation by Filamentous Fungi. **Fems Microbiology**, V. 29, P. 719-739, 2005.

Ask, M. Et Al. The Influence Of Hmf And Furfural On Redox-Balance And Energy-State Of Xylose-Utilizing *Saccharomyces Cerevisiae*. **Biotechnology For Biofuels**, V. 6, N. 1, P. 22, 2013.

Azadi, P., Malina, R., Barrett, S.R.H., Kraft, M.. The evolution of the biofuel science. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 0–1, 2016.

Babau, M. Et Al. Towards A Microbial Production Of Fatty Acids As Precursors Of Biokerosene From Glucose And Xylose. **Oil & Gas Science And Technology**, V. 68, N. 5, P. 899-911, 2013.

Balusu, R., Paduru, R. R., Kuravi, S. K., Seenayya, G., & Reddy, G. Optimization Of Critical Medium Components Using Response Surface Methodology For Ethanol Production From Cellulosic Biomass By *Clostridium Thermocellum* Ss19. **Process Biochemistry**, V. 40(9), P. 3025–3030, 2005.

Barros, R.R.O.; Paredes, R.S.; Endo, T., Bon, E.B.S.; Lee, S-H. Association of Wet Disk Milling and Ozonolysis as Pretreatment for Enzymatic Saccharification of Sugarcane Bagasse and Straw. **Bioresource Technology**, V. 136, P. 288–294, 2013.

Basso, L. C., De Amorim, H. V, De Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. Yeast Selection For Fuel Ethanol Production In Brazil. **Fems Yeast Research**, V. 8(7), P. 1155–1163, 2008.

Benazzi, T., Calgaroto, S., Astolfi, V., Dalla Rosa, C., Oliveira, J. V., & Mazutti, M. A. Pretreatment Of Sugarcane Bagasse Using Supercritical Carbon Dioxide Combined With Ultrasound To Improve The Enzymatic Hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 52, P. 247–50, 2013.

Benjamin, Y.; Cheng, H.; Görgens, J.F. Evaluation of Bagasse from Different Varieties of Sugarcane by Dilute acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, V. 51, P. 7– 18, 2013.

Binod, P.; Satyanagalakshmi, K.; Sindhu, R.; Janu, K. U.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A. Short Duration Microwave Assisted Pretreatment Enhances The Enzymatic Saccharification And Fermentable Sugar Yield From Sugarcane Bagasse. **Renewable Energy**, V. 37, P. 109-116, 2012.

Brat, D. E Boles, E. Isobutanol Production From D-Xylose By Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*. **Fems Yeast Research**, V. 13, N. 2, P. 241–4, 2013.

Brethauer, S., & Wyman, C. E. Review: Continuous Hydrolysis And Fermentation For Cellulosic Ethanol Production. **Bioresource Technology**, V. 101(13), P. 4862–74, 2010.

Budzianowski, W.M., 2016. High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable bioenergy series. **Renew. Sustain. Energy Rev.** doi:10.1016/j.rser.2016.11.260

Bundaleska, N.; Saavedra, R.; Tatarova, E.; Et Al. Microwave Plasma Based Sugarcane Biomass Pretreatment. **Journal of Physics and Applied Physics**, P. 1–4, 2000.

Bunterngsook, B.; Eurwilaichitr, L; Thamchaipenet, A.; Champreda, V. Binding Characteristics and Synergistic Effects of Bacterial Expansins on Cellulosic and Hemicellulosic Substrates. **Bioresource Technology**, V. 176, P. 129–135, 2015.

Cadete, R. M. Et Al. *Spathaspora brasiliensis* Sp. Nov., *Spathaspora suhii* sp. Nov., *Spathaspora roraimanensis* Sp. Nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. Nov., Four Novel (D)-Xylose-Fermenting Yeast Species from Brazilian Amazonian Forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**, V. 103, N. 2, P. 421–31, 2013.

Camassola, M.; Dillon, A. J. P. Biological Pretreatment of Sugar Cane Bagasse for the Production of Cellulases and Xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, V. 29, N. 2-3, P. 642–647, 2009.

Cao, S.; Aita, G. M. Enzymatic Hydrolysis And Ethanol Yields Of Combined Surfactant And Dilute Ammonia Treated Sugarcane Bagasse. **Bioresource Technology**, V. 131, P. 357–64, 2013.

Casey, E. Et Al. Effect Of Salts On The Co-Fermentation Of Glucose And Xylose By A Genetically Engineered Strain Of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology For Biofuels**, V. 6, N. 1, P. 83, 2013.

Cassia Pereira, J., Travaini, R., Paganini Marques, N., Bolado, S., Bocchini Martins, D.A. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresour. Technol.** 204, 122–129, 2016.

Castro, A. M. & Pereira Jr, N. Produção, Propriedades E Aplicação De Celulases Na Hidrólise De Resíduos Agroindustriais. **Química Nova**, V.33, P. 181-188, 2010.

Chandel, A. K. Et Al. Bioconversion Of Pentose Sugars Into Ethanol : A Review And Future Directions. **Biotechnology And Molecular Biology Review**, V. 6, P. 8–20, 2011.

Chandel, A. K., Narasu, M. L., Chandrasekhar, G., Manikyam, A, & Rao, L. V. Use Of *Saccharum spontaneum* (Wild Sugarcane) As Biomaterial For Cell Immobilization And Modulated Ethanol Production By Thermotolerant *Saccharomyces Cerevisiae* Vs3. **Bioresource Technology**, V. 100(8), P. 2404–10, 2009.

Chandel, A.K.; Kapoor, R.K.; Et Al. Detoxification of Sugarcane Bagasse Hydrolysate Improves Ethanol Production by *Candida shehatae* Ncim 3501. **Bioresource Technology**, V. 98, N. 10, P. 1947–50, 2007.

Chen, M., Qin, Y., Liu, Z., Liu, K., Wang, F., Qu, Y. Isolation and Characterization of a Beta-Glucosidase from *Penicillium decumbens* And Improving Hydrolysis of Corncob

Residue by Using It as Cellulase Supplementation. **Enzyme Microbiology Technology**, V. 46, P. 444–449, 2010.

Chen, T.; Zhu, N.; Xia, H. Aerobic Production Of Succinate From Arabinose By Metabolically Engineered *Corynebacterium Glutamicum*. **Bioresource Technology**, V. 151, P. 411–414, 2013.

Chen, W. H.; Tu, Y. J.; Sheen, H. K. Disruption Of Sugarcane Bagasse Lignocellulosic Structure By Means Of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment With Microwave-Assisted Heating. **Applied Energy**, V. 88, P. 2726–2734, 2011.

Chen, Y. Development and Application of Co-Culture for Ethanol Production by Co-Fermentation of Glucose and Xylose: A Systematic Review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, V. 38(5), P. 581–97, 2011.

Chundawat, S. P.S. Et Al. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, V. 2, P. 121–145, 2011.

Crespo, C.F.; Badshah, M.; Et Al. Ethanol Production by Continuous Fermentation of D-(+)-Cellobiose, D-(+)-Xylose And Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using The Thermoanaerobe *Caloramator boliviensis*. **Bioresource Technology**, V. 103, N. 1, P. 186–191, 2012.

Cunha-Pereira, F. Da; Hickert, L.R.; Et Al. Conversion of Sugars Present in Rice Hull Hydrolysates into Ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and Their Co-Fermentations. **Bioresource Technology**, V. 102, N. 5, P. 4218–4225, 2011.

Dantas, G. A., Legey, L. F. L., & Mazzone, A. Energy From Sugarcane Bagasse In Brazil: An Assessment Of The Productivity And Cost Of Different Technological Routes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 21, P. 356–364, 2013.

De Bari, I., De Canio, P., Cuna, D., Liuzzi, F., Capece, A., & Romano, P. Bioethanol Production From Mixed Sugars By *Scheffersomyces stipitis* Free And Immobilized Cells, And Co-Cultures With *Saccharomyces Cerevisiae*. **New Biotechnology**, V. 30(6), P. 591–7, 2013.

Delabona, P. Da Silva, Et Al. Understanding The Cellulolytic System of *Trichoderma harzianum* P49p11 and Enhancing Saccharification of Pretreated Sugarcane Bagasse by Supplementation with Pectinase and A-L-Arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, V. 131, P. 500–507, 2013.

Delgenes, J. P., Escare, M. C., Laplace, J. M., Moletta, R., & Navarro, J. M. Biological Production Of Industrial Chemicals, I.E. Xylitol And Ethanol, From Lignocelluloses By Controlled Mixed Culture Systems. **Industrial Crops and Products**, V. 7, P. 101–111, 1998.

Delgenes, J. P., Moletta, R., & Navarro, J. M. Effects Of Lignocellulose Degradation Products On Ethanol Fermentations Of Glucose And Xylose By *Saccharomyces Cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 229(95), P. 220–225, 1999.

Demeke, M. M. Et Al. Development Of A D-Xylose Fermenting And Inhibitor Tolerant Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strain With High Performance In Lignocellulose Hydrolysates Using Metabolic And Evolutionary Engineering. **Biotechnology For Biofuels**, V. 6, N. 1, P. 89, 2013b.

Demeke, M. M., Dumortier, F., Li, Y., Broeckx, T., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. Combining Inhibitor Tolerance and D-Xylose Fermentation in Industrial *Saccharomyces cerevisiae* for Efficient Lignocellulose-Based Bioethanol Production. **Biotechnology for Biofuels**, V. 6(1), P. 120, 2013a.

Den Haana, R.; Rosea, S.H.; Lyndb, L.R.; Van Zyl, W.H. Hydrolysis And Fermentation Of Amorphous Cellulose By Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, V. 9, P. 87–94, 2007.

Dias, M. O. S.; Ensinas, A. V.; Nebra, S. A.; Et Al. Production Of Bioethanol And Other Bio-Based Materials From Sugarcane Bagasse: Integration To Conventional Bioethanol Production Process. **Chemical Engineering Research and Design**, V. 87, N. 9, P. 1206–1216, 2009.

Dien, B. S. Et Al. Screening For L-Arabinose Fermenting Yeasts. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, V. 57-58, P. 233–42, 1996.

Fan, C. Et Al. Efficient Ethanol Production From Corncob Residues By Repeated Fermentation Of An Adapted Yeast. **Bioresource Technology**, V. 136, P. 309–15, 2013.

Fan, C.; Qi, K.; Et Al. Efficient Ethanol Production from Corncob Residues by Repeated Fermentation of an Adapted Yeast. **Bioresource Technology**, V. 136, P. 309–15, 2013.

Fang, H.; Zhao, C.; Song, X.; Chen, M.; Chang, Z.; Chu, J. Enhanced Cellulolytic Enzyme Production By The Synergism Between *Trichoderma reesei* Rut-C30 And *Aspergillus Niger* N102 And By The Addition Of Surfactants. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, V. 18, P. 390-398, 2013.

Farias, D.; Andrade, R. R.; Maugeri-Filho, F. Kinetic Modeling Of Ethanol Production By *Scheffersomyces Stipitis* From Xylose. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Doi:10.1007/S12010-013-0546-Y, 2013.

Fu, N., Peiris, P., Markham, J., & Bavor, J. A Novel Co-Culture Process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for Efficient Ethanol Production on Glucose/Xylose Mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, 45(3), 210–217, 2009.

- Gao, D. Et Al. Microbial Lipid Production From Xylose By *Mortierella Isabellina*. **Bioresource Technology**, V. 133, P. 315–21, 2013.
- Gao, L., & Xia, L. Sm-Like Protein Enhanced Tolerance of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to Inhibitors in Hemicellulosic Hydrolysate. **Bioresource Technology**, 124, 504–7, 2012.
- Genisheva, Z., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., & Teixeira, J. A. Evaluating The Potential Of Wine-Making Residues And Corn Cobs As Support Materials For Cell Immobilization For Ethanol Production. **Industrial Crops and Products**, 34(1), 2011.
- Gitifar, V.; Eslamloueyan, R.; Sarshar, M. Experimental Study and Neural Network Modeling of Sugarcane Bagasse Pretreatment with H₂SO₄ and O₃ for Cellulosic Material Conversion to Sugar. **Bioresource Technology**, V. 148, P. 47–52, 2013.
- Gong, C. S. Et Al. Conversion Of Pentoses By Yeasts. **Biotechnology And Bioengineering**, V. 25, N. 1, P. 85–102, 1983.
- Gong, C. S. Et Al. Production Of Ethanol From D-Xylose By Using D-Xylose Isomerase And Yeasts. **Applied And Environmental Microbiology**, V. 41, N. 2, P. 430–6, 1981.
- Gunata, Z., Vallier, M.J. Production of a Highly Glucose-Tolerant Extracellular Beta-Glucosidase by Three *Aspergillus* strains. **Biotechnol. Lett.** V.21, P. 219–223, 1999.
- Guo, C. E Jiang, N. Physiological And Enzymatic Comparison Between *Pichia Stipitis* And Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* On Xylose Fermentation. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, V. 29, N. 3, P. 541–7, 2013.
- Gurgel, L. V. A.; Pimenta, M. T. B.; Curvelo, A. A. D. S. Enhancing Liquid Hot Water (LHW) Pretreatment Of Sugarcane Bagasse By High Pressure Carbon Dioxide (Hp-Co₂). **Industrial Crops and Products**, V. 57, P. 141–149, 2014.
- Ha, S., Galazka, J. M., Rin, S., Choi, J., Yang, X., & Seo, J. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Capable of Simultaneous Cellobiose and Xylose Fermentation. **PNAS**, V. 108 (2), P. 1–6, 2011.
- Hanly, T. J. E Henson, M. A. Dynamic Metabolic Modeling Of A Microaerobic Yeast Co-Culture: Predicting And Optimizing Ethanol Production From Glucose/Xylose Mixtures. **Biotechnology For Biofuels**, V. 6, N. 1, P. 44, 2013.
- Hanly, T. J., & Henson, M. A. Dynamic Metabolic Modeling of a Microaerobic Yeast Co-Culture: Predicting and Optimizing Ethanol Production from Glucose/Xylose Mixtures. **Biotechnology for Biofuels**, 6(1), 44, 2013.
- Hasunuma, T., Ismail, K. S. K., Nambu, Y., & Kondo, A. Co-Expression Of Tal1 And Adh1 In Recombinant Xylose-Fermenting *Saccharomyces Cerevisiae* Improves Ethanol

Production From Lignocellulosic Hydrolysates In The Presence Of Furfural. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 117(2), 165–9, 2014.

Hasunuma, T.; Kondo, A. Consolidated Bioprocessing And Simultaneous Saccharification And Fermentation Of Lignocellulose To Ethanol With Thermotolerant Yeast Strains. **Process Biochemistry**, V. 47, N. 9, P. 1287–1294, 2012.

He, Q.; Lokken, P.M.; Et Al. Characterization of the Impact of Acetate and Lactate on Ethanolic Fermentation by *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Bioresource Technology**, V. 100, N. 23, P. 5955–5965, 2009.

Hector, R. E. Et Al. Growth And Fermentation Of D-Xylose By *Saccharomyces Cerevisiae* Expressing A Novel D-Xylose Isomerase Originating From The Bacterium *Prevotella Ruminicola* Tc2-24. **Biotechnology For Biofuels**, V. 6, N. 1, P. 1, 2013.

Henrissat, B., Bairoch, A. Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases. **Biochem. Journal**, V. 316, P. 695–696, 1996.

Hickert, L. R., Da Cunha-Pereira, F., De Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. Ethanogenic Fermentation Of Co-Cultures Of *Candida shehatae* Hm 52.2 And *Saccharomyces cerevisiae* Icv D254 In Synthetic Medium And Rice Hull Hydrolysate. **Bioresource Technology**, 131, 508–14, 2013a.

Hickert, L. R., De Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. Simultaneous Saccharification And Co-Fermentation Of Un-Detoxified Rice Hull Hydrolysate By *Saccharomyces Cerevisiae* Icv D254 And *Spathaspora Arborariae* NRRL Y-48658 For The Production Of Ethanol And Xylitol. **Bioresource Technology**, 143, 112–6, 2013b.

Hu, J.; Arantes, V.; Pribowo, A.; Gourlay, K.; Saddler, J.N. Substrate Factors That Influence The Synergistic Interaction Of Aa9 And Cellulases During The Enzymatic Hydrolysis Of Biomass. **Energy Environ. Sci.**, V. 7, P. 2308-2315, 2014.

Irfan, M.; Nadeem, M.; Syed, Q. Influence of Nutritional Conditions for Endoglucanase Production by *Trichoderma viride* in SSF. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry** V. 7, P. 7-12, 2012.

Isern, N. G. Et Al. Novel Monosaccharide Fermentation Products In *Caldicellulosiruptor Saccharolyticus* Identified Using Nmr Spectroscopy. **Biotechnology For Biofuels**, V. 6, N. 1, P. 47, 2013.

Iverson, A. Et Al. Increasing Reducing Power Output (Nadh) Of Glucose Catabolism For Reduction Of Xylose To Xylitol By Genetically Engineered *Escherichia Coli* Ai05. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, V. 29, N. 7, P. 1225–32, 2013.

Jaros, A. M.; Rova, U. E Berglund, K. A. Acetate Adaptation Of *Clostridia Tyrobutyricum* For Improved Fermentation Production Of Butyrate. **Springerplus**, V. 2, N. 1, P. 47, 2013.

- Kamei, I. Et Al. Direct Ethanol Production from Cellulosic Materials by the Hypersaline-Tolerant White-Rot Fungus *Phlebia* sp. Mg-60. **Bioresour. Technol**, V. 112, P. 137 - 142, 2012.
- Karatzos, S. K.; Edye, L. A.; Doherty, W. O. S. Sugarcane Bagasse Pretreatment Using Three Imidazolium-Based Ionic Liquids; Mass Balances And Enzyme Kinetics. **Biotechnology for Biofuels**, V. 5, N. 1, P. 62, 2012.
- Karimi, K.; Edebo, L.; Et Al. *Mucor Indicus* as a Biofilter and Fermenting Organism in Continuous Ethanol Production from Lignocellulosic Hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, V. 39, P. 383–388, 2008.
- Karimi, K.; Emtiazi, G.; Et Al. Production of Ethanol and Mycelial Biomass from Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate by *Mucor indicus*. **Process Biochemistry**, V. 41, P. 653–658, 2006.
- Kato, H. Et Al. Cocktail Δ -Integration Of Xylose Assimilation Genes For Efficient Ethanol Production From Xylose In *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, V. 116, N. 3, P. 333–6, 2013.
- Kazi, F.K.; Fortman, J.; Anex, R.; Et Al. Techno-Economic Analysis of Biochemical Scenarios for Production of Cellulosic Ethanol. **Technical Report NREL/Tp-6a2-46588**, June 2010.
- Khattab, S. M. R.; Saimura, M. E Kodaki, T. Boost In Bioethanol Production Using Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* With Mutated Strictly NADPH-Dependent Xylose Reductase And NADP(+)-Dependent Xylitol Dehydrogenase. **Journal Of Biotechnology**, V. 165, N. 3-4, P. 153–6, 2013.
- Khelil, O.; Cheba, B. Thermophilic Cellulolytic Microorganisms from Western Algerian Sources: Promising Isolates for Cellulosic Biomass Recycling. **Procedia Technology**, V. 12, P. 519–528, 2014.
- Khrantsov, N.; Mcdade, L.; Amerik, A. Et Al. Industrial Yeast Strain Engineered To Ferment Ethanol From Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, V. 102, P. 8310–8313, 2011.
- Khuong, L.D.; Kondo, R.; De Leon, R.; Et Al. Effect of Chemical Factors on Integrated Fungal Fermentation of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production by a White-Rot Fungus, *Phlebia* Sp. Mg-60. **Bioresource Technology**, V. 167, P. 33–40, 2014.
- Kim, B. Et Al. Combinatorial Design Of A Highly Efficient Xylose-Utilizing Pathway In *Saccharomyces Cerevisiae* For The Production Of Cellulosic Biofuels. **Applied And Environmental Microbiology**, V. 79, N. 3, P. 931–41, 2013.
- Kim, I. Et Al. Effect Of Nitric Acid On Pretreatment And Fermentation For Enhancing Ethanol Production Of Rice Straw. **Carbohydrate Polymers**, V. 99, P. 563–567, 2014.

- Kim, S. R. Et Al. Strain Engineering Of *Saccharomyces Cerevisiae* For Enhanced Xylose Metabolism. **Biotechnology Advances**, V. 31, N. 6, P. 851–61, 2013.
- Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. **Biotechnol. Prog.** 25, 340–348, 2009.
- Ko, J.K., Ximenes, E., Kim, Y., Ladisch, M.R. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. **Biotechnol. Bioeng.** 112, 447–456, 2015.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. ., Marchant, R., & Koutinas, A. Immobilization Technologies and Support Materials Suitable In Alcohol Beverages Production: A Review. **Food Microbiology**, 21(4), 377–397, 2004.
- Krishnan, C.; Sousa, L. D. C.; Jin, M.; Et Al. Alkali-Based AFEX Pretreatment for the Conversion of Sugarcane Bagasse and Cane Leaf Residues to Ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 107, N. 3, P. 441–50, 2010.
- Krogga, K. B. R. M. Et Al. Cloning Of A Gh5 Endoglucanase From Genus *Penicillium* And Its Binding To Different Lignins. **Enzyme and Microbial Technology**, 44, P. 359–367, 2009.
- Landaeta, R., Aroca, G., Acevedo, F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. Adaptation of a Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain To Lignocellulosic Inhibitors By Cell Recycle Batch Fermentation. **Applied Energy**, 102, 124–130, 2013.
- Lee, H., Cho, D. H., Kim, Y. H., Shin, S.-J., Kim, S. B., Han, S. O., Park, C. Tolerance Of *Saccharomyces cerevisiae* K35 To Lignocellulose-Derived Inhibitory Compounds. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 16(4), 755–760, 2011.
- Lennartsson, P.R.; Erlandsson, P. ; Taherzadeh, M.J. Integration Of The First And Second Generation Bioethanol Processes And The Importance Of By-Products. **Bioresource Technology**, V. 165, P. 3–8, 2014.
- Li, B.-Z.; Balan, V.; Yuan, Y.-J.; Dale, B. E. Process Optimization To Convert Forage And Sweet Sorghum Bagasse To Ethanol Based On Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment. **Bioresource Technology**, V. 101, N. 4, P. 1285–92, 2010.
- Li, C., Yoshimoto, M., Tsukuda, N., Fukunaga, K., & Nakao, K. A Kinetic Study on Enzymatic Hydrolysis of a Variety of Pulps for Its Enhancement with Continuous Ultrasonic Irradiation. **Biochemical Engineering Journal**, 19(2), 155–164, 2004.
- Li, S.; Yang, X.; Yang, S.; Zhu, M.; Wang, X. Technology Prospecting On Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, V. 2, N. 3, P. 1-11, 2012.
- Liang, L.; Liu, R.; Et Al. Repetitive Succinic Acid Production from Lignocellulose Hydrolysates by Enhancement of ATP Supply in Metabolically Engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, V. 143, P. 405–12, 2013.

- Liang, M.; Kim, M.H.; Et Al. Impact of Pseudo-Continuous Fermentation on the Ethanol Tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V. 116, N. 3, P. 319–26, 2013.
- Liang, M.; He, Q. P.; Et Al. Elucidating Xylose Metabolism Of *Scheffersomyces stipitis* By Integrating Principal Component Analysis With Flux Balance Analysis. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, V. 2, P. 38-48, 2013a.
- Liang, X., Yoshida, T., & Uryu, T. Direct Saccharification and Ethanol Fermentation of Cello-Oligosaccharides with Recombinant Yeast. **Carbohydrate Polymers**, V. 91(1), P. 157–61, 2013b.
- Lin, Y.; Tanaka, S. Ethanol Fermentation From Biomass Resources: Current State And Prospects. **Applied Microbiology And Biotechnology**, V. 69, P. 627-642, 2006.
- Liu, C.; Suna, R.; Qin, M.; Zhang, A.; Rena, J.; Xub, F.; Ye, J.; Wu, S. Chemical Modification Of Ultrasound-Pretreated Sugarcane Bagasse With Maleic Anhydride. **Industrial Crops and Products**, V.26, P. 212–219, 2007.
- Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A, Kurtzman, C. P., & Gorsich, S. W. Adaptive Response of Yeasts to Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural and New Chemical Evidence for HMF Conversion to 2,5-Bis-Hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 31(8), 345–52, 2004.
- Lorliam, W. Et Al. Diversity And Fermentation Products Of Xylose-Utilizing Yeasts Isolated From Buffalo Feces In Thailand. **Microbes And Environments**, V. 28, N. 3, P. 354–360, 2013.
- Lulu, L. Et Al. Identification Of A Xylitol Dehydrogenase Gene From *Kluyveromyces Marxianus* Nbr1777. **Molecular Biotechnology**, V. 53, N. 2, P. 159–69, 2013.
- Maehara, T. Et Al. Ethanol Production from High Cellulose Concentration by the Basidiomycete Fungus *Flammulina velutipes*. **Fungal Biology**, V. 117, P. 220 -226, 2013.
- Maiorella, B.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. By-Product Inhibition Effects on Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioeng**. V. 25, P.103–121, 1983.
- Mart, C.; Thomsen, A. B. Wet Oxidation Pretreatment of Lignocellulosic Residues of Sugarcane, Rice, Cassava and Peanuts for Ethanol Production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, V. 82, P. 174–181, 2007.
- Martín, C.; Puls, J.; Saake, B.; Schreiber, A. Effect of Glycerol Pretreatment on Component Recovery and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Cellulose Chemistry and Technology**, V. 45, P. 487–494, 2011.

Matano, Y., Hasunuma, T., & Kondo, A. Cell Recycle Batch Fermentation Of High-Solid Lignocellulose Using A Recombinant Cellulase-Displaying Yeast Strain For High Yield Ethanol Production In Consolidated Bioprocessing. **Bioresource Technology**, 135, 403–9. 2013.

Matsushika, A. E Sawayama, S. Characterization Of A Recombinant Flocculent *Saccharomyces Cerevisiae* Strain That Co-Ferments Glucose And Xylose: Influence Of The Ratio Of Glucose / Xylose On Ethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol.**, V. 168, P. 712–721, 2013.

Mawadza, C. Purication and Characterization of Cellulases Produced By Two *Bacillus* Strains. **Journal of Biotechnology**, V.83, P.177-187, 2000.

Merino St, Cherry J. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. **Adv. Biochem Eng Biotechnol**, V.108, P.95-120, 2007.

Mesa, L.; González, E.; Romero, I.; Ruiz, E.; Cara, C.; Castro, E. Comparison Of Process Configurations For Ethanol Production From Two-Step Pretreated Sugarcane Bagasse. **Chemical Engineering Journal**, V. 175, P. 185– 191, 2011.

Millati, R.; Edebo, L.; Et Al. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in Ethanol Production from Glucose, Xylose, and Wood Hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 36, P. 294–300, 2005.

Mondala, A. Et Al. Enhanced Microbial Oil Production By Activated Sludge Microorganisms Via Co-Fermentation Of Glucose And Xylose. **Aiche Journal**, V. 59, N. 11, Doi:10.1002/Aic, 2013.

Mood, S.H.; Golfeshan, A.H.; Tabatabaei, M.; Et Al. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 27, P. 77–93, 2013.

Moon, J., Lewis Liu, Z., Ma, M., & Slininger, P. J. New Genotypes Of Industrial Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Engineered With Yxi And Heterologous Xylose Transporters Improve Xylose Utilization And Ethanol Production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2(3), 247–254, 2013.

Morais, C. G. Et Al. D-Xylose-Fermenting And Xylanase-Producing Yeast Species From Rotting Wood Of Two Atlantic Rainforest Habitats In Brazil. **Fungal Genetics And Biology**, 2013.

Moreno, A. D. Et Al. Ethanol From Laccase-Detoxified Lignocellulose By The Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus*—Effects Of Steam Pretreatment Conditions, Process Configurations And Substrate Loadings. **Biochemical Engineering Journal**, V. 79, P. 94–103, 2013.

Moreno, Antonio D Et Al. In Situ Laccase Treatment Enhances The Fermentability Of Steam-Exploded Wheat Straw In Sscf Processes At High Dry Matter Consistencies.

Bioresource Technology, V. 143, P. 337–43, 2013.

Moretti, M. M. S. Et Al. Selection of Thermophilic and Thermotolerant Fungi for the Production of Cellulases and Xylanases under Solid-State Fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, P. 1062–71, 2012.

Moretti, M. M. S.; Bocchini-Martins, D. A.; Nunes, C. C. C.; Villena, M. A.; Perrone, O. M.; Dasilva, R.; Boscolo, M.; Gomes, E. Pretreatment Of Sugarcane Bagasse With Microwaves Irradiation And Its Effects On The Structure And On Enzymatic Hydrolysis. **Applied Energy**, V. 122, P. 189–195, 2014.

Morone, A.; & Pandey, R. A. Lignocellulosic Biobutanol Production: Gridlocks and Potential Remedies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 37, P. 21–35, 2014.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. Features Of Promising Technologies For Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass.

Bioresource Technology, V. 96, P. 673–686, 2005.

Nanda, S., Mohammad, J., Reddy, S. N., Kozinski, J. A., & Dalai, A. K. Pathways Of Lignocellulosic Biomass Conversion To Renewable Fuels. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2013.

Nigam, J. N. Et Al. Isolation And Screening Of Yeasts That Ferment D-Xylose Directly To Ethanol. **Applied And Environmental Microbiology**, V. 50, N. 6, P. 1486–9, 1985.

Nitayavardhana, S.; Rakshit, S. K.; Grewell, D.; Leeuwen, J. H. Van; Khanal, S. K. Ultrasound Pretreatment Of Cassava Chip Slurry To Enhance Sugar Release For Subsequent Ethanol Production. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 101, N. 3, P. 487–96, 2008.

Novo, L.P.; Gurgel, L.V.A.; Marabezi, K.; Curvelo, A.A.S. Delignification of Sugarcane Bagasse Using Glycerol–Water Mixtures to Produce Pulps for Saccharification. **Bioresource Technology**, V. 102, P. 10040–10046, 2011.

Okamoto, K.; Kanawaku, R.; Et Al. Efficient Xylose Fermentation by the Brown Rot Fungus *Neolentinus Lepideus*. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 50, N. 2, P. 96–100, 2012.

Okamoto, K.; Nitta, Y.; Et Al. Direct Ethanol Production from Starch, Wheat Bran and Rice Straw by the White Rot Fungus *Trametes hirsuta*. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 48, N. 3, P. 273–277, 2011.

Oliveira, F.M.V.; Pinheiro, I.O.; Souto-Maior, A.M.; Martin, C.; Gonçalves, A.R.; Rocha, G.J.M. Industrial-Scale Steam Explosion Pretreatment Of Sugarcane Straw For

Enzymatic Hydrolysis Of Cellulose For Production Of Second Generation Ethanol And Value-Added Products. **Bioresource Technology**, V. 130, P. 168–173, 2013.

Oliveira, L.R.M.; Nascimento, V.M.; Gonçalves, A.R.; Rocha, G.J.M. Combined Process System for the Production of Bioethanol from Sugarcane Straw. **Industrial Crops and Products**, V. 58, P. 1–7, 2014.

Olson, D.G., McBride, J.E.; Shaw, A.J.; Lynd, L.R. Recent Progress In Consolidated Bioprocessing. **Current Opinion In Biotechnology**, V. 23, P. 396–405, 2012.

Olsson, L. E Hahn-Hägerdal, B. Fermentation Of Lignocellulosic Hydrolysates For Ethanol Production. **Enzyme And Microbial Technology**, V. 18, N. 5, P. 312–331, 1996.

Pacheco, A. M., Gondim, D. R., & Gonçalves, L. R. B. Ethanol Production By Fermentation Using Immobilized Cells Of *Saccharomyces Cerevisiae* In Cashew Apple Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 161(1-8), 209–17. 2010.

Pal, S. Et Al. Mustard Stalk and Straw: A New Source for Production of Lignocellulolytic Enzymes by the Fungus *Termitomyces clypeatus* and as a Substrate for Saccharification. **Industrial Crops and Products**, V.41, P. 283– 288, 2013.

Palmqvist, E.; & Hahn-Hagerdal, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. Ii: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition. **Bioresource Technology**, V. 74, P. 25-33, 2000.

Palonen, H. Et Al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and Eg Ii and Their Catalytic Domains on Steam Pretreated Softwood and Isolated Lignin. **Journal of Biotechnology**, V.107, P.65–72, 2004.

Panagiotou, G.; Christakopoulos, P.; Et Al. Fermentation Performance and Intracellular Metabolite Profiling Of *Fusarium oxysporum* Cultivated On a Glucose-Xylose Mixture. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 36, P. 100–106, 2005.

Panneerselvam, A.; Sharma-Shivappa, R. R.; Kolar, P.; Clare, D. A; Ranney, T. Hydrolysis of Ozone Pretreated Energy Grasses for Optimal Fermentable Sugar Production. **Bioresource Technology**, V. 148, P. 97–104, 2013.

Park, E. Y., Naruse, K., & Kato, T. One-Pot Bioethanol Production from Cellulose by Co-Culture of *Acremonium cellulolyticus* And *Saccharomyces Cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, 5(1), 64. 2012.

Park, J.-Y. Et Al. Expression Of Bacterial Xylose Isomerase In *Saccharomyces Cerevisiae* Under Galactose Supplemented Condition. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, V. 18, N. 3, P. 528–532, 2013.

Patle, S., & Lal, B. Ethanol Production from Hydrolysed Agricultural Wastes Using Mixed Culture of *Zymomonas mobilis* And *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, 29(12), 1839–43, 2007.

Pentjuss, A., Odzina, I., Kostromins, A., Fell, D. A, Stalidzans, E., & Kalnenieks, U. Biotechnological Potential of Respiring *Zymomonas Mobilis*: A Stoichiometric Analysis of Its Central Metabolism. **Journal of Biotechnology**, 165(1), 1–10, 2013.

Pereira, J. C. Et Al. Production and Characterization Of B-Glucosidase Obtained by The Solid-State Cultivation of the Thermophilic Fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014.

Perrone, O.M., Colombari, F.M., Rossi, J.S., Moretti, M.M.S., Bordignon, S.E., Nunes, C. da C.C., Gomes, E., Boscolo, M., Da-Silva, R., 2016a. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresour. Technol.** 218, 69–76.

Perrone, O.M., Rossi, J.S., Maria, M., Moretti, D.S., Carreira, C., Bordignon, S.E., Gomes, E., Da-silva, R., Boscolo, M., 2016b. Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment: Effects on the fiber and enzymatic saccharification. **Bioresour. Technol.**, *in press*.

Plessas, S., Bekatorou, A, Koutinas, A, Soupioni, M., Banat, I. M., & Marchant, R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Immobilized on Orange Peel as Biocatalyst for Alcoholic Fermentation. **Bioresource Technology**, 98(4), 860–5, 2007.

Purwadi, R., Brandberg, T., & Taherzadeh, M. J. A Possible Industrial Solution to Ferment Lignocellulosic Hydrolyzate to Ethanol : Continuous Cultivation with Flocculating Yeast. **Int. Journal of Molecular Sciences**, 8, 920–932, 2007.

Rabelo, S. C.; Amezquita Fonseca, N. A.; Andrade, R. R.; Maciel Filho, R.; Costa, A. C. Ethanol Production From Enzymatic Hydrolysis Of Sugarcane Bagasse Pretreated With Lime And Alkaline Hydrogen Peroxide. **Biomass and Bioenergy**, V. 35, N. 7, P. 2600–2607, 2011.

Ramadoss, G.; Muthukumar, K. Ultrasound Assisted Ammonia Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Fermentable Sugar Production. **Biochemical Engineering Journal**, V. 83, P. 33–41, 2014.

Ramos, L. P. The Chemistry Involved In Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. **Química Nova**, V. 26, N. 6, P. 863-871, 2003.

Razmovski, R., & Vučurović, V. Bioethanol Production From Sugar Beet Molasses And Thick Juice Using *Saccharomyces Cerevisiae* Immobilized On Maize Stem Ground Tissue. **Fuel**, 92(1), 1–8, 2012.

- Renó, M.L.G.; Olmo, O.A.; Palacio, J.C.E.; Lora, E.E.S.; Venturini, O.J. Sugarcane Biorefineries: Case Studies Applied To The Brazilian Sugar–Alcohol Industry. **Energy Conversion And Management**, V. 86, P. 981–991, 2014.
- Richard, P. Et Al. Production Of Ethanol From -Arabinose By Containing A Fungal - Arabinose Pathway. **Fems Yeast Research**, V. 3, N. 2, P. 185–189, 2003.
- Ridruejo, J.C.; Mufioz, M.D.; Andaluz, E.; Larriba, G. Inhibition of Yeast Exoglucanases by Glucosidase Inhibitors. **Biochemistry et Biophysica Acta**, V. 993, P. 179-185, 1989.
- Riou, C., Salmon, J.M., Vallier, M.J., Gunata, Z., Barre, P. Purification, Characterization, And Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant Beta-Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.** V.64, P.3607–3614, 1998.
- Rocha, G. J. M.; Silva, V. F. N.; Martín, C.; Et Al. Effect of Xylan and Lignin Removal by Hydrothermal Pretreatment on Enzymatic Conversion of Sugarcane Bagasse Cellulose for Second Generation Ethanol Production. **Sugar Tech**, V. 15, N. 4, P. 390–398, 2013.
- Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, Akerhielm D, Cherry Jr, Meyer As. Evaluation Of Minimal *Trichoderma Reesei* Cellulase Mixtures On Differently Pretreated Barley Straw Substrate. **Biotechnol Prog** V.23, P.1270–6, 2007b.
- Rossell, C.E.V., Lahr Filho, D., Hilst, A.G.P.; Leal, M.R.L.V., Saccharification Of Sugarcane Bagasse For Ethanol Production Using The Organosolv Process. **International Sugar Journal**, 107: 192–195, 2005.
- Ruane, J. Et Al. Bioenergy and the Potential Contribution of Agricultural Biotechnologies in Developing Countries. **Biomass and Bioenergy**, V. 34, P. 1427-1439, Doi:10.1016/J.Biombioe.2010.04.011, 2010.
- Sanda, T., Hasunuma, T., Matsuda, F., & Kondo, A. Repeated-Batch Fermentation Of Lignocellulosic Hydrolysate To Ethanol Using A Hybrid *Saccharomyces Cerevisiae* Strain Metabolically Engineered For Tolerance To Acetic And Formic Acids. **Bioresource Technology**, 102(17), 7917–24, 2011.
- Santos, V. C. Dos Et Al. Kinetics Of Growth And Ethanol Formation From A Mix Of Glucose/Xylose Substrate By *Kluyveromyces Marxianus* Ufv-3. **Antonie Van Leeuwenhoek**, V. 103, N. 1, P. 153–61, 2013.
- Santos, V.E.N., Ely, R.N., Szklo, A.S., Magrini, A., 2016. Chemicals , electricity and fuels from biorefineries processing Brazil sugarcane bagasse : Production recipes and minimum selling prices. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 53, 1443–1458. doi:10.1016/j.rser.2015.09.069

- Sassner, P., Galbe, M., & Zacchi, G. Techno-Economic Evaluation of Bioethanol Production from Three Different Lignocellulosic Materials. **Biomass and Bioenergy**, 32(5), 422–430, 2008.
- Sato, T. K. Et Al. Harnessing Genetic Diversity In *Saccharomyces Cerevisiae* For Improved Fermentation Of Xylose In Hydrolysates Of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreated Biomass. **Applied And Environmental Microbiology**, N. November, 2013.
- Sehnem, N. T. Et Al. 5-Hydroxymethylfurfural Induces Adh7 And Ari1 Expression In Tolerant Industrial *Saccharomyces Cerevisiae* Strain P6h9 During Bioethanol Production. **Bioresource Technology**, V. 133, P. 190–6, 2013.
- Shahsavarani, H.; Hasegawa, D.; Yokota, D.; Et Al. Enhanced Bio-Ethanol Production From Cellulosic Materials By Semi-Simultaneous Saccharification And Fermentation Using High Temperature Resistant *Saccharomyces Cerevisiae* Tj14. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, V. 115, P. 20–23, 2013.
- Shanmughapriya, S. Optimization, Purification and Characterization of Extracellular Mesophilic Alkaline Cellulose from Sponge-Associated *Marinobacter* sp. Msi032. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V.162, P. 625-640, 2010.
- Shao, X., Jin, M., Guseva, A., Liu, C., Balan, V., Hogsett, D., Lynd, L. Conversion for Avicel And AFEX Pretreated Corn Stover By *Clostridium thermocellum* And Simultaneous Saccharification And Fermentation: Insights Into Microbial Conversion Of Pretreated Cellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, 102(17), 8040–5, 2011.
- Shields, S.; Boopathy, R. Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass Of Energy Cane. **International Biodeterioration & Biodegradation**, V. 65, P. 142–146, 2011.
- Shoemaker S, Watt K, Tsitovsky G, Cox R. Characterization and Properties of Cellulases purified From *Trichoderma reesei* Strain L27. **Biotechnol**, V. 1, P. 687–90, 1983.
- Sindhu, R.; Kuttiraja, M.; Preeti, V. E.; Et Al. A Novel Surfactant-Assisted Ultrasound Pretreatment of Sugarcane Tops for Improved Enzymatic Release of Sugars. **Bioresource Technology**, V. 135, P. 67–72, 2013.
- Singh, A., Sharma, P., Saran, A. K., Singh, N., & Bishnoi, N. R. Comparative Study on Ethanol Production from Pretreated Sugarcane Bagasse Using Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* on Various Matrices. **Renewable Energy**, 50, 488–493, 2013.
- Singh, L. K., Majumder, C. B., & Ghosh, S. Development of Sequential-Co-Culture System (*Pichia stipitis* And *Zymomonas mobilis*) For Bioethanol Production from Kans Grass Biomass. **Biochemical Engineering Journal**, 82, 150–157, 2014.

Singh, P.; Suman, A.; Tiwari, P.; Et Al. Biological Pretreatment of Sugarcane Trash for Its Conversion to Fermentable Sugars. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, V. 24, N. 5, P. 667–673, 2007.

Soares-Costa, A.; Nakayama, D.G.; Andrade, L.F. Et Al. Industrial Pe-2 Strain Of *Saccharomyces Cerevisiae*: From Alcoholic Fermentation To The Production Of Recombinant Proteins. **New Biotechnology**, V. 31, N. 1, 2014.

Sues, A.; Millati, R.; Edebo, L.; Taherzadeh, M. J. Ethanol Production From Hexoses, Pentoses, And Dilute-Acid Hydrolyzate By *Mucor Indicus*. **Fems Yeast Research**. V. 5, P. 669–676, 2005.

Sun, J. X.; Sun, R.; Sun, X. F.; Su, Y. Fractional and Physic-Chemical Characterization of Hemicelluloses from Ultrasonic Irradiated Sugarcane Bagasse. **Carbohydrate Research**, V. 339, P.291-300, 2004.

Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. **Bioresource Technology**, V. 83, P. 1-11, 2002.

Suriyachai, N.; Weerasaia, K.; Et Al. Optimized Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Rice Straw for Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* And *Scheffersomyces stipitis* Co-Culture Using Design of Experiments. **Bioresource Technology**, V. 142, P. 171–8, 2013.

Suslick, K. S.; Hammerton, D. A.; Cline, R. E. The Sonochemical Hot Spot. **Journal of the American Chemical Society**, V. 108, P. 2726-2734, 1986.

Szczerbowski, D.; Pitarelo, A.P.; Zandoná Filho, A.; Ramos, L.P. Sugarcane Biomass for Biorefineries: Comparative Composition of Carbohydrate and Non-Carbohydrate Components of Bagasse and Straw. **Carbohydrate Polymers**, V. 114, P. 95–101, 2014.

Takahashi, S. Et Al. Removal Of Acetic Acid From Spent Sulfite Licor Using Anion Exchange Resin For Effective Xylose Fermentation With *Pichia Stipitis*. **Bioresources**, V. 8, N. 2, P. 2417–2428, 2013.

Talebnia, F., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. Ethanol Production From Glucose And Dilute-Acid Hydrolyzates By Encapsulated *S. Cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, 90(3), 345–53, 2005

Taniguchi, M., Tohma, T., Itaya, T., & Fujii, M. Ethanol Production from A Mixture of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* And A Respiratory-Deficient Mutant Of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 83(4), 364–370, 1997.

Toivola, A Et Al. Alcoholic Fermentation Of D-Xylose By Yeasts. **Applied And Environmental Microbiology**, V. 47, N. 6, P. 1221–3, 1984.

Tomitaka, M.; Taguchi, H.; Et Al. Isolation and Characterization of a Mutant Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* Strain with High Efficiency Xylose Utilization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V. 116, P. 706-715, 2013.

Tran, D.-T., Y.-P., Lin, & C.-W., I. Developing Co-Culture System Of Dominant Cellulolytic *Bacillus* Sp. Thla0409 And Dominant Ethanolic *Klebsiella oxytoca* Thlc0409 For Enhancing Ethanol Production From Lignocellulosic Materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 44(5), 762–769, 2013.

Tran, D-T.; Yet-Pole, I.; Lin, C-W. Developing Co-Culture System Of Dominant Cellulolytic *Bacillus* Sp. Thla0409 And Dominant Ethanolic *Klebsiella Oxytoca* Thlc0409 For Enhancing Ethanol Production From Lignocellulosic Materials. **Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers**, V. 44, P. 762–769, 2013.

Travaini, R.; Otero, M. D. M.; Coca, M.; Da-Silva. R.; Bolado, S. Sugarcane Bagasse Ozonolysis Pretreatment: Effect on Enzymatic Digestibility and Inhibitory Compound Formation. **Bioresource Technology**, V. 133, P. 332-229, 2013.

Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshid, M., Samejima, M. Molecular Cloning and Characterization of Two Intracellular Beta-Glucosidases Belonging to Glycoside Hydrolase Family 1 from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V.73, P.807–814, 2006.

Unrean, P. E Nguyen, N. H. A. Optimized Fed-Batch Fermentation Of *Scheffersomyces Stipitis* For Efficient Production Of Ethanol From Hexoses And Pentoses. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, V. 169, N. 6, P. 1895–909, 2013.

Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. A Review Of Lignocellulose Bioconversion Using Enzymatic Hydrolysis And Synergistic Cooperation Between Enzymes--Factors Affecting Enzymes, Conversion And Synergy. **Biotechnology Advances**, 30(6), 1458–80, 2012.

Vasan, P. T., Piriya, P. S., Prabhu, D. I. G., & Vennison, S. J. Cellulosic Ethanol Production By *Zymomonas Mobilis* Harboring An Endoglucanase Gene From *Enterobacter Cloacae*. **Bioresource Technology**, 102(3), 2585–9, 2011.

Vásquez, M.P.; Silva, J.N.C.; Souza Jr., M.B.; Pereira Jr, N. Enzymatic Hydrolysis Optimization To Ethanol Production By Simultaneous Saccharification And Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, V. 136-140, P. 141-153, 2007.

Velmurugan, R.; Muthukumar, K. Ultrasound-Assisted Alkaline Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Fermentable Sugar Production: Optimization through Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, V. 112, P. 293–9, 2012.

- Velmurugan, R.; Muthukumar, K. Utilization of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production: Sono-Assisted Acid Hydrolysis Approach. **Bioresource Technology**, V. 102, P. 7119-7123, 2011.
- Voronovsky, A.Y.; Rohulya, O. V.; Et Al. Development of Strains of the Thermotolerant Yeast *Hansenula polymorpha* Capable of Alcoholic Fermentation of Starch and Xylan. **Metabolic Engineering**, V. 11, N. 4-5, P. 234–242, 2009.
- Vučurović, V. M., & Razmovski, R. N. Sugar Beet Pulp as Support for *Saccharomyces cerevisiae* Immobilization in Bioethanol Production. **Industrial Crops and Products**, 39, 128–134, 2012.
- Wanderley, M.C.A.; Martín, C.; Rocha, G.J.M.; Gouveia, E.R. Increase In Ethanol Production From Sugarcane Bagasse Based On Combined Pretreatments And Fed-Batch Enzymatic Hydrolysis. **Bioresource Technology**, V. 128, P. 448–453, 2013.
- Wei, N.; Xu, H.; Et Al. Deletion Of Fps1, Encoding Aquaglyceroporin Fps1p, Improves Xylose Fermentation By Engineered *Saccharomyces Cerevisiae*. **Applied And Environmental Microbiology**, V. 79, N. 10, P. 3193–201, 2013.
- Wei, N.; Quarterman, J.; Et Al. Enhanced Biofuel Production Through Coupled Acetic Acid And Xylose Consumption By Engineered Yeast. **Nature Communications**, V. 4, N. May, P. 2580, 2013.
- Wen, S. Et Al. Enhanced Fumaric Acid Production By Fermentation Of Xylose Using A Modified Strain Of *Rhizopus Arrhizus*. **Bioresources**, V. 8, N. 2, P. 2186–2194, 2013.
- Wirawan, F., Cheng, C.-L., Kao, W.-C., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. Cellulosic Ethanol Production Performance With SSF And SHF Processes Using Immobilized *Zymomonas Mobilis*. **Applied Energy**, 100, 19–26. 2012
- Wood, B.E.; Aldrich, H. C.; Ingram, L. O. Ultrasound Stimulates Ethanol Production during the Simultaneous Saccharification and Fermentation of Mixed Waste Office Paper. **Biotechnology Progress**, V. 13, P. 232-237, 1997.
- Xia, L. Et Al. Direct Energy Conversion From Xylose Using Xylose Dehydrogenase Surface Displayed Bacteria Based Enzymatic Biofuel Cell. **Biosensors & Bioelectronics**, V. 44, P. 160–3, 2013.
- Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladisch, M. Deactivation of Cellulases by Phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 48, N. 1, P. 54–60, 2011.
- Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T., & Lambert, A. Acceleration of the Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover and Sugar Cane Bagasse Celluloses by Low Intensity Uniform Ultrasound. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, 3, 25–31, 2009.

- Yadav, K. S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G. S., Sateesh, L., & Rao, L. V. Bioethanol Fermentation Of Concentrated Rice Straw Hydrolysate Using Co-Culture Of *Saccharomyces Cerevisiae* And *Pichia Stipitis*. **Bioresource Technology**, 102(11), 6473–8, 2011.
- Yamada, R., Nakatani, Y., Ogino, C., & Kondo, A. Efficient Direct Ethanol Production from Cellulose by Cellulase and Cellodextrin Transporter-Co-Expressing *Saccharomyces cerevisiae*. **Amb Express**, 3(1), 34, 2013.
- Yang, S., Wang, L., Yan, Q., Jiang, Z., Li, L. Hydrolysis of Soybean Isoflavone Glycosides by a Thermostable Beta-Glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. **Food Chem.** V.115, P.1247–1252, 2009.
- Ye, L. Et Al. Highly Efficient Production Of L-Lactic Acid From Xylose By Newly Isolated *Bacillus Coagulans* C106. **Bioresource Technology**, V. 132, P. 38–44, 2013.
- Yoon, L.W.; Ang, T.N.; Ngoh, G.C.; Chua, A.S.M. Regression Analysis on Ionic Liquid Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Assessment of Structural Changes. **Biomass and Bioenergy**, V. 36, P. 160-169, 2012.
- Yu, J., Yue, G., Zhong, J., Zhang, X., & Tan, T. Immobilization Of *Saccharomyces Cerevisiae* To Modified Bagasse For Ethanol Production. **Renewable Energy**, 35(6), 1130–1134, 2010.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H.-M., & Park, S. The Effect of Delignification of Forest Biomass on Enzymatic Hydrolysis. **Bioresource Technology**, 102(19), 9083–9, 2013.
- Zha, J. Et Al. Enhanced Expression Of Genes Involved In Initial Xylose Metabolism And The Oxidative Pentose Phosphate Pathway In The Improved Xylose-Utilizing *Saccharomyces Cerevisiae* Through Evolutionary Engineering. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, N. Xi, 2013.
- Zhang Yp, Himmel Me, Mielenz Jr. Outlook for Cellulase Improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol Adv.** v.24, p.452–81, 2006.
- Zhang, H.; WU, S. Enhanced enzymatic cellulose hydrolysis by subcritical carbon dioxide pretreatment of sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 158, p. 161–5, 2014.
- Zhang, X. et al. Interactions between *Clostridium beijerinckii* and *Geobacter metallireducens* in co-culture fermentation with anthrahydroquinone-2, 6-disulfonate (AH2QDS) for enhanced biohydrogen production from xylose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 164–72, 2013.
- Zhang, Z.; O'Hara, I. M.; Doherty, W. O. S. Pretreatment of Sugarcane Bagasse by acid-catalysed process in aqueous ionic liquid solutions. **Bioresource technology**, v. 120, p. 149–56, 2012.

Zhang, Z.; Wong, H. H.; Albertson, P. L.; Doherty, W. O. S.; O'Hara, I. M. Laboratory and pilot scale pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous glycerol solutions. **Bioresource technology**, v. 138, p. 14–21, 2013.

Zhao, C.; Lu, W. E Wang, H. Simultaneous Hydrogen And Ethanol Production From A mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles II: Effect of hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 22, p. 9131–9136, 2013.

Zhao, J. et al. Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by genetically engineered *Escherichia coli* B. **Microbial cell factories**, v. 12, p. 57, 2013.

Zhao, J., & Xia, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, 49(1), 28–32, 2010.

Zhao, X. Q., & Bai, F. W. Yeast Flocculation: New Story In Fuel Ethanol Production. **Biotechnology Advances**, 27(6), 849–56, 2009.

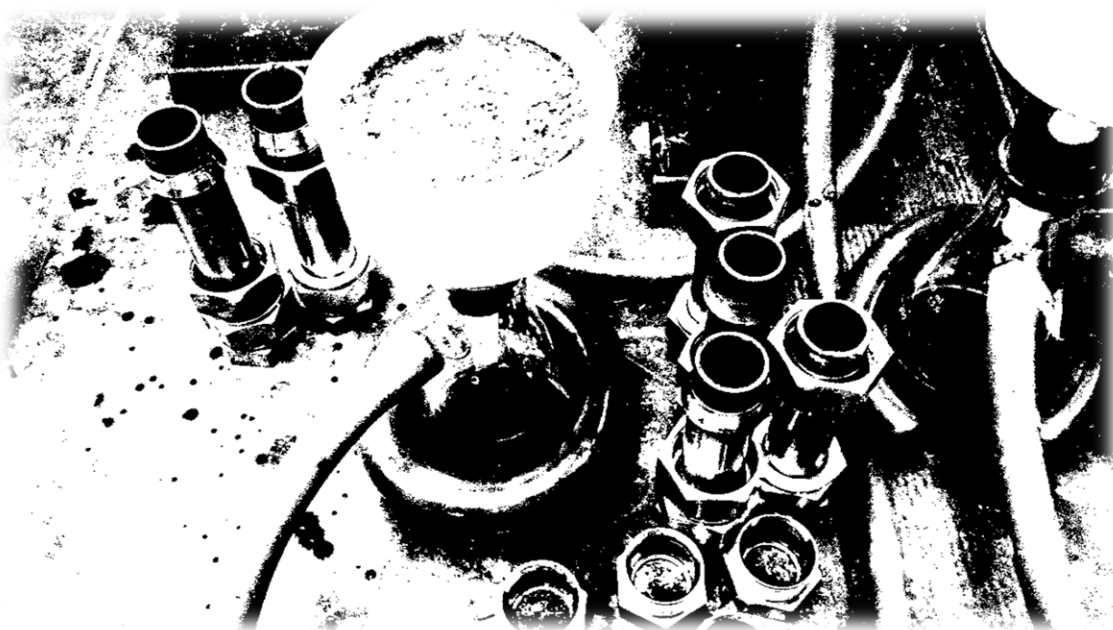
Zhao, X.; Cheng, K.; Liu, D. Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass For enzymatic hydrolysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815–27, 2009.

Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Liao, J.; Zhang, Y. Pretreatment By Microwave/Alkali Of rice straw its enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3082-3086, 2005.

Zhu, Z.-S.; Zhu, M.-J.; Xu, W.-X.; Liang, L. Production Of Bioethanol From sugarcane bagasse using NH_4OH - H_2O_2 pretreatment and simultaneous saccharification and co-fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 316–325, 2012.

Zuo, Q. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Fine-tuning of xylose metabolism in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by scattered integration of xylose assimilation genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 2, p. 241–244, 2013.

Capítulo 2: Pré-tratamentos e caracterização das biomassas



RESUMO

A recalcitrância de bagaço de cana-de-açúcar pode ser reduzida empregando pré-tratamentos como ozonólise e hidrotérmico, que podem aumentar a digestibilidade do material destinado à hidrólise enzimática posterior por promover, respectivamente, a deslignificação e a solubilização da hemicelulose. Observamos que a combinação dos dois pré-tratamentos mostrou-se uma forma efetiva de fracionamento da biomassa através de um processo denominado Tratamento Hidrotérmico Acidificado por Ozônio (THAO), que gerou dois produtos: o bagaço OHT enriquecido com 80% de celulose, baixo quantidade de hemicelulose (<4%) e parcialmente deslignificado (14%), e o licor rico em carboidratos monoméricos, majoritariamente xilose obtida da auto hidrólise dos oligossacarídeos em condição de alta acidez no reator hidrotérmico. Procedimentos de lavagem de sólidos pré-tratados demonstraram-se eficientes na remoção de compostos fenólicos do bagaço, e análises de infravermelho e raio-X confirmaram os efeitos despolimerizantes das frações amorfas e aumento da quantidade de celulose através do aumento no índice de cristalinidade em cada bagaço após os pré-tratamentos. Morfologicamente os tecidos vegetais dos bagaços ozonizado e hidrotérmico apresentaram múltiplos danos superficiais, evidenciados por microscopia eletrônica de varredura, indicando possíveis incrementos na área superficial e acessibilidade para enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Palavras-chave: Pré-tratamento. Bagaço. Celulose. Ozonólise. Hidrotérmico. Infravermelho. Cristalinidade.

ABSTRACT

The decrease of the recalcitrance of sugarcane bagasse can be achieved by using ozonolysis and hydrothermal (liquid hot water) pretreatments. The substrate digestibility on hydrolysis tends to be increased due to delignification and hemicellulose solubilization effects of ozone and hot water, respectively. Combining both techniques, we found an effective way to fractionate lignocellulose biomass through a process named Hydrothermal treatment acidified by ozone. This process generates two products generated: a cellulose-rich bagasse containing 80% of glucan with a low amount of hemicellulose (<4%) and partially delignified (14% lignin), and a xylose-rich liquor formed due to acidic condition on the hydrothermal step that promoted the oligosaccharide autohydrolysis. Washing procedures were effective on phenolic removal from pretreated solids and infrared and X-ray analysis confirmed the depolymerization effects on amorphous content and, consequently, the cellulose crystallinity increasing after pretreatments. Vegetal tissues of ozonated and hydrothermal-bagasse showed multiple morphological damages on its surface, detected by scanning electronic microscopy, indicating possible increasing on surface area and accessibility of the substrate by cellulolytic and hemicellulolytic enzymes.

Keywords: Pretreatment. Bagasse. Cellulose. Ozonolysis. Hydrothermal. Liquid hot water. Infrared. Crystallinity.

1. Introdução

A geração de energia limpa e sustentável tem como uma das suas principais vertentes a produção de combustíveis líquidos renováveis, os quais vêm impulsionando estudos científicos envolvendo diferentes biomassas lignocelulósicas nas últimas décadas em todo o planeta. Independentemente do tipo de material (bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de milho, resíduos florestais etc.) ou do interesse industrial vislumbrado diante do amplo conceito de biorefinaria, há um desafio em comum a todos os estudos: reduzir a recalcitrância natural da fibra lignocelulósica. A forma mais bem aceita para superar este desafio compreende o desenvolvimento de procedimentos de pré-tratamento com o objetivo de promover alterações de diversas ordens (física, química e/ou biológica) para aumentar a área superficial de contato dos carboidratos constituintes dos polímeros de glucana e xilana e, assim, facilitar o acesso e a interação das enzimas hidrolíticas que promovem a sua despolimerização, elevando a conversão e a obtenção de açúcares monoméricos requeridos para os processos fermentativos. As atribuições gerais de um pré-tratamento ideal incluem alta eficiência na redução da recalcitrância, viabilidade técnica e econômica, possibilidade de escalonamento e práticas sustentáveis.

A ozonólise representa uma técnica de pré-tratamento químico baseada em processos oxidativos promovidos pelo gás ozônio (O_3), que é um poderoso agente oxidante, solúvel em água e de fácil decomposição. Em seu contato com o material lignocelulósico, o ozônio reage preferencialmente com a lignina, que é o componente de maior densidade de elétrons na biomassa devido a sua natureza fenólica (Quesada, 1997; Godsay, 1985). O rompimento das duplas ligações $[C=C]$ e a abertura de anéis aromáticos da estrutura da lignina pode ser mediada por reação direta ou reação indireta do ozônio. A reação direta é explicada pelo mecanismo de Criegee, que propõe a geração de radicais ozonídeos como intermediários da catálise, enquanto a reação indireta acontece na presença de radicais hidroxila livres derivados da decomposição do ozônio em solução aquosa (Oliveira & Wosch, 2012; Travaini et al., 2015). Dessa maneira, a ozonólise apresenta alta seletividade de reação, atuando especificamente na deslignificação do material e afetando minimamente o conteúdo das hemiceluloses e a celulose.

Outras vantagens do pré-tratamento com ozônio, descritas inicialmente por Vidal & Molinier (1988), incluem: (I) condições brandas de operação, já que a reação acontece em temperatura e pressão ambiente, (II) fácil geração do gás ozônio *in loco* a partir do oxigênio atmosférico, dispensando custos de armazenamento e transporte, e (III) fácil decomposição do ozônio residual em oxigênio sem gerar efluentes industriais, já que é um processo gasoso. A ozonólise já encontra aplicações industriais bem estabelecidas em processos de branqueamento de polpa de celulose e no tratamento de águas residuárias (Shatalov & Pereira, 2008; Amat et al., 2005; Gomes & Colodette, 2016). Por esses motivos, o número de pesquisas envolvendo o estudo da ozonólise em diferentes materiais lignocelulósicos tem sido crescente na comunidade científica nos últimos anos (Barrera-martínez et al., 2016; Barros et al., 2013; Coca et al., 2016; García-Cubero et al., 2012, 2009; Gitifar et al., 2013; Kaur et al., 2012; Kojima & Yoon, 2008; Li et al., 2015; Miura et al., 2012; Panneerselvam et al., 2013; Perrone et al., 2016a, 2016b; Shi et al., 2015; Travaini et al., 2016, 2013; Yu et al., 2011).

O pré-tratamento hidrotérmico, em inglês reconhecido pela sigla LHW (*liquid hot water*), é um dos mais tradicionais métodos químicos empregados para aumentar a digestibilidade da celulose na biomassa vegetal. O método foi primeiramente proposto por Bobleter & Pape (1968), inspirados no emprego remoto desta técnica nas indústrias de papel como uma forma de solubilização das hemiceluloses e obtenção de polpas mais ricas em celulose. Como estratégia de pré-tratamento para a obtenção de biocombustíveis, o método hidrotérmico vem sendo aperfeiçoado há cerca de 20 anos e atualmente é um dos pré-tratamentos líderes que já foi demonstrado em plantas-piloto e em escalas industriais (Cunha et al., 2014; Kim et al., 2014, 2013, 2011, 2009; Ko et al., 2015; Santucci et al., 2015; Vargas et al., 2015; Weil et al., 1998; Ximenes et al., 2013; Zhuang et al., 2016a).

Fundamentalmente o método hidrotérmico caracteriza-se pela auto hidrólise pressurizada da biomassa em temperaturas entre 150 e 230 °C, que levam à ionização das moléculas de água gerando íons catalíticos hidrônio (H_3O^+) e hidroxila (OH^-) (Ruiz et al., 2013). As ligações heterocíclicas de ésteres – presentes nos radicais acetil das hemiceluloses – são bastante susceptíveis à hidrólise pelos íons hidrônio, liberando, assim, ácido acético e ácidos urônicos que acidificam o pH do meio e, por sua vez,

também produzem novos íons hidrônio. A hidrólise das cadeias das hemiceluloses produz inicialmente fragmentos oligoméricos e, então, estes geram monossacarídeos dissolvidos através do licor de pré-tratamento (Ruiz et al., 2013). Consequentemente, há um aumento no tamanho dos poros do substrato sólido que permaneceu insolúvel, formado majoritariamente por celulose e lignina residuais. Devido ao rompimento das interações covalentes α -O-1,4 entre a lignina e as hemiceluloses, nas condições de alta pressão hidrotérmica, ocorre também a liberação de grande quantidade de fragmentos fenólicos no licor, entre estes estão os produtos da decomposição oxidativa dos ácidos ferúlico e coumárico, como, por exemplo, vanilina, ácido vanílico, *p*-hidroxibenzaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico (Zhuang et al., 2016b). Além de aumentar a oferta de celulose e torná-la mais acessível, normalmente o pré-tratamento hidrotérmico apresenta baixo custo operacional e baixo impacto ambiental por não requerer o emprego de reagentes químicos. Assim, são relatados poucos problemas de corrosão e baixa formação de subprodutos inibitórios em condições operacionais de menor severidade (Alvira et al., 2010).

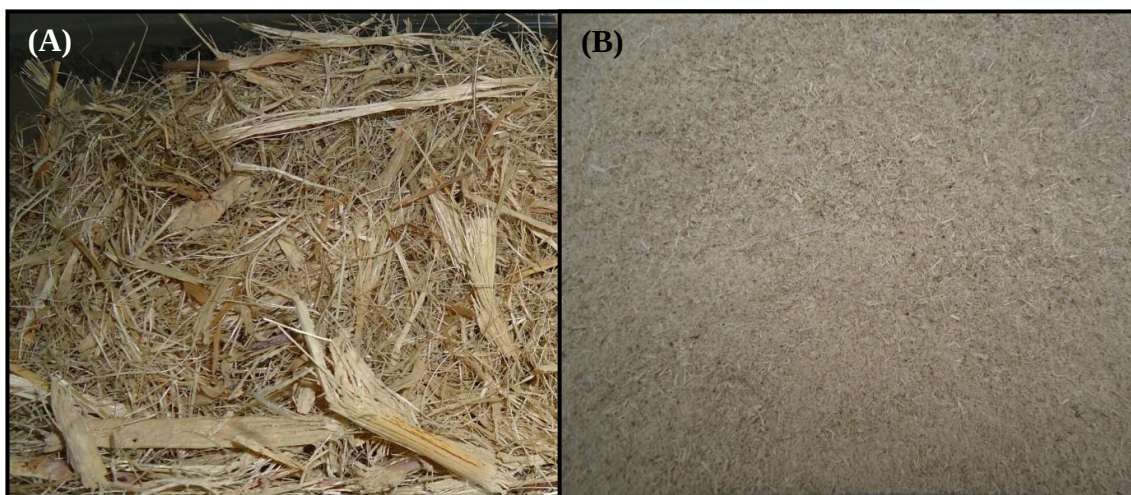
Assim como a ozonólise e o tratamento hidrotérmico apresentam características e vantagens próprias, uma série de outros pré-tratamentos tem sido continuamente proposta visando produzir biomassas de menor recalcitrância para o uso em biorefinarias. Uma maneira efetiva de incrementar a disponibilidade de celulose a um custo razoável de produção é a combinação de pré-tratamentos. Quando duas técnicas são combinadas busca-se aliar as vantagens de cada uma e minimizar possíveis limitações, visando ampliar o potencial de aplicação e de escalonamento do processo (Sun et al., 2016). Neste trabalho foram aliados o potencial de deslignificação pela ozonólise e a eficiente solubilização das hemiceluloses promovida pelo tratamento hidrotérmico, como uma estratégia composta de fracionamento de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol celulósico. O objetivo deste capítulo foi promover os pré-tratamentos e a caracterização química e estrutural das amostras de bagaço de cana-de-açúcar obtidas tanto pela aplicação individual quanto combinada das duas técnicas, sendo, neste caso, a ozonólise como a primeira etapa, e o tratamento hidrotérmico a segunda etapa de pré-tratamento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

O bagaço de cana-de-açúcar, gentilmente disponibilizado pela Usina Alta Mogiana (São Joaquim da Barra/SP), foi recebido em julho de 2013 na forma *in natura* (úmido e prensado) e mantido sob refrigeração a 4° C por 10 dias até o seu processamento. O preparo deste substrato envolveu uma série de lavagens em temperatura ambiente (5 ciclos) utilizando água corrente, complementado por uma lavagem final empregando água destilada a 45° C. Na sequência, o bagaço foi disposto em estufa com circulação de ar a $42 \pm 2^\circ$ C, e mantido por aproximadamente 90 horas até atingir teor de umidade inferior a 5% (m/v). O bagaço seco foi triturado (triturador TRAPP® 400) e peneirado para a padronização do tamanho das partículas inferior a 1,5 mm de comprimento (Figura 1), e armazenado em temperatura ambiente e livre de umidade para uso posterior. Este material foi denominado “bagaço não-tratado”.

Figura 1. Representação do bagaço de cana-de-açúcar como recebido (A) e padronizado por trituração (B).



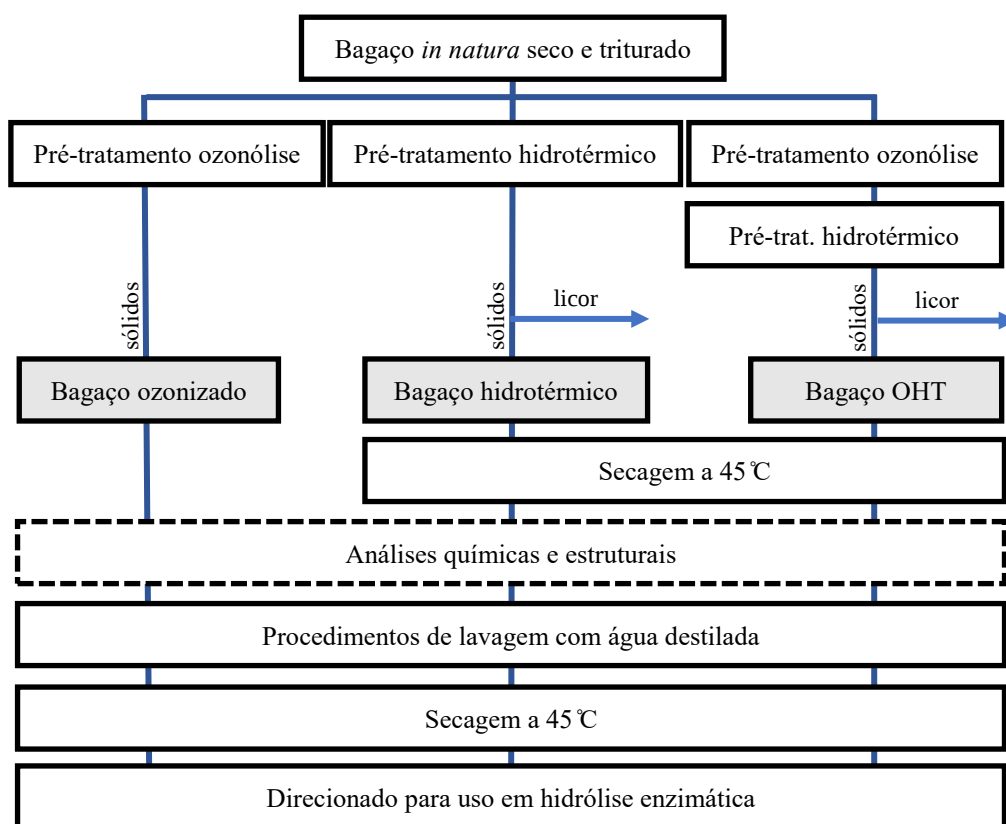
Fonte: autor.

2.2. Métodos

2.2.1 Estratégias de pré-tratamento para bagaço de cana-de-açúcar

Os pré-tratamentos ozonólise e hidrotérmico (também referenciado como LHW – *liquid hot water*) foram empregados de forma individual e combinada em bagaço de cana-de-açúcar, conforme ilustrado na Figura 2. Para a proposta de pré-tratamento combinado, a ozonólise foi realizada primeiramente, seguido da etapa hidrotérmica. Uma etapa de separação sólido/líquido por filtração foi realizada para todas as amostras submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico, enquanto operações de lavagem convencional e secagem foram executadas para todas as amostras.

Figura 2. Representação esquemática das estratégias de pré-tratamento e operações de downstream realizadas para bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: elaborado pelo autor.

2.2.2. Pré-tratamento de bagaço por ozonólise

O pré-tratamento por ozonólise foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP de São José do Rio Preto, São Paulo. O processo empregou colunas de leito fixo de vidro (dimensões: largura 2,7 cm × 50 cm comprimento) (Figura 3) e gás ozônio (O₃) gerado pelo processo de descarga elétrica tipo corona (equipamento Radast 10C, Ozoxi-Ozônio). Cada batelada de pré-tratamento foi preparada pela mistura de 25 gramas de bagaço seco (teor de umidade entre 4 a 5% (m/v)) e 12 mL de água destilada, gerando um substrato com teor de umidade inicial de aproximadamente 50% (m/v). O substrato foi manualmente empacotado nas colunas de pré-tratamento e então submetido ao fluxo saturado de gás ozônio durante 60 minutos a temperatura ambiente. A vazão de alimentação utilizada foi de 32 mg de O₃ por minuto em cada batelada (Perrone et al., 2016), correspondente a um consumo de $7,6 \times 10^{-2}$ g de O₃ por grama de bagaço. A entrada de O₃ foi a partir da parte inferior da coluna, seguindo um fluxo ascendente até a saída, localizada na parte superior e conectada ao sistema de lavagem de gases residuais e quantificação do fluxo de ozônio do sistema.

A determinação da concentração de ozônio foi realizada de acordo com o procedimento padrão descrito em “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005). Neste procedimento, os gases coletados na saída da coluna de pré-tratamento foram borbulhados em dois recipientes (frascos de lavagem de gases) iguais e sequenciais contendo solução 2% de Iodeto de Potássio (KI) durante 10 minutos. Em seguida, o conteúdo de cada frasco de lavagem foi titulado usando solução 0,01 N de Tiossulfato de Sódio (Na₂S₂O₃). Finalmente, para estimar a concentração de ozônio em solução foi empregada a Equação 1. Esta quantificação foi realizada com a coluna vazia para ajustar o fluxo de alimentação de O₃ no tempo zero de cada batelada, e com a coluna empacotada com bagaço para determinar preliminarmente o tempo de reação necessário para a saturação do substrato nas condições descritas, estabelecido como 60 minutos de reação.

Após cada batelada de pré-tratamento, o bagaço tratado foi desempacotado da coluna contendo baixo teor de umidade (inferior a 10% (m/v)), homogeneizado para a

obtenção de amostras uniformes entre as possíveis variações das diferentes bateladas, e armazenado em temperatura ambiente e livre de umidade para uso posterior.

Equação 1. Medida da concentração de ozônio.

$$\text{Concentração (mg min}^{-1}\text{)} = \frac{(A + B) \times N \times 24}{T}$$

Sendo: A = volume em mL de Na₂S₂O₃ titulado no recipiente 1; B = volume em mL de Na₂S₂O₃ titulado no recipiente 2; N = normalidade da solução de Na₂S₂O₃; T = tempo de borbulhamento do gás, em minutos.

Figura 3. Representação de bagaço de cana-de-açúcar empacotado não-tratado (coluna inferior) e tratado por ozonólise (coluna superior) em colunas de pré-tratamento.



Fonte: autor.

2.2.3 Pré-tratamento de bagaço por tratamento hidrotérmico

O desenvolvimento do pré-tratamento hidrotérmico foi realizado nas dependências do *Laboratory of Renewable Resources Engineering (LORRE)*, localizado na Purdue University, Indiana, Estados Unidos da América. O pré-tratamento foi realizado conforme descrito por Kim et al. (2014) utilizando colunas de aço inoxidável (dimensões: largura 2,2 cm × 13,5 cm comprimento) e banho de areia fluidizado Tecam® SBL-1 (Figura 4). Cada coluna foi preenchida com 3,5 gramas de amostra seca (teor de umidade ~5%) a ser tratada (bagaço *in natura* ou bagaço ozonizado) e 33,5 mL de água

destilada, equivalente a uma concentração de 10% (m/v). As colunas foram rigidamente fechadas e vedadas com tampas de rosca, e então dispostas no interior do banho de areia pré-aquecido a 190 °C. O tempo total de residência foi de 20 minutos, sendo destes 5 minutos iniciais para troca térmica e equilíbrio de temperatura da coluna, e 15 minutos de tratamento a 190 °C, correspondente a um fator de severidade equivalente a $\log R_o = 4,40$, obtido pela equação ($\log R_o = t \times \exp^{(T-100)/\omega}$), sendo $\omega = 4,6$ que representa a energia de ativação do pré-tratamento determinado por Kim et al. (2014), e t = tempo (min.), T = temperatura (°C). Ao final do pré-tratamento, as colunas foram submersas em banho de resfriamento a temperatura ambiente por 10 minutos para troca térmica. Os sólidos pré-tratados foram separados do resíduo líquido – denominado licor – por filtração a vácuo em papel filtro Whatman n. 1 (Fig.4) e lavados com 100 mL de água destilada a temperatura ambiente. Finalmente, os sólidos lavados foram dispostos em estufa para secagem (45 °C, 24 horas) até uso posterior em análises de caracterização e experimentos de hidrólise, e o licor foi armazenado sob refrigeração (4 °C) em frascos âmbar protegidos da luz até as análises posteriores de compostos fenólicos totais e quantificação de carboidratos e inibidores por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.

Figura 4. Banho de areia fluidizado para pré-tratamento hidrotérmico (à esquerda); procedimento de separação dos sólidos e licor após o pré-tratamento hidrotérmico (à direita).



Fonte: autor.

2.2.4. Procedimentos de lavagem de bagaço

Experimentos de lavagem seriada foram realizados em amostras de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT visando estimar a capacidade de remoção de compostos fenólicos em cada substrato. Neste procedimento cada amostra foi ressuspensa em água destilada a 5% (50 g L⁻¹), mantida sob agitação magnética por 30 minutos a temperatura ambiente, e então filtrada em papel filtro Whatman n. 1 para a coleta do conteúdo sólido lavado. O procedimento foi repetido sequencialmente 5 vezes para os bagaços ozonizado e hidrotérmico, e 2 duas vezes para o bagaço OHT, já que este apresentou menor concentração de compostos fenólicos iniciais nos sólidos. Após a conclusão das lavagens, as amostras foram secadas em estufa (45 °C, 24 horas) para outros usos. A quantificação dos compostos fenólicos dissolvidos em cada ciclo foi estimada pela análise dos sobrenadantes de lavagem utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, a partir de metodologia adaptada de Singleton et al. (1999) para menor volume reacional (total: 2 mL). Uma curva padrão de ácido gálico foi construída para o intervalo de concentração de 50 a 500 mg L⁻¹. Os resultados foram expressos em miligramas por litro (mg L⁻¹) de Equivalente de Ácido Gálico (EAG).

2.2.5. Caracterização química de biomassa

A caracterização química permite um amplo entendimento acerca dos efeitos de cada pré-tratamento sobre a distribuição percentual de cada um dos macro-componentes constituintes do material lignocelulósico. Dessa forma, amostras de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT foram submetidas a caracterização química dos carboidratos estruturais e lignina com prévia remoção de extrativos em cada biomassa, seguindo os procedimentos analíticos das normativas NREL/TP-510-42619 e NREL/TP-510-42618 do *National Renewable Energy Laboratory* – NREL, conforme Sluiter et al. (2012; 2008), e análise de umidade e cinzas (IAL, 2008). Uma amostra controle, correspondente ao bagaço não-tratado, foi analisada sob as mesmas condições.

A quantificação dos carboidratos (glicose, xilose, arabinose, celobiose) e do ácido acético foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em HPLC (marca Waters

Corp., Milford, MA) equipado com coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H, 300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), conectado a uma bomba dosadora (Milton Roy Co., Ivyland, PA), a um amostrador automático (WatersTM 717 plus autosampler) e a um detector por índice de refração (WatersTM 2414). As análises de caracterização química foram realizadas no *Laboratory of Renewable Resources Engineering (LORRE)*, Purdue University, Indiana, EUA.

2.2.6. Caracterização estrutural de biomassa

Cada pré-tratamento promove distintas perturbações estruturais na organização da biomassa lignocelulósica em virtude da sua natureza e das condições operacionais utilizadas, visando a desconstituição parcial da natureza recalcitrante do substrato. A determinação destas alterações estruturais foi realizada empregando técnicas como a radiação infravermelho, difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura em amostras pré-tratadas por ozonólise, hidrotérmico e combinado, além da amostra *in natura* como controle.

A análise de infravermelho com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) foi realizada pesando-se aproximadamente 100 mg de amostra para a formação de discos de 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura obtidos por prensagem (Perrone, 2015). Os espectros foram coletados em espectrofotômetro Perkin Elmer (FT-IR Spectrum Two, UART Two) na região de 600 a 4000 cm^{-1} e os gráficos foram gerados em programa Origin 8.0.

O índice de cristalinidade das amostras foi determinado por difração de raios-X empregando um difratômetro de bancada (modelo Rigaku miniflex 300, Tóquio, Japão) com radiação de Cu e linha K, $L = 1,542 \text{ \AA}$ (30 kV e 10 mA). A abrangência da varredura foi de 5° a 40°, com velocidade de varredura 1° por minuto (Perrone, 2015). O índice de cristalinidade foi calculado pelo método proposto por Seagal et al. (1959) e os gráficos foram gerados em programa Corel Draw. As análises FTIR-ATR e raios-X foram realizadas no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica da UNESP de São José do Rio Preto.

Para a captura das imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram previamente preparadas fixando o material por 48 horas em solução 2,5% de glutaraldeído preparado em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3) a temperatura ambiente, seguido de lavagem com água destilada, pós-fixação em tetróxido de ósmio 0,5% no mesmo tampão por 30 min, e desidratação em séries crescentes de soluções alcoólicas. O material foi seco em CO₂ líquido em aparelho de Ponto Crítico CPD 010 (Balzers Union) e recoberto com ouro em metalizador MED (Bal-Tec SCD 050, Balzers Union). A análise do material e a documentação fotográfica foram realizados em microscópio eletrônico (Quanta 200, Fei Company, Eindhoven, Holanda) utilizando voltagem de aceleração de 12,5 kV, pertencentes ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

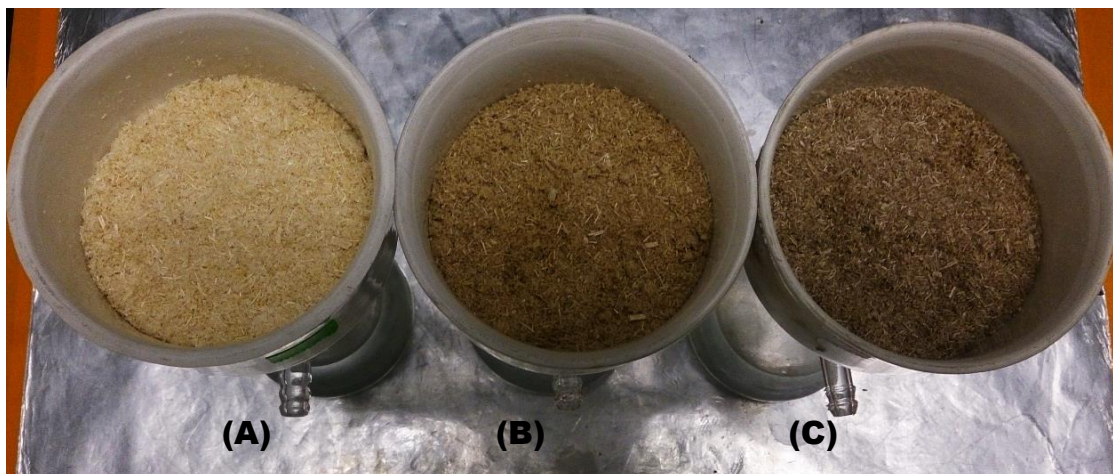
3. Resultados & Discussão

3.1. Respostas dos pré-tratamentos e caracterização química das biomassas

Os processos de ozonólise e hidrotérmico, empregados para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, geraram biomassas com diferentes características quanto à composição química, à organização estrutural e ao aspecto visual, conforme ilustrado na Figura 5. Se por um lado a deslignificação é o mecanismo-chave da ozonólise, por outro, a solubilização das hemiceluloses representa a principal resposta do pré-tratamento hidrotérmico. A biomassa ozonizada apresentou coloração mais clara do que o bagaço *in natura*, e odor residual repulsivo característico do gás ozônio. A redução de cor do bagaço pré-tratado com ozônio explica-se pela oxidação parcial da lignina, que é o componente cromóforo na biomassa devido à presença das ligações duplas conjugadas com anéis aromáticos e grupos quinona e quinona metídio em sua estrutura polimérica, sendo, inclusive, a ozonólise estudada como uma estratégia de redução de cor de licores negros na indústria de celulose (Guimarrães et al., 2010).

Já o bagaço hidrotérmico adquiriu cor mais intensa (marrom) em comparação ao material inicial após o contato com a elevada temperatura do processo, evidenciando efeitos secundários de escurecimento pela degradação de carboidratos, especialmente daqueles constituintes das hemiceluloses, mais susceptíveis à despolimerização nas condições ácidas do pré-tratamento hidrotérmico. Uma das principais vias de degradação de carboidratos sob alta temperatura envolve a desidratação da molécula e a introdução de ligações duplas ou a formação de anéis anidro. Nestas reações, genericamente conhecidas como caramelização de açúcares, podem se formar compostos intermediários e precursores de cor sob condição ácida, como o hidroximetilfurfural (HMF), da desidratação da glicose, e o furfural, a partir da desidratação da xilose. A polimerização destes precursores resulta então na formação de um polímero colorido – a melanoidina. Finalmente, o bagaço OHT – obtido da combinação de ambos pré-tratamentos – resultou em uma apresentação visual distinta, com coloração marrom-acinzentada, possivelmente como consequência dos efeitos múltiplos de ambos os procedimentos sobre o bagaço.

Figura 5. Ilustração do material após os pré-tratamentos: (A) bagaço ozonizado; (B) bagaço hidrotérmico; (C) bagaço OHT (combinando ozonólise e hidrotérmico).



Fonte: autor.

Devido à natureza gasosa do pré-tratamento com ozônio, não há perda de massa total de material durante a etapa de pré-tratamento, ou seja, considera-se que a mesma massa de bagaço de entrada (*in natura*) é recuperada ao final da ozonólise como bagaço ozonizado, comparativamente na base seca. Há uma certa variação de umidade ao longo do processo de reação do gás ozônio com o material lignocelulósico umidificado com água, entretanto este componente (a água) é consumido ao longo do processo e, portanto, sua massa é desconsiderada. As perdas de massa do bagaço ozonizado acontecem apenas na etapa de lavagem dos sólidos, apresentada adiante, na qual se observou um percentual de solubilização de cerca de 23% a partir da ressuspensão do material a 5% (m/v) com água destilada em temperatura ambiente. Por outro lado, o pré-tratamento hidrotérmico fracionou o conteúdo inicial em uma porção sólida (bagaço pré-tratado) e uma porção líquida (licor). Foi observado que o licor continha cerca de 26% da massa inicial de sólidos nas condições operacionais avaliadas. A lavagem deste conteúdo pré-tratado (bagaço hidrotérmico) – sob as mesmas condições citadas para a ozonólise – levou ainda a uma perda de cerca de 15% da massa de entrada. Complementarmente, quando da combinação da ozonólise ao pré-tratamento hidrotérmico, observou-se um percentual de solubilização de cerca de 52% do conteúdo inicial de bagaço *in natura*. Dessa maneira, os índices de rendimento de cada processo foram aqueles indicados através da Tabela 1.

Tabela 1. Índices de rendimento em cada pré-tratamento em bagaço de cana-de-açúcar.

<i>Tipo de pré-tratamento</i>	<i>Operação de lavagem^a</i>	<i>Rendimento^b (%)</i>
Ozonólise	-	100%
Ozonólise	Incluída	77%
Hidrotérmico	-	74%
Hidrotérmico	Incluída	63%
Ozonólise + Hidrotérmico	-	48%
Ozonólise + Hidrotérmico	Incluída	40%

^a Uma etapa de lavagem com água destilada a 5% (m/v) em temperatura ambiente.

^b Rendimento considerado como a quantidade de massa de material recuperado na base seca.

Fonte: elaborado pelo autor.

As três biomassas pré-tratadas foram enriquecidas quanto ao conteúdo de celulose, que representou a porção de interesse como substrato para a produção de etanol celulósico, conforme confirmado pelas análises de caracterização química (Tabela 1).

Tabela 2. Análise de composição química para amostras de bagaço de cana-de-açúcar gerados por diferentes estratégias de pré-tratamento e amostra não-tratada.

Componente	Composição percentual* (%)			
	Bagaço não-tratado	Bagaço ozonizado	Bagaço hidrotérmico	Bagaço OHT
Celulose	35,9±0,10	45,2±1,64	47,1±0,49	72,6±1,44
Hemicelulose	19,1	14,4	16,7	3,6
<i>Xilose</i>	15,8±0,59	13,7±0,53	15,3±0,17	3,6±0,11
<i>Arabinose</i>	2,0±0,11	0,7±0,05	1,3±0,07	0,0
<i>Ácido acético</i>	1,3±0,15	0,0	0,0	0,0
Lignina	21,1	13,2	22,1	12,7
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	18,0±0,36	10,6±0,30	19,1±0,04	11,2±0,27
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	3,1±0,29	2,7±0,08	2,9±0,01	1,5±0,03
Cinzas	0,4±0,12	0,8±0,32	0,8±0,06	1,1±0,27
Extrativos	21,7	26,1	12,2	9,9
Massa total	98,2	99,7	98,9	99,9

*Composição de sólidos apresentada como peso seco em base recebida (%). Fonte: elaborado pelo autor.

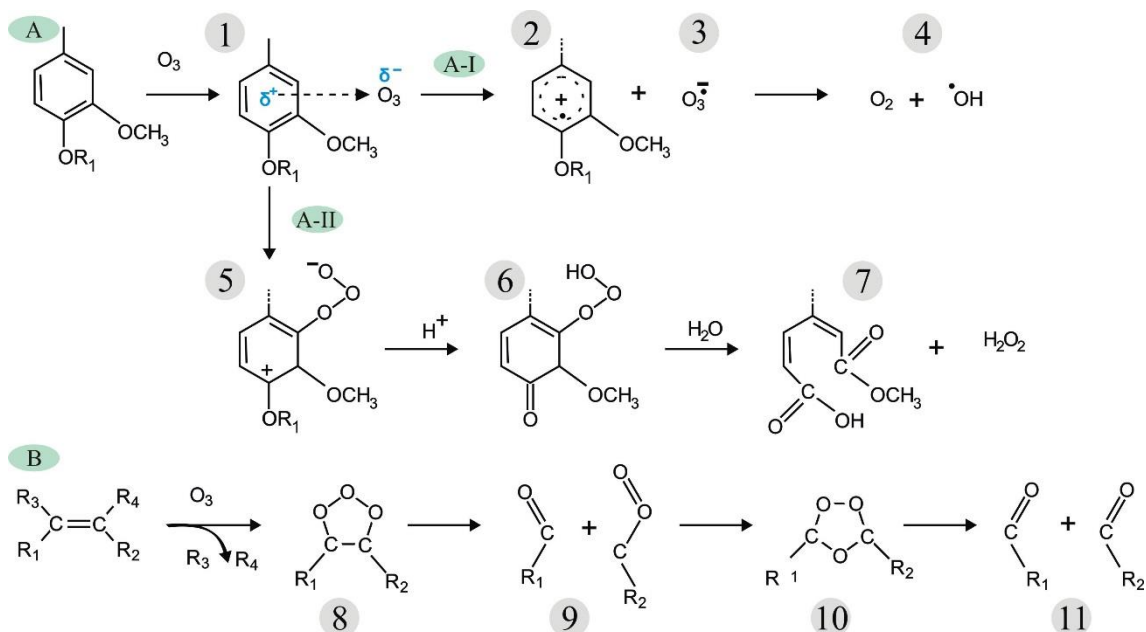
De maneira geral, o percentual de celulose presente nas biomassas pré-tratadas foi incrementado ao nível de 26%, 31% e 102% no bagaço ozonizado, bagaço hidrotérmico e bagaço OHT, respectivamente, em relação ao material não-tratado. Estas respostas validam a aplicação das técnicas de pré-tratamento como efetivas formas de promover o enriquecimento do conteúdo de celulose em bagaço de cana. A biomassa gerada pela combinação dos dois pré-tratamentos mostrou-se altamente atrativa quanto a sua composição química, sendo um substrato de alto teor de celulose, parcialmente deslignificado e com baixa quantidade de hemiceluloses residuais que demonstrou alta compatibilidade composicional para a hidrólise enzimática.

A composição química do bagaço OHT apresentou-se similar àquela obtida por Silva et al. (2011), que propuseram o desenvolvimento de pré-tratamento hidrotérmico (195 °C, 10 min), seguido de etapa de deslignificação com 1% de hidróxido de sódio (100 °C, 60 min) e lavagem dos sólidos, que foram compostos por 79% de celulose, 3,7% de hemiceluloses e 14% de lignina, como a melhor opção de pré-tratamento dentre as condições avaliadas. Considerando o emprego do ozônio ao invés da solução alcalina como agente deslignificante do bagaço, vislumbra-se, na presente proposta, uma alternativa de eficiência de deslignificação equivalente e com menor impacto ambiental do que aquela obtida pelo emprego de soluções alcalinas. Nas seções seguintes são discutidos mais detalhadamente os efeitos de cada pré-tratamento sobre a composição química do bagaço de cana-de-açúcar.

3.1.1. Deslignificação

O efeito de deslignificação resultou principalmente do ataque oxidativo do ozônio diretamente sobre alcenos e anéis aromáticos na estrutura da lignina. Os três principais mecanismos de reação diretas são ilustrados através da Figura 6. Outras reações menos frequentes entre o ozônio e a lignina são descritos na literatura (Oliveira & Wosch, 2012; Travaini et al., 2016b). A ozonólise promoveu individualmente a deslignificação de 37% da lignina total em relação ao material inicial (não-tratado), e 40% de deslignificação quando combinada ao pré-tratamento hidrotérmico. Não foi observado efeito de deslignificação a partir do pré-tratamento hidrotérmico individual.

Figura 6. Mecanismos de ação direta do ozônio sobre fragmentos de lignina.



Legenda: **A:** estrutura aromática creosol; **B:** estrutura alifática olefina; **A-I:** ozônio com estrutura creosol liberando radical hidroxila; **A-II:** ozônio com estrutura creosol com ruptura heterolítica de anel aromático; **B:** ozônio com C=C de acordo com o mecanismo de Criegee; Compostos e reações: (1) estado de transferência de carga da estrutura creosol; (2) cátion aromático formado após transferência completa de elétrons; (3) radical ozonídeo; (4) oxigênio e radical hidroxila como produtos da protonação do radical ozonídeo; (5) adição de ozônio ao anel aromático; (6) protonação do anel aromático; (7) produtos finais da ruptura heterolítica do anel aromática com formação de peróxido de hidrogênio. (8) molozonídeo formado pela reação de 1,3-cicloadição entre ozônio e a estrutura olefina; (9) radicais intermediários carboxila e óxido de carboxila (zwitterion) formados pela reação de retro-1,3-cicloadição; (10) radical ozonídeo formado pela reação de 1,3-cicloadição; (11) produtos finais da ozonólise obtidos da hidrólise do radical ozonídeo. Fonte: adaptado de Travaini et al. (2016b).

O incremento na solubilização da lignina no bagaço OHT pode ser justificado pelo rompimento das ligações covalentes entre a lignina e as hemiceluloses na etapa hidrotérmica, que se somaram às reações oxidativas próprias da ozonólise. Nota-se que durante o pré-tratamento hidrotérmico a fração de lignina solúvel em ácido – a porção menos recalcitrante do polímero – foi levemente afetada, enquanto a proporção de lignina insolúvel em ácido permaneceu inalterada após o pré-tratamento. Segundo Ko et al. (2015), as elevadas temperaturas atingidas no pré-tratamento hidrotérmico promovem sucessivas reações de despolimerização e repolimerização da lignina, alterando seu estado inicial, porém mantendo-a essencialmente insolúvel. A fração de lignina solúvel foi minimamente reduzida (6,5%) pelo pré-tratamento hidrotérmico individual, porém

cerca de 52% foi solubilizada quando os pré-tratamentos foram combinados. Segundo a literatura, parte desta lignina despolimerizada hidrotermicamente pode se depositar na superfície das fibras como lignina globular, e provocar efeitos negativos de adsorção não-produtiva em enzimas durante a etapa de sacarificação (Li et al., 2014; Wang et al., 2015). Neste ponto, procedimentos de lavagem dos sólidos pré-tratados podem minimizar os efeitos negativos da lignina globular.

Dessa maneira geral, o bagaço OHT foi a biomassa com menor percentual de lignina total (12,7%), correspondente a uma deslignificação de 40%, e foi obtida sem a adição de nenhum reagente químico alcalino ou solvente orgânico, que são tipicamente empregados para promover a solubilização da lignina. Outros autores reportaram índices de deslignificação similares ou superiores utilizando ozonólise em bagaço de cana-de-açúcar, entretanto demandando de maior quantidade de gás ozônio e/ou maior tempo de operação, conforme listado na Tabela 2. Por exemplo, Travaini et al. (2013) utilizaram uma quantidade cerca de 2,7 vezes superior de ozônio em relação a este trabalho para atingir 41% de redução da lignina total. No mesmo sentido, Barros et al. (2013) obtiveram a máxima redução de lignina total de 64% consumindo mais de 5 vezes a concentração de ozônio. Os mesmos autores reportaram uma remoção de 42% da lignina total em 30 minutos utilizando um consumo similar ao utilizado neste trabalho ($0,078$ versus $0,072 \text{ g O}_3 \times \text{g bagaço}^{-1}$), porém a ozonólise foi realizada em um reator equipado com sistema de aquecimento (40°C) e agitação de pás que, possivelmente, contribuíram para uma melhor dispersão do gás no sistema e, conseqüentemente, permitiu maior reatividade entre o ozônio e o material lignocelulósico (Barros et al., 2013).

Portanto, pela comparação direta entre o consumo de O_3 e o índice de deslignificação deste trabalho e aquele reportado por Travaini et al. (2016), que fizeram uso das mesmas colunas de ozonólise em leito fixo, podemos afirmar que a eficiência de deslignificação neste trabalho foi superior, já que foram obtidos 40% de deslignificação consumindo $0,072 \text{ g O}_3 \times \text{g bagaço}^{-1}$, o que representou $\frac{2}{3}$ da quantidade de ozônio utilizada por Travaini et al. (2016), que foi de $0,110 \text{ g O}_3 \times \text{g bagaço}^{-1}$ para alcançar 41% de deslignificação.

Tabela 3. Quadro comparativo do índice de deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar obtido por diferentes autores utilizando pré-tratamento por ozonólise.

Índice de deslignificação*	Condições operacionais da ozonólise					Referência
	Teor de umidade (%)	Consumo de ozônio (g O ₃ g bagaço ⁻¹)	Tempo de processo (min)	Tamanho de partícula (mm)	Tipo de reator utilizado	
40%	50	0,072	60	<1,5	leito fixo	Este trabalho
41%	50	0,110	n.d.	< 1,2	leito fixo	Travaini et al. (2016)
67%	40	0,210	120	n.d.	leito fixo	Travaini et al. (2013)
42%	60	0,078	30	< 2,0	STR**	Barros et al. (2013)
55%	60	0,187	60	< 2.0	STR	
64%	60	0,377	120	< 2.0	STR	

n.d. = não descrito; *Índice de deslignificação calculado como redução de lignina total; **STR= stirred tank reactor.
 Fonte: elaborado pelo autor.

3.1.2. Solubilização das hemiceluloses

Há uma série de modelos cinéticos que buscam descrever a despolimerização das hemiceluloses nas condições do pré-tratamento hidrotérmico, conforme revisado por Ruiz et al. (2013), sendo amplamente aceitas três etapas de desconstrução: (i) fragmentação dos polímeros com liberação de produtos primários intermediários, como xilo oligossacarídeos (XOS), ácido acético e ácidos urônicos; (ii) auto hidrólise ácida dos oligômeros de carboidratos gerando os monômeros, como xilose, arabinose, glicose etc.; (iii) decomposição dos monômeros em produtos finais de degradação, como furfural e ácido fórmico (Jönsson & Martín, 2016; Zhuang et al., 2016b). Dessa maneira, o desafio no pré-tratamento hidrotérmico consiste em combinar condições operacionais (tempo, temperatura, proporção de sólidos, pH, tamanho de partículas) efetivas para obter a máxima despolimerização das hemiceluloses, e assim gerar uma fração sólida composta basicamente por celulignina e, adicionalmente, uma fração líquida (licor) preferencialmente rica em oligômeros e/ou monômeros de carboidratos, mas livre dos produtos de degradação, que são habitualmente indesejáveis pela sua toxicidade sobre as enzimas e os micro-organismos envolvidos nas etapas posteriores do processo.

A condição hidrotérmica testada neste trabalho (190 °C/ 15 min/ 10% sólidos totais) foi de média severidade ($\log R_o = 4,40$) e observamos que a biomassa resultante apresentou uma redução de 13% na composição centesimal de hemiceluloses na fração sólida. Já o bagaço OHT foi intensamente solubilizado quanto ao conteúdo de hemiceluloses, com 81% de redução em relação ao conteúdo inicial (bagaço não-tratado). Comparativamente aos dados da literatura, a solubilização de hemiceluloses pelo pré-tratamento hidrotérmico individual foi baixa. De maneira geral são reportados percentuais de solubilização entre 40 e 60% para diferentes biomassas lignocelulósicas (Ruiz et al., 2013), porém índices ainda mais elevados, entre 67% e 88%, foram obtidos com sucesso por Silva et al. (2011) em bagaço de cana-de-açúcar usando reator hidrotérmico. Michelin et al. (2015) obtiveram cerca de 34% de solubilização utilizando a condição de 180 °C/ 30 min, e 78% em 200 °C/ 30 min. Nota-se que a relação entre temperatura e tempo de residência influenciam fortemente nas características físico-químicas dos materiais pré-tratados hidrotermicamente. Habitualmente as condições de elevada severidade (tempo longo, temperaturas elevadas) tendem a solubilizar mais e gerar muitos produtos indesejáveis de degradação dos carboidratos, enquanto as condições que combinem tempo longo de residência e temperaturas brandas favorecem a preservação dos produtos e mantém alta solubilização da hemicelulose, elevando entretanto o custo operacional (Ruiz et al., 2013).

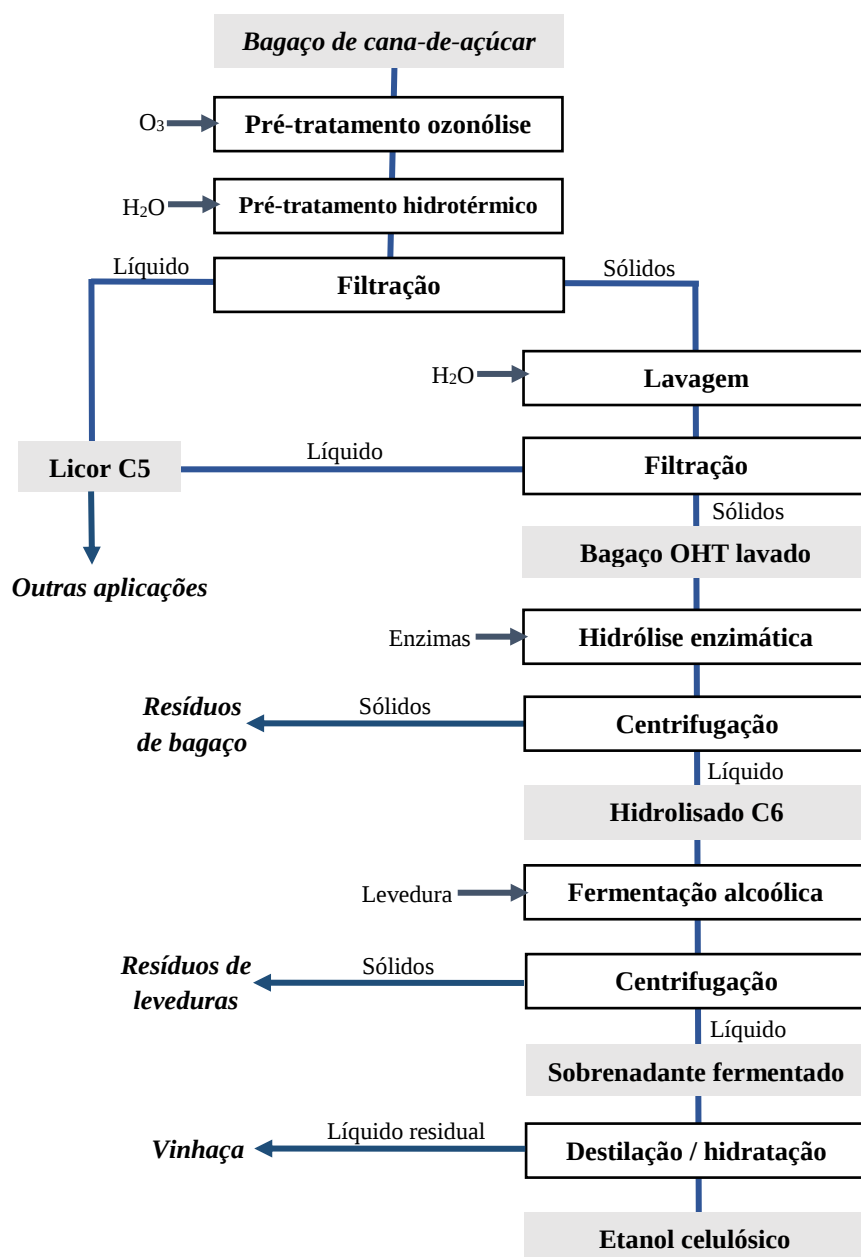
Apesar da baixa solubilização das hemiceluloses no pré-tratamento hidrotérmico, a combinação deste procedimento à ozonólise revelou um alto potencial de despolimerização da xilana e dos demais polímeros que a compõem. Neste caso a alta taxa de solubilização no bagaço OHT parece ser resultante da ação potencializada do ozônio sobre a ruptura das ligações covalentes que ligam as hemiceluloses e a lignina, somada a um intenso efeito hidrolítico pelas moléculas de água ionizadas em condição ácida. Detectamos uma condição particular na combinação dos pré-tratamentos, já que o pH habitual no processo hidrotérmico fica na faixa de 4,5, e o pH observado no processo usando bagaço ozonizado ao invés de bagaço *in natura* foi em torno de 2,0. Esta condição mais rigorosa de acidez parece ter provocado a auto hidrólise dos xilo-oligossacarídeos, normalmente presentes em grande quantidade nas frações líquidas do pré-tratamento hidrotérmico, liberando monômeros no licor, que foi composto por mais de 20 g·L⁻¹ de

açúcares, sendo destes $15,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose, $3,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arabinose. Considerando apenas as quantidades de xilose e arabinose do licor ($17,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), a combinação da ozonólise e pré-tratamento hidrotérmico permitiu recuperar 75% da porção de hemiceluloses original do bagaço *in natura* (19,1% em 3,5 g de bagaço correspondem a 0,668 g de hemicelulose) na forma de monômeros de carboidratos ($17,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 33,5 g de água equivalem a 0,572 g de açúcares ou 0,503 g de xilana).

O acúmulo de açúcares monoméricos no licor representa uma vantagem importante porque estas formas monoméricas estão prontamente disponíveis para os micro-organismos. Habitualmente os licores de bagaço hidrotérmico são compostos por baixa quantidade de açúcares monoméricos e elevada concentração de oligossacarídeos, como, por exemplo, uma composição de $12,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilo-oligossacarídeos, $5,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de outros oligossacarídeos, e apenas $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de monossacarídeos (Michelin et al., 2015). Tal particularidade, referente a composição de subprodutos monoméricos no licor da combinação dos pré-tratamentos, torna esta proposta sensivelmente diferente de um pré-tratamento hidrotérmico convencional. Por esse motivo, sugere-se uma denominação própria para o processo como “Tratamento Hidrotérmico Acidificado por Ozônio”, representado pela sigla THAO, no qual o bagaço OHT e o licor rico em xilose são os dois principais produtos gerados, conforme apresentado através de fluxograma de operações proposto na Figura 7, que contempla a produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática do bagaço OHT, seguida da fermentação alcoólica do conteúdo hidrolisado.

No fluxograma de operações do processo THAO estão incluídas as etapas de *downstream*, sendo que a primeira separação sólido/líquido após a etapa hidrotérmica é promovida por filtração a vácuo na escala laboratorial. Então os sólidos pré-tratados são submetidos a um procedimento de lavagem simples do bagaço visando remover os subprodutos remanescentes sobre as fibras. O bagaço OHT lavado pode ser finalmente submetido à hidrólise enzimática, enquanto os líquidos (licor C5 e líquido de lavagem) podem compor um meio de cultivo rico em xilose que pode encontrar distintas aplicações tecnológicas. Um terceiro procedimento de *downstream* é necessário para a coleta do sobrenadante hidrolisado C6 livre dos resíduos sólidos da sacarificação, que pode então ser destinado a etapa fermentativa para a conversão dos açúcares em etanol por leveduras industriais e, finalmente, destilado para a recuperação do etanol celulósico anidro.

Figura 7. Fluxograma de operações do processo THAO para obtenção de etanol celulósico.



Fonte: elaborado pelo autor.

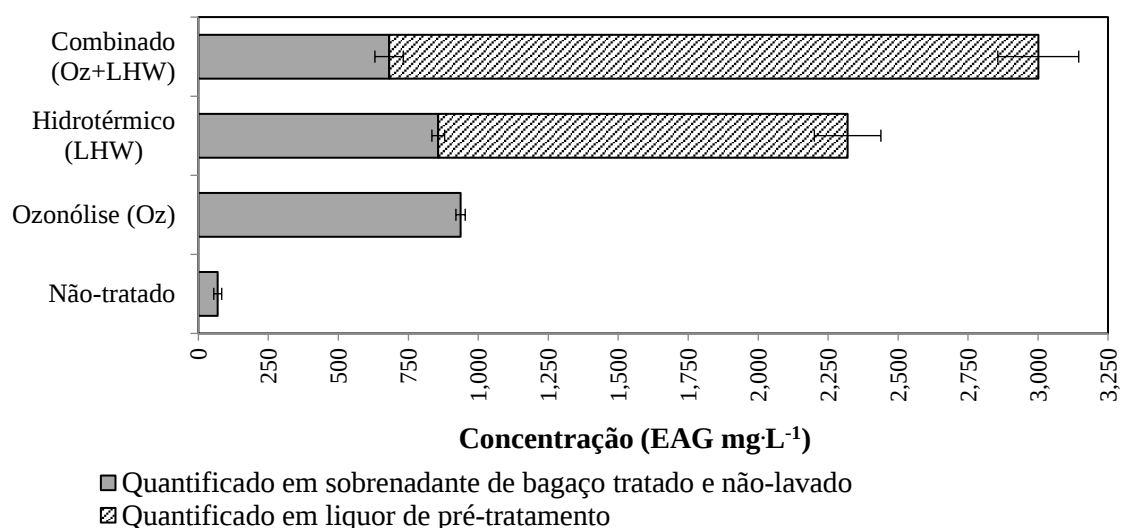
3.1.3. Solubilização de compostos fenólicos totais

O processo de deslignificação, promovido especialmente durante a etapa de ozonólise, gerou uma série de fragmentos como produto da despolimerização da lignina.

Estes fragmentos são essencialmente compostos fenólicos de baixa massa molecular que reconhecidamente inibem enzimas e leveduras, por isso a sua presença junto ao bagaço pré-tratado é indesejável (Jönsson & Martín, 2016; Mhlongo et al., 2015; Ximenes et al., 2011, 2010). Devido à ozonólise ser um procedimento gasoso, os compostos fenólicos gerados permaneceram ligados fisicamente aos sólidos pré-tratados e foram, opcionalmente, solubilizados no licor de pré-tratamento durante a etapa hidrotérmica, quando os pré-tratamentos foram combinados. Para o bagaço hidrotérmico, por outro lado, o licor de pré-tratamento solubilizou e carregou a maior parte dos compostos fenólicos formados durante o pré-tratamento, assim foram obtidos sólidos pré-tratados parcialmente livres de compostos fenólicos totais (CFT).

Portanto, cada pré-tratamento libera diferentes quantidades de compostos fenólicos residuais como resposta à solubilização parcial da lignina nas condições próprias de cada processo. Observamos que a solubilização de CFT foi crescente a partir da ozonólise ($937 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), seguida por hidrotérmico ($2.320 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), e mais intensamente presente no processo combinado ($3.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), conforme apresentado na Figura 8.

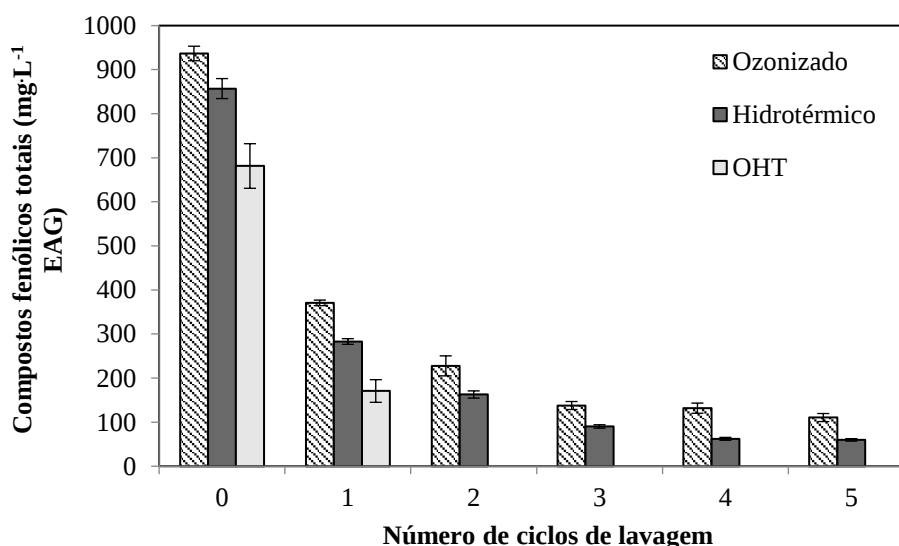
Figura 8. Solubilização de compostos fenólicos totais a partir das diferentes estratégias de pré-tratamento estudadas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Procedimentos de lavagem de sólidos pré-tratados são formas comuns e eficientes de remover os CFT e minimizar seus efeitos inibitórios nas etapas posteriores (Kim et al., 2014; Toquero & Bolado, 2014; Xiros & Olsson, 2014). Considerando apenas a fração sólida de interesse à hidrólise enzimática, nota-se que o bagaço ozonizado ($937 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CFT) apresentou maior concentração de CFT dos que os bagaços hidrotérmico e OHT, que continham $857 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $681 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Promovendo a lavagem destes substratos foi possível observar claramente a redução gradual do conteúdo de CFT após cada etapa, atingindo índices de remoção de 88% (ozonizado) e 93% (hidrotérmico) após 5 ciclos de lavagem, e 75% em uma etapa única de lavagem do bagaço OHT, conforme apresentado na Fig. 9. Portanto, procedimentos de lavagem em temperatura ambiente podem representar uma forma custo-efetiva de redução de CFT em bagaços pré-tratados por ozonólise e pré-tratamento hidrotérmico, gerando substratos potencialmente menos tóxicos para enzimas celulolíticas e hemicelulíticas.

Figura 9. Remoção de compostos fenólicos totais solúveis por lavagem para bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.Caracterização estrutural por FTIR-ATR

A análise de espectrometria de infravermelho (FTIR-ATR) foi empregada buscando detectar as principais alterações estruturais promovidas pelos pré-tratamentos em comparação ao material de referência (não-tratado) no que diz respeito aos grupamentos químicos funcionais. Analisando espectros de varredura na região entre 4.000 e 600 cm^{-1} , foi observado que cada bagaço continha diferentes perfis de vibração de ligações específicas, que foram correlacionadas com os efeitos promovidos pelas reações do ozônio com o bagaço, e dos íons catalíticos gerados pela ionização das moléculas de água com o bagaço durante cada pré-tratamento. Os principais sinais das vibrações de interesse na análise de um espectro de infravermelho de bagaço de cana-de-açúcar são aqueles relacionados na Tabela 4.

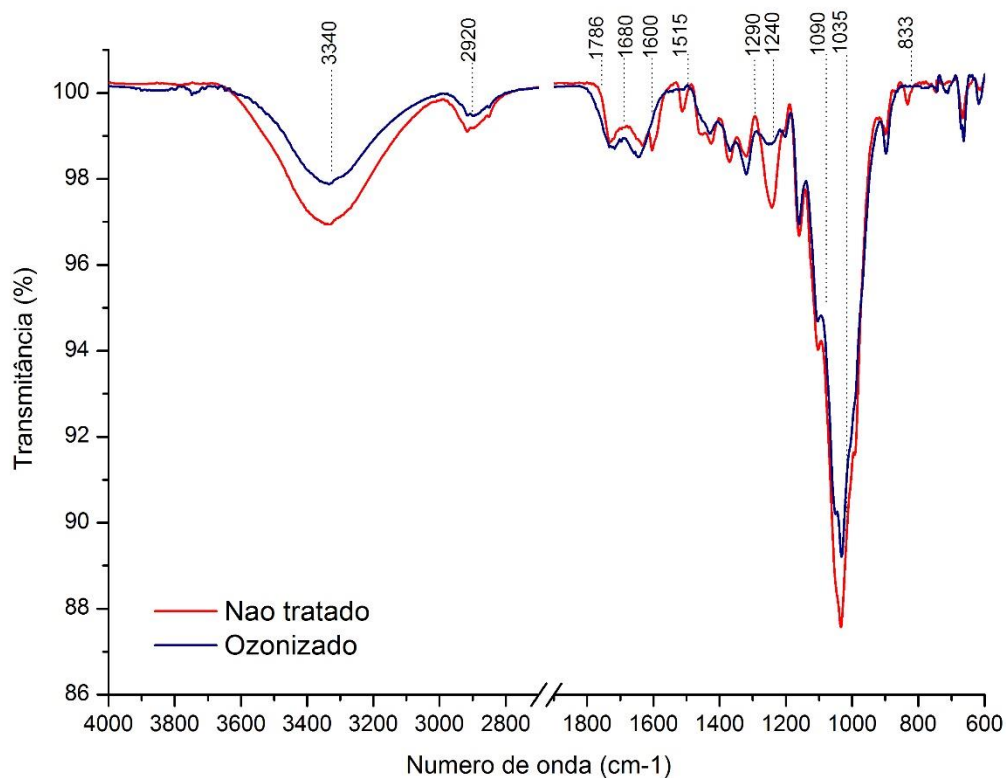
Em acordo com as respostas da caracterização química, confirmamos a ação específica do ozônio sobre a lignina por infravermelho devido a redução do sinal nas bandas localizadas nas regiões de 1600 cm^{-1} e 1510 cm^{-1} correspondentes aos anéis aromáticos (Pereira et al., 2016), 1240 cm^{-1} relativo a ligação [C-O] em guaiacil (Brienzo et al., 2017), e 833 cm^{-1} atribuída a vibração [C-H] fora do plano em unidades de *p*-hidroxifenil, um dos precursores da lignina (Hoareau et al., 2004). Tanto o bagaço ozonizado quanto o bagaço OHT apresentaram estas alterações específicas indicando deslignificação em relação ao controle (bagaço não-tratado) (Fig. 11). Por outro lado, tais efeitos não foram detectados no bagaço hidrotérmico e estão em acordo com os resultados de caracterização química, que também demonstraram inexistência de deslignificação neste pré-tratamento.

Tabela 0-4. Sinais de vibração em infravermelho típicos para bagaço de cana-de-açúcar.

Sinal (cm ⁻¹)	Tipos de vibração e grupos funcionais envolvidos	Referências
3340-3400	Estiramento de [–OH] em álcool (celulose e hemicelulose)	Sun et al., 2004
2920	Estiramento de [–OH] em ácido carboxílico (celulose e hemicelulose)	Sun et al., 2004
1800-800	Região de <i>fingerprint</i> (diferentes grupos)	Poletto et al., 2012
1786	Vibração em anel aromático (lignina)	Perrone, 2015
1727-1732	Estiramento em [C–O] de cetonas não conjugadas, éster ou ácidos carboxílicos	Hoareau, 2004; Sun et al., 2004
1680	Vibração em anel aromático (lignina)	Xu et al., 2013; Liu et al., 2007; Sun et al., 2004; Pereira et al. (2016)
1644	Vibração em anel aromático e ligação [C=C] em lignina	
1600		
1536		
1510-1515	Vibração em anel aromático (lignina)	
1344	Estiramento de [–CH ₂] em celulose e hemicelulose; celulose cristalina	Perrone, 2015
1240-1245	Absorção por [C–H] e estiramento em [C–O] de grupos acetil em hemicelulose; [C–O] em anel guaiacil	Ju et al., 2011; Liu et al., 2007; Brienzo et al. (2017)
1158-1090	Estiramento em [C–O–C] de ligações glicosídicas β(1→4)	Xu et al., 2013; Sun et al., 2004
1049-1035	Estiramento de ligações [C–C] e [C–O] em celulose ou hemicelulose (inespecíficas)	Liu et al., 2007
897	Estiramento em [C–O–C] de ligações glicosídicas β(1→4)	Liu et al., 2007; Xu et al., 2013; Sun et al., 2004
833	Vibração do [C–H] fora do plano em unidades de p-hidroxifenil em lignina	Hoareau et al., 2004; Ciobanu et al. 2004

Fonte: elaborado pelo autor.

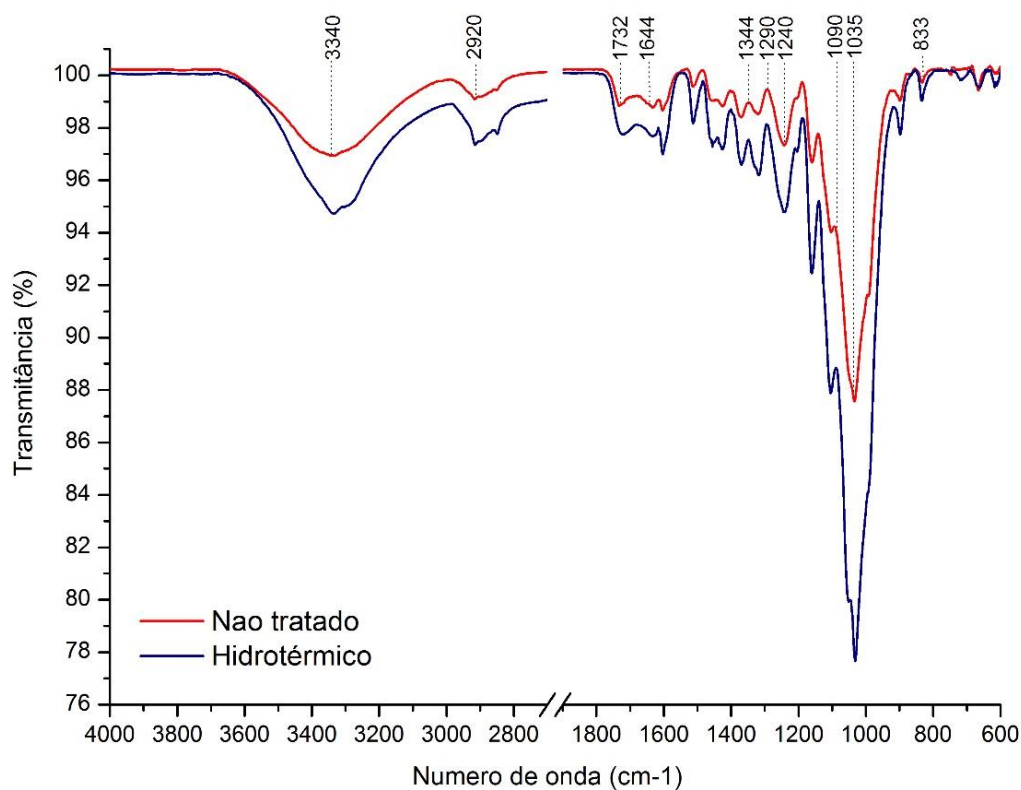
Figura 10. Espectro FTIR-ATR de bagaço ozonizado em comparação ao bagaço não-tratado (controle).



Fonte: elaborado pelo autor.

De maneira geral, o espectro de infravermelho do bagaço hidrotérmico apresentou composição de bandas bastante similar ao controle, ou seja, não houve o surgimento ou desaparecimento de sinais ao longo do espectro, houve apenas variação na intensidade dos sinais (Fig. 12). Portanto, sugere-se que este resultado represente apenas o efeito de solubilização e concentração dos componentes da biomassa, que não foram quimicamente modificados durante o procedimento hidrotérmico em bagaço de cana-de-açúcar. Por exemplo, as regiões de 3300 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} são amplamente representativas das estruturas de celulose e hemicelulose e foram intensamente aumentadas nos sólidos em virtude da separação de parte do conteúdo solubilizado através do licor.

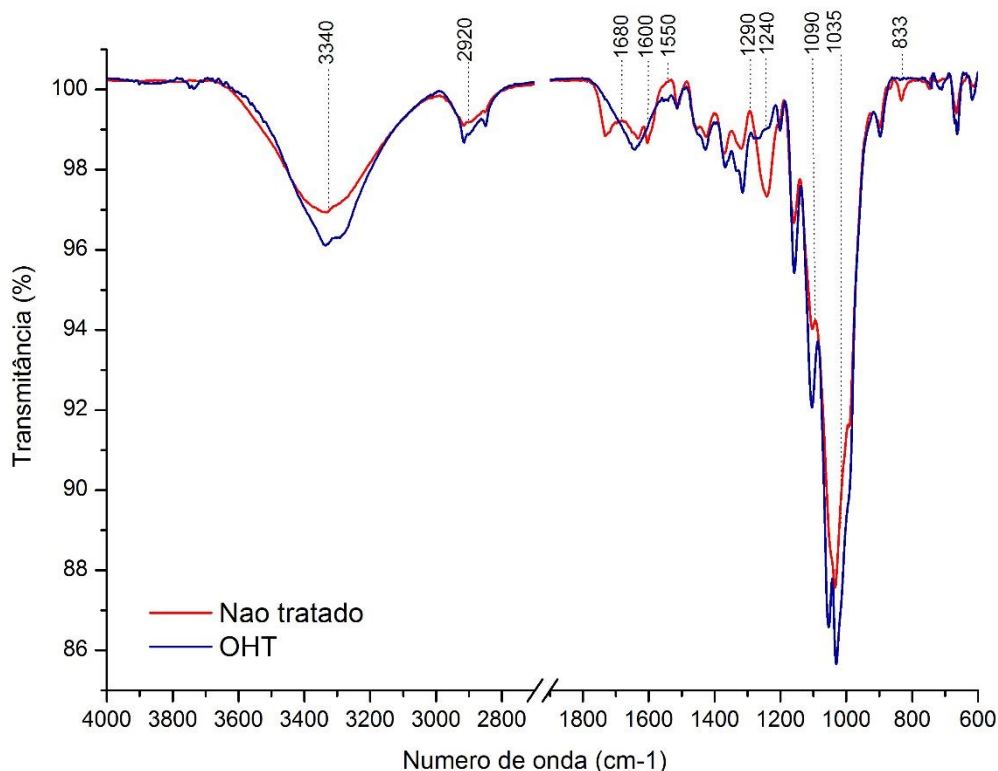
Figura 11. Espectro FTIR-ATR de bagaço hidrotérmico em comparação ao bagaço não-tratado (controle).



Fonte: elaborado pelo autor.

As respostas do espectro de infravermelho do bagaço OHT demonstram simultaneamente alguns efeitos de aumento do sinal em bandas nas regiões correspondentes aos carboidratos (regiões de 3300, 1240 e 1035 cm^{-1}), e redução de sinal em bandas correspondentes à lignina (1680, 1240 e 833 cm^{-1}) como resultado da combinação dos pré-tratamentos (Fig. 13).

Figura 12. Espectro FTIR-ATR de bagaço OHT em comparação ao bagaço não-tratado (controle).

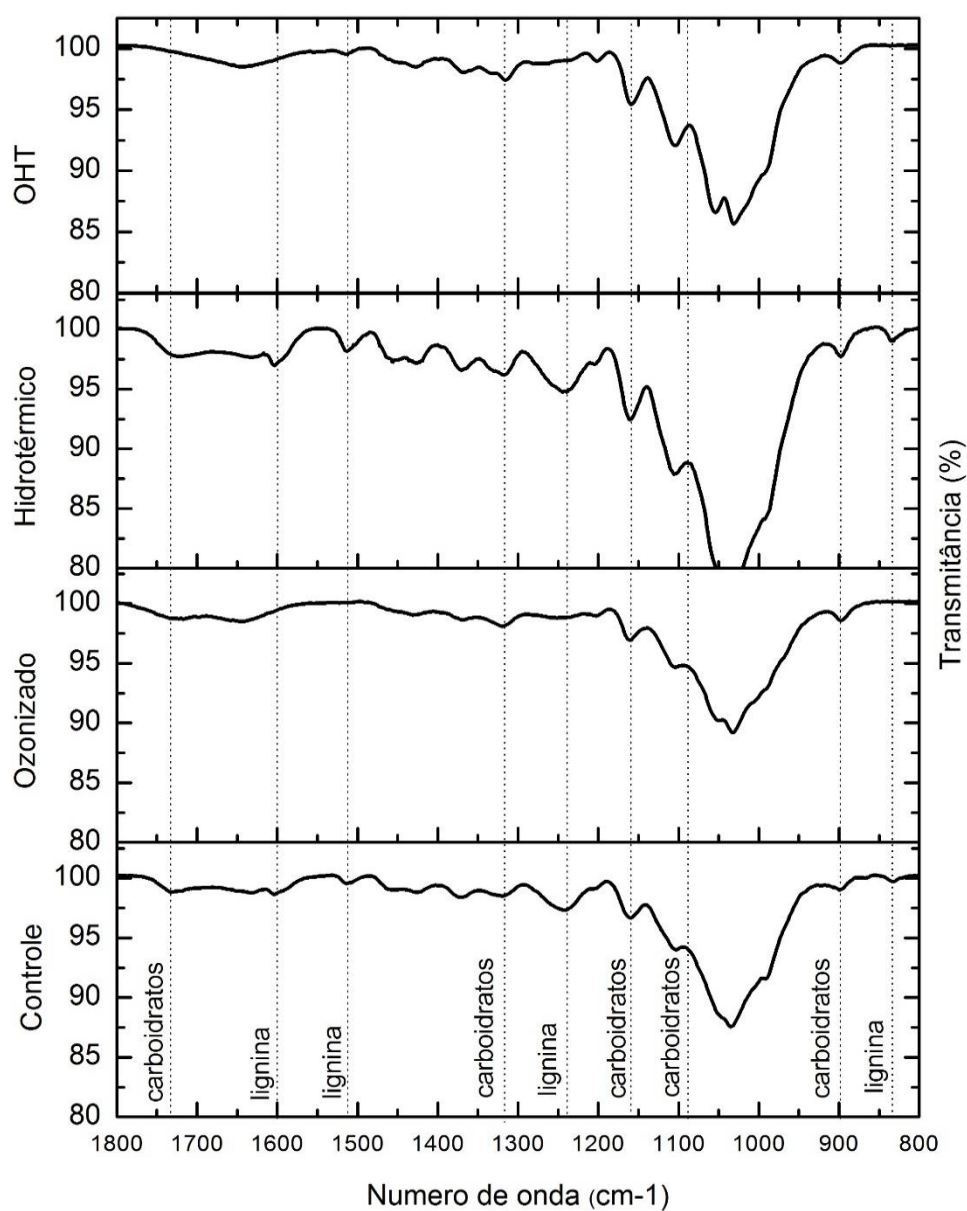


Fonte: elaborado pelo autor.

A região denominada *fingerpint*, definida entre os comprimentos de onda de 1800 a 800 cm^{-1} em lignocelulose (Poletto et al., 2012), é a região do espectro de infravermelho utilizada com mais frequência por fornecer informações mais precisas dos principais componentes do material. Um resumo comparativo de todos os espectros de bagaços na região do *fingerpint* é apresentado através da Figura 13. Novamente, denota-se uma suavização das bandas relativas à lignina (1600, 1510, 1240 e 833 cm^{-1}) na presença da ozonólise, e uma intensificação das bandas relativas às ligações β -glicosídicas pertencentes aos polímeros de carboidratos (1158, 1090 e 897 cm^{-1}) e radicais associados a eles, como carbonila (1732 cm^{-1}) e metil (1344 cm^{-1}), especialmente quando foi aplicado tratamento hidrotérmico. De maneira geral, as

análises de infravermelho foram coerentes com os resultados da análise química composicional.

Figura 13. Espectros de FTIR-ATR na região do *fingerprint* para bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT em comparação ao controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.3.Caracterização estrutural por difração em raio-X

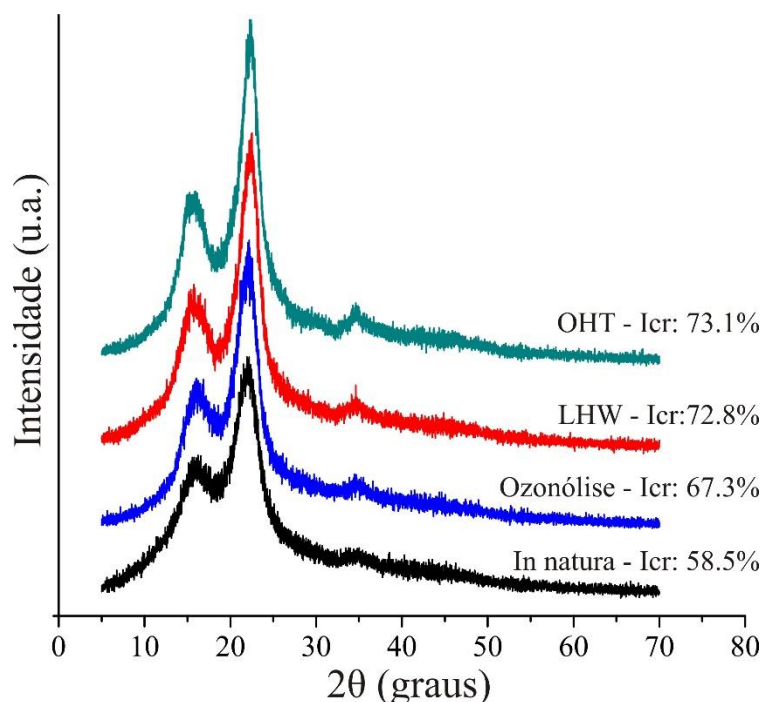
A análise de difração em raio-X permitiu estimar o índice de cristalinidade (Icr) nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar após cada pré-tratamento. A cristalinidade em materiais lignocelulósicos deriva da porção cristalina representada pela celulose e é inversamente proporcional a quantidade de conteúdo amorfo composto principalmente por hemiceluloses e lignina. Amostras de bagaço de cana-de-açúcar normalmente apresentam 3 picos de difração em raio-X a 2θ em aproximadamente 16° , 22° e 35° (Perrone et al., 2016a). Observamos incremento na cristalinidade de todas as amostras pré-tratadas em relação ao controle na seguinte ordem: bagaço OHT > bagaço hidrotérmico > bagaço ozonizado > bagaço não-tratado (Fig. 14). Este comportamento é habitual e justificado pelos múltiplos efeitos de despolimerização e solubilização das porções amorfas previamente discutidos. Outros autores reportam aumento no índice de cristalinidade em diferentes biomassas lignocelulósicas após pré-tratamento alcalino (Gabhane et al., 2015), ácido (Brienzo et al., 2017; Pereira et al., 2016), hidrotérmico (Moutta et al., 2013) e ozonólise (Perrone et al., 2016b). Portanto, as análises de difração em raio-X confirmaram que os materiais pré-tratados se apresentaram proporcionalmente enriquecidos quanto ao conteúdo de celulose inicial, sendo assim, mais cristalinos.

O índice de cristalinidade observado para o bagaço não-tratado, de 58,5%, está de acordo com os dados da literatura e pode variar entre 52% a 60% (Pereira et al., 2016). De maneira similar, o bagaço ozonizado apresentou 67,3% de cristalinidade e é condizente com o índice de 68% reportado por Perrone et al. (2016a). Já o bagaço hidrotérmico desde trabalho apresentou Icr de 72,8%, que foi superior ao índice de cerca de 60% encontrado por Moutta et al. (2013). O bagaço OHT, obtido pela combinação da ozonólise seguida do tratamento hidrotérmico, apresentou o maior índice de cristalinidade de 73,1%, e coerentemente esta amostra foi a que apresentou maior percentual de celulose (72,6%) na análise de caracterização química.

Antigamente considerava-se que o aumento no índice de cristalinidade diminuía a digestibilidade das biomassas na hidrólise devido à maior recalcitrância e, portanto, menores índices de conversão enzimática seriam alcançados nestes substratos (Beguin, Aubert, 1994, Yoshida et al., 2008). Entretanto, o índice de cristalinidade representa

apenas um parâmetro de um dentre vários fatores que devem ser levados em consideração para se prever uma taxa de rendimento de conversão enzimática. Dentre estes fatores destacam-se a acessibilidade da área superficial da celulose, a porosidade e tamanho de partículas do material, e a proporção relativa de celulose disponível para catálise enzimática (Pereira et al., 2016; Sun et al., 2016). Portanto, o índice de cristalinidade não deve ser associado diretamente à digestibilidade dos substratos, mas pode ser interpretado como um indicador do potencial de remoção de componentes não-cristalinos da biomassa pelos pré-tratamentos.

Figura 14. Difratomogramas de raio-X e índices de cristalinidade em bagaço ozonizado, hidrotérmico (LHW) e OHT em comparação ao controle (*in natura*).



Fonte: elaborado pelo autor.

3.4. Caracterização estrutural por microscopia eletrônica de varredura

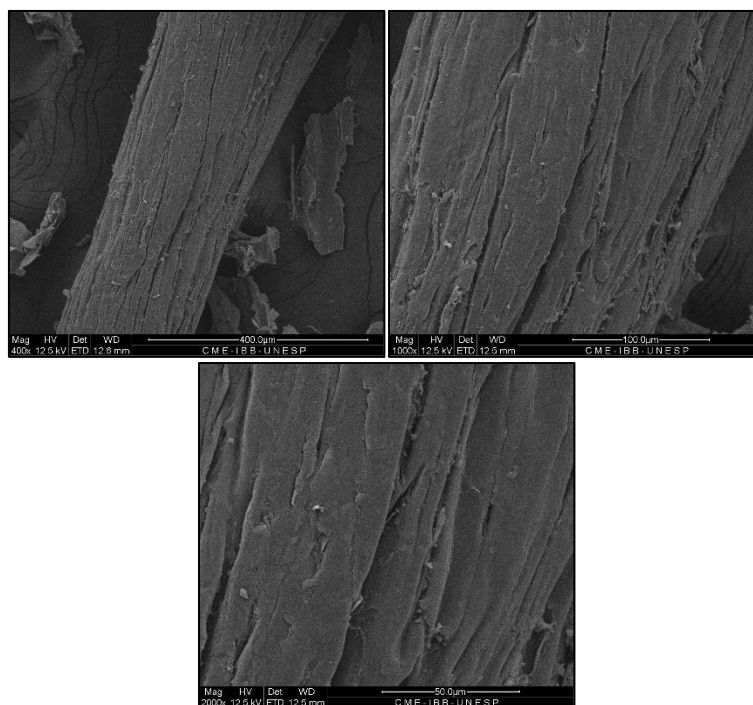
As modificações provocadas pelos pré-tratamentos na morfologia celular do bagaço de cana-de-açúcar foram avaliadas empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A superfície celular do material não-tratado revelou

tecidos lisos e estruturalmente organizados conforme ilustrado na Figura 15. A ação do ozônio provocou diversas alterações na parede celular do bagaço, que foram caracterizadas como “aberturas” ou “rompimentos”, os quais geraram uma superfície visualmente mais porosa, porém ainda estruturalmente preservada, como pode ser observada pela compartimentação celular na amostra de bagaço ozonizado (Fig. 16). Possivelmente esta característica esteja relacionada ao fato de que a ozonólise é uma interação química sólida-gasosa de alta especificidade entre a lignina e o ozônio e que ocorre em temperatura branda de reação, evitando a degradação completa da fibra lignocelulósica.

O bagaço hidrotérmico apresentou intensa deformação superficial especialmente caracterizada por fraturas longitudinais nas fibras (Fig. 17). A ionização das moléculas de água sob alta pressão parece ter promovido diversas alterações aleatórias caracterizadas pela presença de “rompimentos” na superfície do bagaço. Nas amostras de bagaço hidrotérmico detectou-se a presença de estruturas globulares depositadas junto às fibras, que poderiam indicar a formação de lignina globular sob as condições do pré-tratamento testadas (190 °C, 15 min). Sabe-se que a lignina sofre despolimerização e aglomeração em temperaturas inferiores a 200 °C (Zhang et al., 2015; Hamdan et al., 2000). Características similares foram observadas na superfície do bagaço OHT, representado por um desarranjo generalizado da estrutura celular devido à combinação dos dois pré-tratamentos (Fig. 18). Além disso, o bagaço OHT apresentou-se mais quebradiço e frágil durante a fixação das amostras para microscopia.

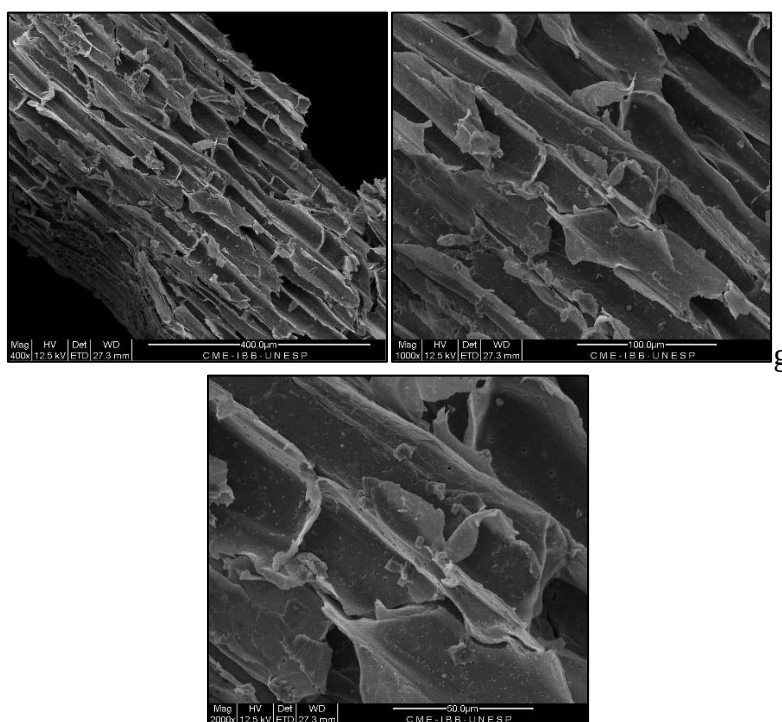
As análises morfológicas por microscopia confirmaram a desconstrução parcial da rígida estrutura celular do material lignocelulósico em bagaço de cana-de-açúcar a partir dos pré-tratamentos propostos, revelando novos conteúdos celulares caracterizados pela irregularidade superficial, maior exposição das macromoléculas e, portanto, possivelmente maior área de contato e maior acessibilidade para a atuação de enzimas na sacarificação.

Figura 15. Eletromicrografias (MEV) de bagaço não-tratado com lentes de 400x, 1000x e 2000x.



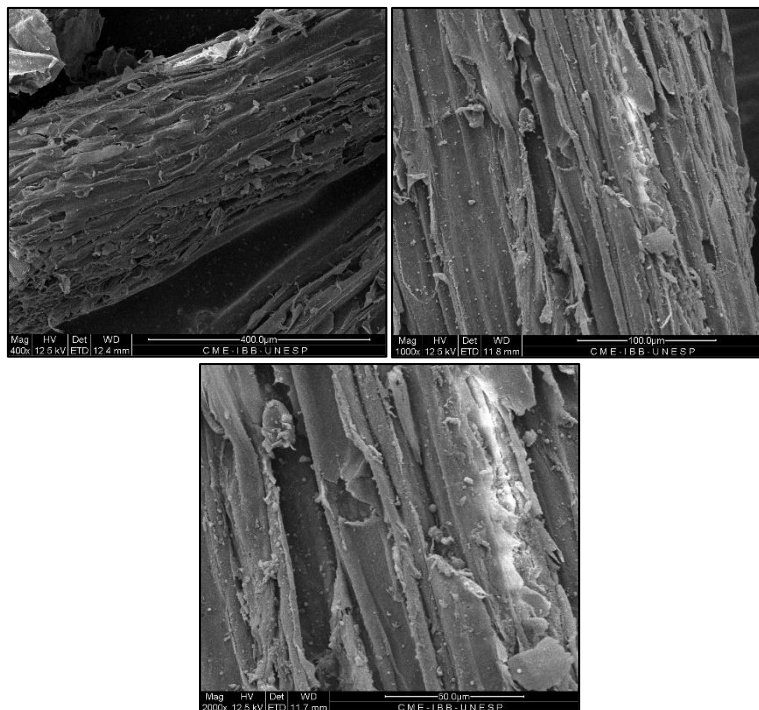
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16. Eletromicrografias (MEV) de bagaço ozonizado com lentes de 400x, 1000x e 2000x.



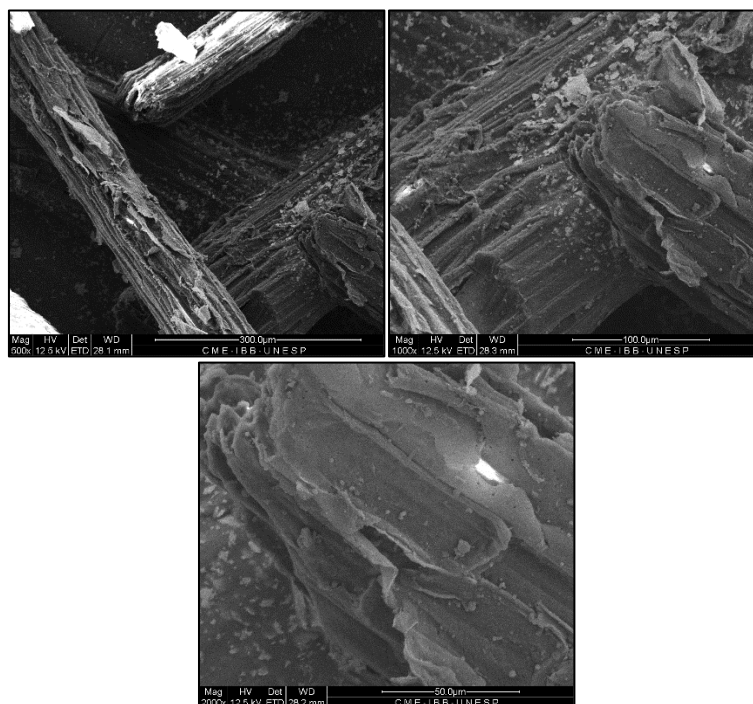
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17. Eletromicrografias (MEV) de bagaço hidrotérmico com lentes de 400x, 1000x e 2000x.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18. Eletromicrografias (MEV) de bagaço OHT com lentes de 400x, 1000x e 2000x.



Fonte: elaborado pelo autor.

4. Conclusões

Este capítulo apresentou os pré-tratamentos aplicados ao bagaço de cana-de-açúcar visando o incremento na oferta e acessibilidade de celulose para fins de hidrólise posterior. Os estudos de caracterização química das biomassas geradas pelos pré-tratamentos ozonólise, hidrotérmico e pela combinação de ambos foram suportados por análises de caracterização estrutural usando as técnicas de espectrometria de infravermelho (FTIR-ATR), espectroscopia de difração em raio-X e análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A partir desse conjunto de dados, destacam-se as seguintes conclusões:

- Tanto a ozonólise quanto o pré-tratamento hidrotérmico são opções eficientes para promover a despolimerização de bagaço de cana-de-açúcar, sendo a ozonólise competente na deslignificação do material, e o processo hidrotérmico efetivo na solubilização das porções amorfas, especialmente as hemiceluloses;
- Combinando os dois pré-tratamentos estabeleceu-se um processo denominado THAO – Tratamento Hidrotérmico Acidificado por Ozônio –, que produz um bagaço de alta potencialidade para a sacarificação enzimática, evidenciado através da alta concentração de celulose parcialmente livre de conteúdos amorfos (lignina e hemicelulose), e um licor rico em xilose monomérica;
- Operações de lavagem convencional em temperatura ambiente se mostraram efetivas para a redução do conteúdo de compostos fenólicos residuais presentes nos sólidos ozonizado e hidrotérmico;
- As respostas obtidas das análises quantitativas de composição química da biomassa, dos espectros de infravermelho e difração em raio-X foram capazes de confirmar os efeitos de deslignificação específicos do ozônio, com consequente enriquecimento do conteúdo cristalino de celulose nas amostras pré-tratadas;
- As análises de microscopia eletrônica de varredura demonstraram a perturbação estrutural e desarranjo da superfície dos bagaços pré-tratados por ozonólise e pré-tratamento hidrotérmico, possivelmente tornando-os mais susceptíveis à hidrólise.

Referências

- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. ed. 20, Washington, **American Public Health Association** 1998, 2-42.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresour. Technol.** 101, 4851–61.
- Barrera-martínez, I., Guzm, N., Peña, E., Vásquez, T., Cerón-Camacho, R., Folch, J., Salazar, J.A.H., Aburto, J., 2016. Ozonolysis of alkaline lignin and sugarcane bagasse: Structural changes and their effect on saccharification. **Biomass and Bioenergy** 94, 167–172.
- Barros, R.D.R.O. De, Paredes, R.D.S., Endo, T., Bon, E.P.D.S., Lee, S.-H., 2013. Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. **Bioresour. Technol.** 136, 288–94.
- Bobleter, O; Pape, G. Method to degrade wood, bark and other plant materials. **Aust Pat** 263661, 1968.
- Brienzo, M., Fikizolo, S., Benjamin, Y., Tyhoda, L., Görgens, J., 2017. Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. **Renew. Energy** 104, 271–280.
- Coca, M., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2016. Chemical Oxidation With Ozone as an Efficient Pretreatment of Lignocellulosic Materials. **Biomass Fractionation Technol.** a Lignocellul. Feed. Based Biorefinery 409–429.
- Cunha, F.M., Kreke, T., Badino, A.C., Farinas, C.S., Ximenes, E., Ladisch, M.R., 2014. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. **Bioresour. Technol.** 172, 249–252.
- Gabhane, J., William, S.P.M.P., Vaidya, A.N., Das, S., Wate, S.R., 2015. Solar assisted alkali pretreatment of garden biomass : Effects on lignocellulose degradation , enzymatic hydrolysis , crystallinity and ultra-structural changes in lignocellulose. **Waste Manag.** 40, 92–99.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresour. Technol.** 100, 1608–1613.
- García-Cubero, M.T., Palacín, L.G., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M., 2012. An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone. **Bioresour. Technol.** 107, 229–34.
- Gitifar, V., Eslamloueyan, R., Sarshar, M., 2013. Experimental study and neural

network modeling of sugarcane bagasse pretreatment with H₂SO₄ and O₃ for cellulosic material conversion to sugar. **Bioresour. Technol.** 148, 47–52.

Godsay, M.P. **Ozone-cellulose studies: Physico-chemical properties of ozone oxidized cellulosic and lignocellulosic materials.** 1985, 239p. Tese (Ph.D. Ciência e Engenharia de Polímeros), Polytechnic Institute of New York, New York.

Gomes, V.J., Colodette, J.L., 2016. Um novo conceito de branqueamento de polpa Kraft de Eucalipto com ozônio em média consistência. **Quim. Nova** XY, 1–6.

Guimarrães, J.R.; Almeida Jr., R.L.; Maniero, M.G. Fadini, P.S., 2010. Ozonização em meio básico para redução de cor do licor negro de indústria de celulose de algodão. **Eng Sanit Ambient**, v.15, n.1, 93-98.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020p, 2008.

Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.** 199, 103–112.

Kaur, U., Oberoi, H.S., Bhargav, V.K., Sharma-Shivappa, R., Dhaliwal, S.S., 2012. Ethanol production from alkali- and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **Ind. Crops Prod.** 37, 219–226.

Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2013. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresour. Technol.** 135, 30–38.

Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2014. Severity Factor Coefficients for Subcritical Liquid Hot Water Pretreatment of Hardwood Chips. **Biotechnol. Bioeng.** 111-2, 254-263.

Kim, Y., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2009. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. **Biotechnol. Prog.** 25, 340–348. doi:10.1002/btpr.137

Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme Microb. Technol.** 48, 408–415.

Ko, J.K., Ximenes, E., Kim, Y., Ladisch, M.R., 2015. Adsorption of enzyme onto lignins of liquid hot water pretreated hardwoods. **Biotechnol. Bioeng.** 112, 447–456.

Kojima, Y., Yoon, S.-L., 2008. Improved enzymatic hydrolysis of waste paper by ozone pretreatment. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 10, 134–139.

Li, C., Wang, L., Chen, Z., Li, Y., Wang, R., Luo, X., Cai, G., Li, Y., Yu, Q., Lu, J.,

2015. Ozonolysis pretreatment of maize stover: The interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process. **Bioresour. Technol.** 183, 240–247.

Li, H., Pu, Y., Kumar, R., Ragauskas, A.J., Wyman, C.E., 2014. Investigation of Lignin Deposition on Cellulose During Hydrothermal Pretreatment , Its Effect on Cellulose Hydrolysis , and Underlying Mechanisms. **Biotechnol. Bioeng.** 111, 485–492.

Mhlongo, S.I., Haan, R. Den, Viljoen-bloom, M., Zyl, W.H. Van, 2015. Enzyme and Microbial Technology Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit / deactivate cellulase performance. **Enzyme Microb. Technol.** 81, 16–22.

Michelin, M., Ximenes, E., de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, M., Ladisch, M.R., 2015. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresour. Technol.** 199, 275–278.

Miura, T., Lee, S.-H., Inoue, S., Endo, T., 2012. Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar. **Bioresour. Technol.** 126, 182–6.

Moutta, R. de O., Silva, M.C., Corrales, R.C.R., Santos Cerullo, M.A., Ferreira-Leitão, V.S., Bon, E.P. da S., 2013. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected to Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. **J. Microb. Biochem. Technol.** 1, 1–8.

Oliveira, A.R.M., Wosch, C.L., 2012. Ozonólise: a busca por um mecanismo. **Quim. Nova** 35, 1482–1485.

Panneerselvam, A., Sharma-Shivappa, R.R., Kolar, P., Ranney, T., Peretti, S., 2013. Potential of ozonolysis as a pretreatment for energy grasses., **Bioresource technology.** 148, 242–248.

Pereira, S.C., Maehara, L., Machado, C.M.M., Farinas, C.S., 2016. Physical-chemical-morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. **Renew. Energy** 87,

Perrone, O. M. **Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática.** São José do Rio Preto, 2015. 68p. (Dissertação de Mestrado em Química, UNESP).

Perrone, O.M., Colombari, F.M., Rossi, J.S., Moretti, M.M.S., Bordignon, S.E., Nunes, C. da C.C., Gomes, E., Boscolo, M., Da-Silva, R., 2016a. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresour. Technol.** 218, 69–76.

Perrone, O.M., Rossi, J.S., Maria, M., Moretti, D.S., Carreira, C., Bordignon, S.E., Gomes, E., Da-silva, R., Boscolo, M., 2016b. Influence of ozonolysis time during

sugarcane pretreatment : Effects on the fiber and enzymatic saccharification. **Bioresour. Technol.** *in press*.

Poletto, M., Zattera, A.J., Santana, R.M.C., 2012. Structural Differences Between Wood Species: Evidence from Chemical Composition, FTIR Spectroscopy, and Thermogravimetric Analysis. **J. Appl. Polym. Sci.** 126, 336–343.

Quesada, J.; Rubio, M.; Gómez, D. Chemical characterization of ozonated lignin solutions from corn (*Zea mays*) stalk and poplar (*Populus deltoides*) wood by capillary gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, 20: 565-568, 1997.

Ruiz, A., Rodri, R.M., Fernandes, B.D., Vicente, A., Teixeira, A., 2013. Hydrothermal processing , as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept : A review. **Renew. Sustain. Energy Rev.** 21, 35–51.

Santucci, B.S., Maziero, P., Rabelo, S.C., Curvelo, A.A.S., Pimenta, M.T.B., 2015. Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment : a Kinetic Assessment. **BioEnergy Res.** 8, 1778–1787.

Seagal, L.; Creely, J.J.; Martin, A.E. & Conrad, C M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal** 29(10):786-794, 1959.

Shi, F., Xiang, H., Li, Y., 2015. Combined pretreatment using ozonolysis and ball milling to improve enzymatic saccharification of corn straw. **Bioresour. Technol.** 179, 444–451.

Silva, V.F.N., Arruda, P. V., Felipe, M.G.A., Gonçalves, A.R., Rocha, G.J.M., 2011. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 38, 809–817.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP)**. NREL, Golden, Co., USA, 2012.

Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. **Determination of of Extractives in Biomass (LAP)**. NREL, Golden, Co., USA, 2008.

Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R., 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresour. Technol.** 199, 49–58.

Toquero, C., Bolado, S., 2014. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresour. Technol.** 157, 68–76.

Travaini, R., Barrado, E., Bolado-rodríguez, S., 2016a. Effect of ozonolysis parameters on the inhibitory compound generation and on the production of ethanol by *Pichia stipitis* and acetone-butanol-ethanol by *Clostridium* from ozonated and water washed sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 218, 850–858.

Travaini, R., Marangon-Jardim, C., Colodette, J.L., Bolado-Rodríguez, S., 2015. **Pretreatment of Biomass - 7 - Ozonolysis**, 2nd ed. Elsevier.

Travaini, R., Martín-Juárez, J., Lorenzo-Hernando, A., Bolado-Rodríguez, S., 2016b. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresour. Technol.** 199, 2–12.

Travaini, R., Otero, M.D.M., Coca, M., Da-Silva, R., Bolado, S., 2013. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresour. Technol.** 133C, 332–339.

Vargas, F., Domínguez, E., Vila, C., Rodríguez, A., Garrote, G., 2015. Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. **Bioresour. Technol.** 191, 263–270.

Vidal, P.F., Molinier, J., 1988. Ozonolysis of lignin — Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass** 16, 1–17.

Wang, W., Zhu, Y., Du, J., Yang, Y., Jin, Y., 2015. Influence of lignin addition on the enzymatic digestibility of pretreated lignocellulosic biomasses. **Bioresour. Technol.** 181, 7–12.

Weil, J., Brewer, M., Hendrickson, R., Sarikaya, A., Ladisch, M.R., 1998. Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 70–72, 99–111.

Ximenes, E., Kim, Y., Ladisch, M.R., 2013. **Biological Conversion of Plants to Fuels and Chemicals and the Effects of Inhibitors**. Aqueous Pretreat. Plant Biomass Biol. Chem. Convers. to Fuels Chem. 1st ed, 39–60.

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme Microb. Technol.** 48, 54–60.

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme Microb. Technol.** 46, 170–176.

Xiros, C., Olsson, L., 2014. Comparison of strategies to overcome the inhibitory effects in high-gravity fermentation of lignocellulosic hydrolysates. **Biomass and Bioenergy** 65, 79–90.

Yu, Z., Jameel, H., Chang, H.-M., Park, S., 2011. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 102, 9083–9.

Zhang, Q., Chen, Q., Chen, J., Wang, K., Yuan, S., Sun, R., 2015. Morphological variation of lignin biomacromolecules during acid-pretreatment and biorefinery-based fractionation. **Ind. Crop. Prod.** 77, 527–534.

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Zhou, G., Yuan, Z., 2016a. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresour. Technol.** 199, 68–75.

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Zhou, G., Yuan, Z., 2016b. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresour. Technol.** 199, 68–75.

Capítulo 3: Sacarificação e fermentação alcoólica de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol



RESUMO

A etapa de sacarificação enzimática é crucial para a obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar. A acessibilidade da celulose como principal substrato é determinante para alta performance enzimática de celulasas e parece estar diretamente associada a remoção de conteúdo amorfo, representado por lignina e hemicelulose, durante o pré-tratamento. O bagaço OHT apresentou maior digestibilidade em relação aos bagaços ozonizado e hidrotérmico, acumulando mais de 50 g·L⁻¹ de glicose no meio hidrolisado, correspondente a um rendimento de 67%. O desenvolvimento da ozonólise na presença de ácido sulfúrico de baixa molaridade é capaz de reduzir o tempo de processo pela metade e aumentar a oferta de glicose em cerca de 23% em relação à ozonólise com água, por outro lado, estimula-se o acúmulo de compostos inibitórios no licor, especialmente furfural e hidroximetilfurfural. A fermentabilidade dos meios hidrolisados de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT foi comprovada com eficiência superior a 90% em tempos de fermentação que variaram entre 20 e 42 horas para *Saccharomyces cerevisiae* linhagem JP-1, e entre 12 e 42 horas para a linhagem Y150, que demonstrou produtividade superior de etanol devido a sua adaptabilidade celular para compostos fenólicos.

Palavras-chave: Sacarificação. Hidrólise. Enzima. Celulase. Fermentação alcoólica. Etanol. Levedura.

ABSTRACT

Enzymatic saccharification is a crucial step to achieve fermentable sugars on ethanol production from sugarcane bagasse. The accessibility of cellulose, the main substrate, is a key-point to achieve high performance of cellulases and it seems directly associated with the removal of amorphous components, represented by lignin and hemicellulose, during the pretreatment step. OHT bagasse showed the highest digestibility in comparison to ozonated and hydrothermal bagasse, reaching more than 50 g·L⁻¹ of glucose in the hydrolysate, corresponding to 67% of glucan conversion yield. By performing ozonolysis using low molarity sulfuric acid is possible to reduce the half-time of processing and increase around 23% of glucose concentration in comparison to the ozonolysis using water, however, a higher concentration of inhibitory by-products was detected on liquor, especially furfural and hydroxymethylfurfural. The fermentability of both ozonated, hydrothermal and OHT-bagasse hydrolysates was proved with 90% of efficiency or upper, and fermentation run along 20 to 42 hours using Saccharomyces cerevisiae strain JP-1, and 12 to 42 hours to strain Y150. The higher productivity of Y150 could be attributed to its cellular adaptability to phenolic compounds.

Keywords: Saccharification. Hydrolysis. Enzyme. Cellulase. Alcoholic fermentation. Ethanol. Yeast.

1. Introdução

O processo de desconstrução da rígida estrutura lignocelulósica e sua recalitrância inicia-se com os procedimentos de pré-tratamento, reconhecidamente capazes de promover perturbações químicas e estruturais competentes no incremento da digestibilidade dos polímeros de carboidratos, os quais, na sequência, são alvos de múltiplos ataques catalíticos eficientemente realizados por diferentes enzimas hidrolíticas que liberam moléculas monoméricas assimiláveis por micro-organismos. Portanto, a desconstrução da fibra lignocelulósica é dependente da etapa de despolimerização da estrutura original fragilizada pelo pré-tratamento, também reconhecida como sacarificação, da qual se obtém os açúcares redutores para os processos fermentativos de obtenção de biocombustíveis e bioquímicos renováveis.

A sacarificação enzimática tem sido amplamente estudada comparativamente à sacarificação ácida, que requer condições extremas de natureza físico-química e implica na produção de uma série de subprodutos inespecíficos e potencialmente tóxicos, tanto ao próprio processo, quanto ao meio ambiente. Por outro lado, o processo biológico mediado por enzimas é brando, sustentável e vem evoluindo no quesito eficiência $\times$ custo de produção, que ainda representa o maior desafio para sua ampla utilização industrial. Os coquetéis enzimáticos empregados na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar são habitualmente compostos por três classes de enzimas: (I) endoglucanases (EGs), responsáveis pelo rompimento das ligações β -glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, gerando oligômeros e novas terminações redutoras aleatórias; (II) exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHs), que atuam sobre as extremidades livres das cadeias de celulose, gerando principalmente celobiose; e (III) β -glicosidases, que são responsáveis pela liberação de glicose a partir da celobiose. A catálise enzimática para a decomposição da celulose acontece de maneira cooperativa e simultânea e normalmente é favorecida na presença de enzimas acessórias, como aquelas com atividades de xilanases e β -xilosidases sobre as hemiceluloses, oxidoredutases sobre as regiões cristalinas da celulose (Hu et al., 2014), e proteínas sem atividade catalítica, como *swolleínas* e expansinas, que aumentam a acessibilidade das enzimas ao substrato por

promover o rompimento de ligações de hidrogênio nas microfibrilas da celulose (Liu et al., 2015).

De fato, a sacarificação da biomassa lignocelulósica é um processo tecnicamente complexo devido ao grande número de fatores que influenciam na digestibilidade do material, como, por exemplo, o índice de cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, a composição química e a distribuição da lignina e das hemiceluloses junto à celulose, a área superficial de contato de cada substrato, a espessura da parede celular, a porosidade e o tamanho das partículas (Yan et al., 2015). Assim, o estudo e o aperfeiçoamento de enzimas para a máxima desconstrução do material lignocelulósico representa um desafio constante na busca por coquetéis de alta performance que viabilizem o processamento bioquímico de resíduos agrícolas lignocelulósicos.

Os processos de fermentação alcoólica são extensivamente conhecidos e o metabolismo da levedura etanologênica *Saccharomyces cerevisiae* é um dos mais estudados na microbiologia. Há, entretanto, desafios particulares que os meios de cultivo obtidos a partir de hidrolisado de materiais lignocelulósicos impõem às clássicas leveduras produtoras de etanol. Tais desafios dizem respeito principalmente à presença de uma série de compostos inibitórios e seus efeitos negativos sobre as células microbianas. Dependendo do tipo de pré-tratamento e do grau de severidade empregado, é possível encontrar até três classes de inibidores de fermentação, que são: os ácidos alifáticos – como os ácidos acético, fórmico e levulínico –, os aldeídos furânicos – como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) –, e os compostos fenólicos e aromáticos – como ácido ferúlico e vanilina, por exemplo. A inibição por ácidos carboxílicos alifáticos é menos preocupante em meios hidrolisados de gramíneas (ex. a cana-de-açúcar) do que em hidrolisados de madeiras, já que o baixo conteúdo de grupos acetila naqueles minimiza o acúmulo excessivo de ácido acético, enquanto o ácido fórmico e levulínico são gerados apenas a partir da degradação de compostos furânicos resultantes da desidratação de carboidratos em condições severas de pré-tratamento, que podem ser controladas. Entretanto, há uma grande preocupação pela inibição de leveduras e outros micro-organismos a partir de ácidos carboxílicos aromáticos derivados da degradação da lignina, sejam estes compostos fenólicos (ex. ácido ferúlico) ou não-fenólicos (ex. ácido cinâmico) (Jönsson and Martín, 2016).

Diversas estratégias têm sido propostas para contornar os problemas de inibição durante a fermentação alcoólica de meios hidrolisados lignocelulósicos a fim de viabilizar o seu processamento em condições comerciais em larga escala. Alguns grupos de pesquisa focam no desenvolvimento microbiano empregando técnicas de seleção e adaptação celular de linhagens (Favaro et al., 2013; Wimalasena et al., 2014), outros empregam a engenharia genética para a atribuição de genes de resistência aos inibidores (Cunha et al., 2015; X. Wang et al., 2015); ou buscam o desenvolvimento de eficientes processos de detoxificação de hidrolisados, que inicialmente foram extensivamente estudados empregando solventes, resinas poliméricas ou reagentes químicos e oxidativos, e mais recentemente tendem a soluções biológicas através de enzimas ou micro-organismos (bioabateamento) (Cao et al., 2013; Kapoor et al., 2015; Nichols et al., 2010); e ainda existem estratégias de engenharia de processos que prezam por estudar condições operacionais mais brandas que evitem o acúmulo de inibidores, ou que utilizam processos de redução da concentração dos inibidores por evaporação ou tratamento térmico, por exemplo, ou ainda operam com alimentação fracionada para diminuir a toxicidade do(s) composto(s) ao longo do processo, como os sistemas de batelada alimentada (Jönsson et al., 2013).

A conversão bioquímica de biomassa lignocelulósica inclui, portanto, as etapas de sacarificação enzimática e de fermentação alcoólica como passos obrigatórios e intermediários no processo de obtenção de etanol celulósico, que se inicia com o pré-tratamento e finaliza-se com a etapa de destilação para a obtenção do álcool purificado. Ambas as etapas bioquímicas demandam de intenso desenvolvimento tecnológico a fim de garantir condições custo-efetivas compatíveis com o produto final – etanol – de baixo valor unitário obtido a partir de grandes volumes de produção. Dessa maneira, a viabilidade tecno-econômica do etanol celulósico revela-se estritamente dependente da sobreposição destes desafios, que incluem a alta conversão dos polímeros estruturais em açúcares redutores durante a hidrólise, e a produção etanólica mesmo em condições adversas de fermentação. Neste capítulo estão reunidos os estudos acerca do desenvolvimento da hidrólise enzimática e da fermentação alcoólica dos bagaços ozonizado, hidrotérmico e OHT propostos como matéria prima para o etanol celulósico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Os substratos utilizados nos experimentos de hidrólise enzimática foram amostras de bagaço ozonizado, bagaço hidrotérmico e bagaço OHT, obtido pela combinação das técnicas de ozonólise e hidrotérmico sequencialmente. Os pré-tratamentos foram desenvolvidos a partir de bagaço *in natura*, fornecido pela Usina Alta Mogiana (São Joaquim da Barra/SP), que foi lavado com água corrente 6 vezes para a remoção dos carboidratos solúveis e impurezas minerais, secado em estufa a $42 \pm 2^\circ \text{C}$ e triturado para obtenção de partículas de tamanho inferior a 1,5 mm de comprimento (triturador TRAPP® 400). O bagaço seco foi armazenado em temperatura ambiente e livre de umidade até o desenvolvimento dos pré-tratamentos. Um substrato de celulose comercial (Solka Floc® 300) foi obtido como doação através da empresa *International Fiber Corporation* (New York, EUA).

Os extratos enzimáticos empregados nos experimentos foram as formulações comerciais Cellic® CTEC2 e HTEC2, gentilmente fornecidas pela empresa Novozymes *Latin America* (Araucária/PR), em novembro de 2013. Os demais reagentes químicos utilizados em análise e preparo de soluções ou padrões analíticos foram da marca Sigma-Aldrich® ou equivalente.

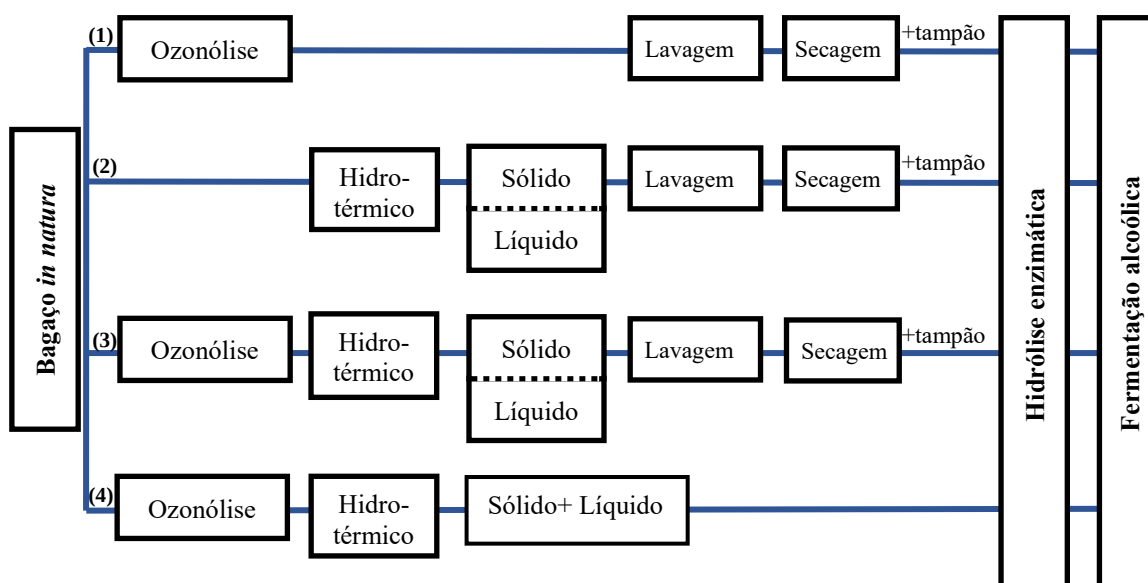
Três leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* típicas da indústria sucroalcooleira foram utilizadas nos ensaios de fermentação, sendo a linhagem JP-1, isolada na Usina Japangu (Santa Rosa/PB) (Silva-Filho *et al.*, 2005), fornecida pela empresa AEB Bioquímica (Curitiba/PR), e as linhagens PE-2 e CAT-1, fornecidas pela empresa FERMENTEC (Piracicaba/SP). Todas as leveduras comerciais foram recebidas na forma liofilizada. Uma quarta linhagem de *S. cerevisiae*, denominada Y-150, derivada da cepa de referência NRRL Y-1546, foi previamente adaptada para maior tolerância a certos compostos fenólicos por cultivos sucessivos na presença de licor hidrotérmico de madeira (*hardwood*) por outros pesquisadores. Esta linhagem foi cedida pelo *Laboratory of Renewable Resources Engineering*, da *Purdue University* para estudos comparativos com as linhagens industriais.

2.2. Métodos

2.2.1. Pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar

Os pré-tratamentos por ozonólise e hidrotérmico foram promovidos individualmente e combinados, conforme esquematizado na Figura 1. Os conteúdos dos pré-tratamentos individuais (linhas 1 e 2) e do pré-tratamento combinado (linhas 3) foram submetidos à hidrólise enzimática pela ressuspensão dos sólidos secos pré-tratados em solução tampão. Na linha 4 está ilustrado o procedimento de pré-tratamento combinado com uso direto dos sólidos e do licor gerado na etapa hidrotérmica integralmente na hidrólise, sem realizar operações de lavagem, secagem ou adição de tampão. O objetivo do uso direto dos sólidos com o licor foi estimar o potencial de inibição presente no conteúdo gerado pela combinação de ozonólise e pré-tratamento hidrotérmico sobre as enzimas hidrolíticas. Na sequência, os bagaços pré-tratados hidrolisados geraram os meios hidrolisados resultantes da sacarificação, que foram destinados à fermentação alcoólica para a produção de etanol.

Figura 1. Esquema de pré-tratamentos empregados em bagaço de cana-de-açúcar destinado à hidrólise enzimática.



Fonte: elaborado pelo autor.

O pré-tratamento por ozonólise foi realizado conforme descrito por Perrone et al. (2016) em colunas de leito fixo de vidro (2,7 cm x 50 cm) usando gás ozônio (O₃) gerado pelo processo de descarga elétrica tipo corona (equipamento Radast 10C, Ozoxi-Ozônio). Cada coluna continha 25 gramas de bagaço seco (teor de umidade ~5% (m/v)) umidificado com 12,0 mL de água destilada para uma umidade final de 50% (m/v) e submetido ao fluxo saturado de gás ozônio por 60 minutos, em temperatura ambiente e com vazão de alimentação de 32 mg de O₃ por minuto. Condições experimentais distintas foram testadas através de um Planejamento Fatorial 2³ com repetição de amostras aleatorizadas para os fatores: “solução umidificante” (ácida ou básica), “concentração” (0,1M ou 0,5M) e “tempo de pré-tratamento” (30 minutos ou 60 minutos). Como solução ácida foi utilizado Ácido Sulfúrico (H₂SO₄), e como solução básica empregou-se Hidróxido de Sódio (NaOH), em substituição à água como agente umidificante. Após a ozonólise, o bagaço ozonizado apresentava naturalmente seco e foi direcionado aos procedimentos de lavagem com água destilada ou hidrólise enzimática.

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado conforme descrito por Kim et al. (2014) utilizando tubos de aço inoxidável (2,2 cm x 13,5 cm) e banho de areia fluidizado (Tecam[®] SBL-1, Figura 4-A). Cada tubo foi preenchido com 3,5 gramas de amostra seca (teor de umidade ~5% (m/v)) a ser tratada (bagaço *in natura* ou bagaço ozonizado) e 33,5 mL de água destilada, equivalente a uma mistura na concentração de 10% (m/v). Os tubos foram rigidamente vedados com tampas de rosca e dispostos no banho de areia pré-aquecido a 190 °C por 20 minutos (5 minutos para equilíbrio térmico, 15 minutos de pré-tratamento). Ao final, os tubos foram submersos em banho de resfriamento em temperatura ambiente por 10 min. Os sólidos pré-tratados foram separados do licor por filtração a vácuo em papel filtro Whatman n. 1 e dispostos em estufa para secagem (45 °C, 24 h) antes dos procedimentos de lavagem ou hidrólise enzimática.

O pré-tratamento combinado seguiu exatamente as mesmas condições operacionais descritas nos pré-tratamento individuais, sendo apenas composto pelas duas etapas sequencialmente para uma mesma amostra de bagaço, com a ozonólise como primeiro pré-tratamento, e hidrotérmico como segundo.

2.2.2. Procedimentos de lavagem de bagaço pré-tratado

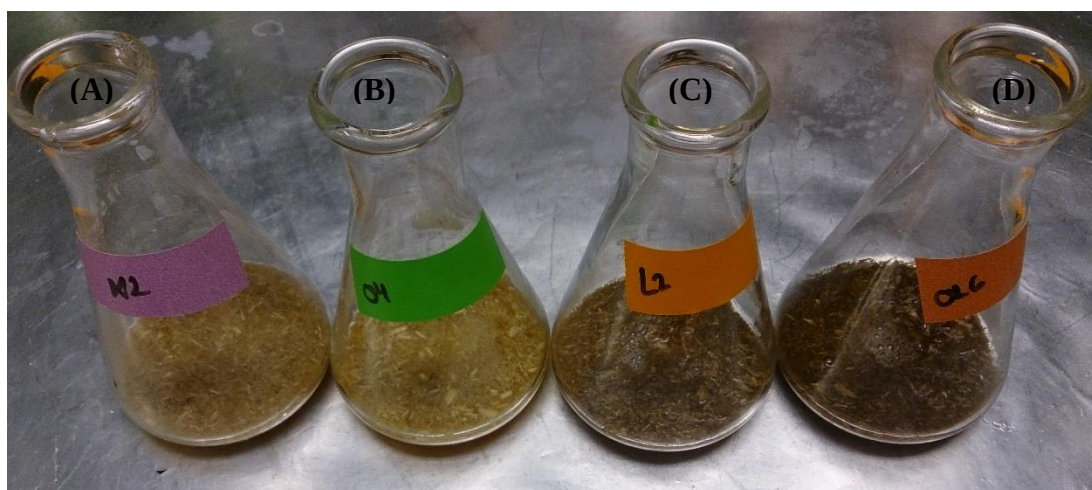
As lavagens foram realizadas a partir da ressuspensão dos bagaços secos e pré-tratados em água destilada a 5% (50 gL⁻¹). A suspensão foi mantida sob agitação magnética por 30 min em temperatura ambiente antes da separação por filtração em papel filtro Whatman n. 1. O procedimento foi repetido 5 vezes para o bagaço ozonizado e para o bagaço hidrotérmico, seguido de secagem em estufa (45 °C, 24 h) antes dos experimentos de hidrólise enzimática. O bagaço OHT recebeu apenas uma etapa de lavagem em temperatura ambiente, e outro procedimento, denominado lavagem extrativa, foi realizado comparativamente neste bagaço. A lavagem extrativa foi realizada baseada na metodologia de preparo de amostra para análise de extrativos em biomassa (Sluiter *et al.*, 2008), a qual emprega solventes aquoso e orgânico sob altas temperaturas e ciclos longos de lavagem em equipamento Soxhlet. A realização da lavagem extrativa foi motivada pela hipótese de remover intensamente os compostos fenólicos solúveis da biomassa pré-tratada e, então, avaliar o desempenho do material com baixa concentração de inibidores na hidrólise enzimática. Os compostos fenólicos são tipicamente responsáveis por ligar-se de maneira improdutiva às enzimas e, assim, reduzir sua eficiência catalítica. Todas as amostras de bagaço lavado foram submetidas à hidrólise em comparação aos respectivos conteúdos não-lavados, como controles, para estimar os possíveis incrementos na conversão de celulose para glicose na ausência de compostos inibidores típicos da cada pré-tratamento.

2.2.3. Experimentos de hidrólise enzimática

Os experimentos de hidrólise foram realizados em frascos *erlenmeyer* com volume reacional total de 20 mL (Fig. 2) dispostos em incubadora ou banho-maria com agitação. As condições experimentais fixas foram: solução-tampão citrato de sódio 0,05M com pH final entre 4,9 - 5,1, 10% de sólidos totais (m/v), temperatura de incubação de 50 °C, agitação orbital de 150 rpm. O tempo de hidrólise e a carga enzimática variaram entre os diferentes experimentos e estão discriminados junto aos resultados.

A carga enzimática foi padronizada pela concentração de proteínas totais por grama de glucana, sendo empregada em torno de $10 \text{ mg proteína} \times \text{g glucana}^{-1}$ entre os diferentes experimentos de hidrólise. A dosagem foi realizada a partir do preparo de uma solução-mãe das enzimas comerciais Cellic CTEC2 e HTEC2, misturadas na proporção de 4:1, respectivamente, e diluídas em tampão citrato de sódio 0,05M. Esta solução-mãe continha cerca de $7,5 \text{ mg proteína} \times \text{mL}^{-1}$, e as seguintes atividades enzimáticas: $180 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$ de atividade FPase, $13.213 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ de atividade de xilanase e $7.240 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ de atividade de β -glicosidase. Finalmente, a solução-mãe foi utilizada nos experimentos em diluição igual ou superior a 10%, de acordo com o volume necessário para obter a concentração de $10 \text{ mg proteína} \times \text{g glucana}^{-1}$ nos diferentes bagaços. A quantidade de glucana variou em cada bagaço em função dos pré-tratamentos, e foi estabelecida a partir das análises químicas de caracterização de celulose nas biomassas. Alternativamente, Solka Floc® 300, uma celulose comercial com 80% de glucana e 20% de xilana, foi empregada como substrato sintético para fins comparativos de hidrólise na presença de licor sob as mesmas condições experimentais relatadas.

Figura 2. Ilustração do conteúdo de bagaço com tampão antes da hidrólise enzimática.



Legenda: (A) bagaço não-tratado; (B) bagaço ozonizado; (C) bagaço hidrotérmico; (D) bagaço OHT.
Fonte: autor.

A amostragem dos pontos experimentais durante a hidrólise foi realizada a partir da coleta dos sobrenadantes da reação, que foram centrifugados (5.000 rpm, 10 min),

diluídos em água ultrapura e filtrados em membranas de 0,22 µm para quantificação de glicose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A conversão da hidrólise enzimática (Y_{gli}) foi calculada conforme a Equação 1.

Equação 1. Conversão da hidrólise enzimática.

$$Y_{gli} = 100 \frac{[gli] \times 0,9}{[ST] \times T_{cel}}$$

Sendo:

- [gli] = concentração de glicose no sobrenadante do meio hidrolisado, em g·L⁻¹;
- [ST] = concentração de sólidos totais (bagaço) em relação ao volume de tampão na reação de hidrólise enzimática, em g·L⁻¹;
- T_{cel} = teor de celulose na biomassa de acordo com a análise de caracterização química de cada bagaço na base recebida, sendo: 0,359 (35,9%) para bagaço não-tratado; 0,452 (45,2%) para bagaço ozonizado; 0,471 (47,1%) para bagaço hidrotérmico; 0,725 (72,5%) para bagaço OHT.
- 0,9 = fator de correção estequiométrica na conversão de celulose para glicose.

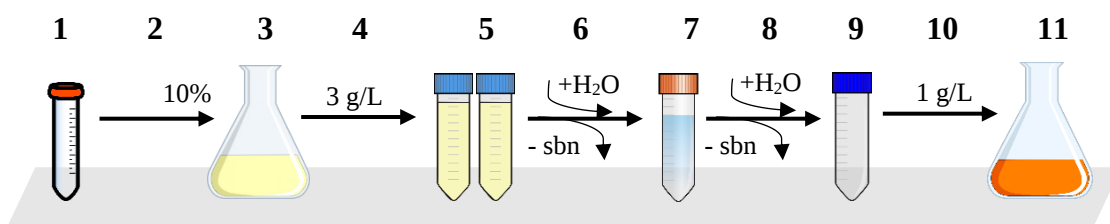
2.2.4. Experimentos de fermentação alcoólica

Os sobrenadantes obtidos da hidrólise enzimática de cada amostra de bagaço, denominados meios hidrolisados, foram preparados para a etapa fermentativa através de esterilização por filtração em membrana de 0,22 µm e dispostos em frascos *erlenmeyer* de 50 mL vazios previamente esterilizados por autoclavação. A filtração esterilizante foi escolhida por preservar a composição química original do meio, uma vez que o objetivo foi avaliar a fermentabilidade dos meios hidrolisados de forma integral a partir dos pré-tratamentos, incluindo possíveis inibidores que poderiam ser volatilizados sob altas temperaturas de esterilização por autoclavação, por exemplo.

As linhagens JP-1, CAT-1, PE-2 da levedura *S. cerevisiae* foram inicialmente reativadas a partir do conteúdo liofilizado em meio YM (composição: 3 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g·L⁻¹ de extrato de malte, 5 g·L⁻¹ de peptona, 10 g·L⁻¹ de glicose) e incubadas em estufa bacteriológica a 32 °C, com agitação de 120 rpm por 24 horas para a obtenção dos pré-inóculos. Cada pré-inóculo foi transferido ao nível de 10% (v/v) para um novo meio de cultura formulado com sacarose e sais para a propagação do inóculo para os experimentos de fermentação com hidrolisado de bagaço. O meio de sacarose foi

composto por: $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato dipotássico (K_2HPO_4), $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloreto de amônio (NH_4Cl) e $0,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de magnésio (MgSO_4) (Rabelo, 2011). Os inóculos foram cultivados em frascos contendo 20 mL de meio de sacarose incubado (condições: 32°C , 120 rpm, aerobiose) em crescimento até atingir uma concentração celular equivalente a $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em peso seco, que foi monitorada a cada 2 horas pela medida da densidade óptica a 630 nm em espectrofotômetro. Os dados da densidade óptica foram correlacionados com curvas de crescimento celular [absorbância $\times$ peso seco] de cada linhagem. A padronização dos inóculos envolveu a coleta do sobrenadante do meio de sacarose, centrifugação (5.000 rpm, 10 min) para a coleta das células precipitadas, lavagem com 10 mL de água destilada esterilizada, outra etapa de centrifugação para a coleta das células lavadas, e ressuspensão final em 5 mL de água destilada esterilizada. Neste procedimento a quantidade de células foi concentrada 4 vezes a partir da suspensão inicial. Então, a suspensão de inóculo (células lavadas e concentradas) foi transferida volumetricamente para o meio hidrolisado para a concentração final de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de células no experimento. O procedimento de preparo de inóculo está ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Ilustração do procedimento de preparo de inóculo para a fermentação alcoólica.



Legenda: (1) Pré-inóculo em 5 mL de meio YM; (2) Incubação em estufa a 32°C , 120 rpm, aerobiose; (3) Inóculo em 20 mL de meio de sacarose a 10% v/v; (4) Incubação (32°C , 120 rpm, aerobiose) com monitoramento da concentração celular até atingir $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; (5) Centrifugação (5.000 rpm, 10 min) para obtenção do precipitado de células; (6) Descarte do sobrenadante (sbn) e lavagem das células com 10 mL de água destilada esterilizada; (7) Centrifugação (5.000 rpm, 10 min) para obtenção do precipitado de células lavadas; (8) Descarte do sbn e ressuspensão das células em 5 mL de água destilada esterilizada; (9) Suspensão celular concentrada 4 vezes; (10) Transferência do volume da suspensão celular correspondente à concentração final de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no ensaio como inóculo; (11) Fermentação alcoólica de meio hidrolisado esterilizado por filtração a 32°C , anaerobiose.

Fonte: elaborado pelo autor.

A fermentação alcoólica dos meios hidrolisados foi realizada a $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 36 ou 42 horas em condição microaerófila. Durante os experimentos de fermentação foram retiradas alíquotas a cada 12 horas para o acompanhamento do consumo de glicose, produção de etanol e desenvolvimento celular. Os parâmetros empregados para avaliar o desempenho da fermentação alcoólica foram:

- **Produção máxima** de etanol (g L^{-1}): quantificação da concentração total de etanol no meio reacional no final do processo fermentativo.
- **Produtividade** em etanol ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$): taxa de produtividade obtida pela correlação entre a produção máxima de etanol em função do tempo total do processo, conforme a Equação 2.

Equação 2. Taxa de produtividade de etanol.

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f}$$

Sendo: Q_P : taxa de produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

P_f : concentração do produto (g L^{-1}) no final de reação

P_0 : concentração do produto (g L^{-1}) no início da reação

t_f : tempo final de fermentação (horas)

- **Rendimento** de conversão de substrato em produto: fator de conversão que correlaciona a concentração de produto formado em relação à concentração de substrato consumido, segundo a Equação 3.

Equação 3. Rendimento de conversão.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$$

Sendo: $Y_{P/S}$: fator de rendimento do produto

S_0 : concentração de substrato (g L^{-1}) no início da reação

S_f : concentração de substrato (g L^{-1}) no final da reação

- **Eficiência** da fermentação (E%): índice percentual que faz referência à formação de etanol no processo em relação à concentração teórica obtida em reação estequiométrica a partir da glicose, conforme demonstrado na Equação 4.

Equação 4. Eficiência da fermentação.

$$E_{(\%)} = \frac{(P_f - P_0) 100}{(S_0 - S_f) 0,511}$$

Sendo: P_f : concentração do produto (g L^{-1}) no final de reação
 P_0 : concentração do produto (g L^{-1}) no início da reação
 S_0 : concentração de substrato (g L^{-1}) no início da reação
 S_f : concentração de substrato (g L^{-1}) no final da reação
0,511: fator de conversão estequiométrica de glicose em etanol.

2.2.5. Ensaios analíticos

A quantificação de carboidratos (glicose, xilose, arabinose, celobiose) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em HPLC (marca Waters Corp., Milford, MA) equipado com coluna de troca iônica (Aminex HPX-87H, 300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) e conectado a uma bomba dosadora (Milton Roy Co., Ivyland, PA), amostrador automático (WatersTM 717 plus autosampler) e detector por índice de refração (WatersTM 2414).

As análises do etanol produzido a partir dos meios hidrolisados foram realizadas por cromatografia HPLC (Waters Corp., Milford, MA; coluna de troca iônica Aminex HPX-87H, 300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) ou, opcionalmente, por micro-destilação seguida de quantificação em densímetro digital (Antoon Paar, DMA4500 M).

A quantificação de proteínas totais nos extratos enzimáticos foi realizada por espectrofotometria com ácido bicinconínico utilizando kit PierceTM BCA (ThermoFischer Scientific), que se baseia na detecção da reação colorimétrica de cor púrpura do ácido bicinconínico com cobre após a redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} por proteínas em meio alcalino (Smith et al., 1985).

As atividades enzimáticas foram determinadas a partir de metodologias padrão adaptadas para redução de escala em 10 vezes, conforme descrito por Delabona et al. (2016). A atividade de papel filtro (FPase) seguiu a metodologia proposta por Ghose (1987), e as atividades de xilanase e β -glicosidase utilizaram como substratos p-

nitrofenol- β -D-glicosidase (ρ NPG) 1 mM (Sigma-Aldrich[®]) e *birchwood xylan* 0,5%, respectivamente.

Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em amostras de bagaço ozonizado e hidrotérmico fixadas por 48 horas em solução 2,5% de glutaraldeído/tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3) a temperatura ambiente, seguido de lavagem com água destilada, pós-fixação em tetróxido de ósmio 0,5% no mesmo tampão por 30 min, e desidratação em séries crescentes de soluções alcoólicas. O material foi seco em CO₂ líquido em aparelho de Ponto Crítico CPD 010 (Balzers Union) e recoberto com ouro em metalizador MED (Bal-Tec SCD 050, Balzers Union). A análise do material e a documentação fotográfica foram realizados em microscópio eletrônico (Quanta 200, Fei Company, Eindhoven, Holanda) utilizando voltagem de aceleração de 12,5 kV, pertencentes ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu.

3. Resultados & Discussão

3.1. Conversão enzimática para bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT

Cinco amostras de bagaço de cana-de-açúcar (não-tratado, ozonizado, hidrotérmico, OHT e OHT com licor) foram submetidos a cinética de hidrólise enzimática buscando determinar seus potenciais de sacarificação frente a condições reacionais equivalentes. Neste experimento, a carga enzimática dos experimentos foi uniformizada em 9 mg de proteína $\times$ g⁻¹ glucana. As respostas de concentração de glicose liberada ao longo da cinética de hidrólise (Tabela 1) demonstraram uma intensa atividade despolimerizante nas primeiras 24 horas, seguida de uma fase de menor produção de glicose entre 24 e 96 horas. Este fato é habitualmente explicado pela atividade catalítica inicial sobre as cadeias de celulose amorfa, sendo que os rendimentos de conversão tendem a diminuir à medida que restam proporcionalmente maior quantidade de celulose cristalina no conteúdo em hidrólise.

Tabela 1. Cinética de hidrólise enzimática baseada na liberação de glicose usando Cellic CTEC2 e HTEC2 (total de 9 mg de proteína /g glucana).

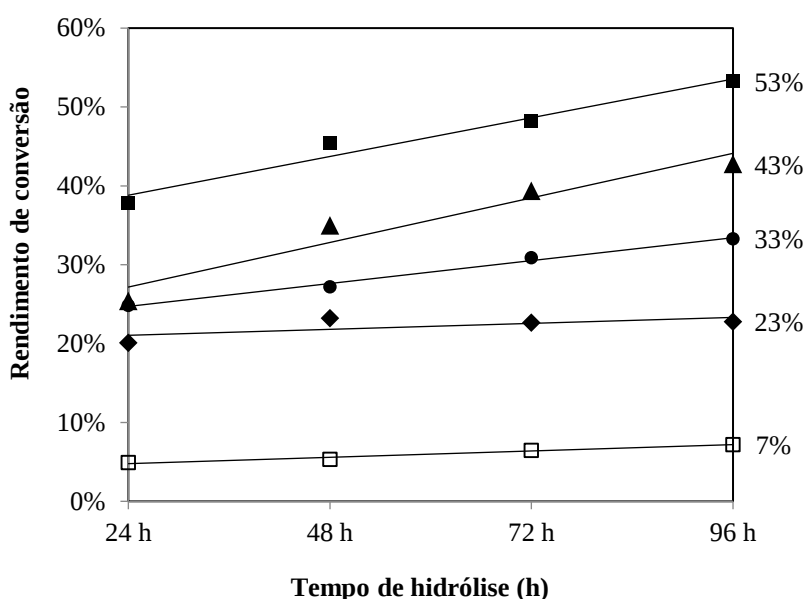
Amostras de bagaço	Concentração de glicose (g·L ⁻¹)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Não-tratado	8,0 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,1	9,0 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 0,1
Hidrotérmico	13,0 $\pm$ 0,1	14,2 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 0,8	17,4 $\pm$ 0,1
Ozonizado	12,8 $\pm$ 0,1	17,6 $\pm$ 1,4	19,8 $\pm$ 0,8	21,5 $\pm$ 1,1
OHT	30,5 $\pm$ 1,3	36,5 $\pm$ 0,5	38,9 $\pm$ 3,1	42,9 $\pm$ 4,1
OHT com licor	4,0 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 1,1	5,8 $\pm$ 1,4

Fonte: elaborado pelo autor.

Os rendimentos de conversão da hidrólise revelaram que o bagaço OHT apresentou o maior potencial de sacarificação, atingindo cerca de 43 g·L⁻¹ de glicose em 96 horas, o que representou uma conversão de 53% (Fig. 4). Os bagaços obtidos de pré-tratamentos individuais alcançaram conversões intermediárias (43% na ozonólise; 33% no hidrotérmico) e, conforme esperado, superiores ao material não-tratado (23%). Além

disso, foi observado um rendimento de conversão irrisório (7%) na amostra de bagaço OHT hidrolisada na presença do licor, indicando elevada toxicidade deste conteúdo sobre as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

Figura 4. Cinética de hidrólise enzimática baseada no rendimento de conversão de glicose usando Cellic CTEC2 e HTEC2 (total de 9 mg de proteína /g glucana).

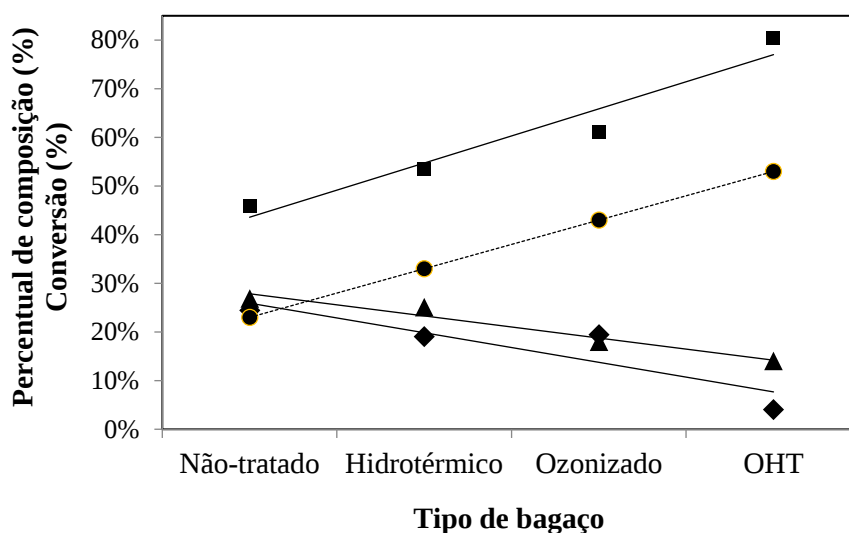


Legenda: (■) bagaço OHT; (▲) bagaço ozonizado; (●) bagaço hidrotérmico; (◆) bagaço não-tratado; (□) bagaço OHT na presença de licor. *Fonte: elaborado pelo autor.*

Uma série de fatores que incluem as questões de acessibilidade, disponibilidade e composição, interferem na performance enzimática durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos. Os bagaços avaliados apresentaram composições químicas distintas em virtude dos pré-tratamentos aplicados e seus efeitos na despolimerização da lignina e/ou das hemiceluloses, que compõem a parte amorfa da matriz e, por isso, são mais susceptíveis à solubilização durante o pré-tratamento. Mesmo que os pré-tratamento não alterem estruturalmente a celulose, a remoção do conteúdo amorfo quimicamente ligado é determinante para sua maior digestibilidade na hidrólise (Mussatto et al., 2008). Cadeias de hemiceluloses não-ramificadas (ex. xiloglucana, homoxilana, manana) ligam-se às fibrilas de celulose através de ligações de hidrogênio, enquanto outras cadeias ramificadas

ou com ligantes laterais de hemiceluloses (ex. arabinose ou ácidos urônicos) estão covalentemente ligadas à lignina formando regiões de extrema dificuldade de penetração para as enzimas (Hu & Ragauskas, 2012). Correlacionando os dados da composição química das biomassas com seus respectivos fatores de conversão de celulose a glicose durante a hidrólise enzimática, é possível observar uma relação direta entre a solubilização do conteúdo amorfo e o aumento da digestibilidade da celulose (Fig. 5). A medida que as fibras de celulose estão mais livres das interações covalentes e ligações de hidrogênio com as hemiceluloses e a lignina, a acessibilidade do substrato é ampliada, bem como a oferta de celulose é proporcionalmente maior no material à medida que as outras frações são removidas. Portanto, conforme esperado, a conversão aumentou à medida que os substratos continham maior disponibilidade de celulose livre dos demais componentes amorfos da fibra lignocelulósica.

Figura 5. Relação entre composição química de carboidratos estruturais e lignina com a conversão de celulose a glicose em bagaço de cana-de-açúcar.



Legenda: (■) celulose; (♦) hemicelulose; (▲) lignina; (●) rendimento de conversão de glucana.

Fonte: elaborado pelo autor.

Neste trabalho não foi possível determinar a influência individualizada da remoção da lignina ou das hemiceluloses sobre a conversão de celulose, uma vez que ambas apresentaram perfis paralelos e inversamente proporcionais ao rendimento de

conversão. Entretanto, Yan et al. (2015) concluíram que a remoção de lignina e de grupamentos acetil impactaram mais intensamente nas respostas de conversão em hidrólise do que a remoção de hemiceluloses em resíduo de sorgo. Segundo os autores, os grupos acetila das hemiceluloses podem interferir no reconhecimento do sítio ativo das enzimas, impedindo a ligação entre o domínio catalítico das celulasas e a celulose e, assim, reduzem a taxa de conversão enzimática (Yan et al., 2015).

A deslignificação é amplamente aceita como uma estratégia que favorece a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos destinados à hidrólise enzimática (Öhgren et al., 2007; Rezende et al., 2011; Yu et al., 2011b). Entretanto, a presença de lignina no material parece não estar associada somente à sua quantidade, mas especialmente à sua natureza química e hidrofobicidade. Por exemplo, Wang et al. (2015) incrementaram a conversão enzimática através da adição de lignina hidrofílica sulfonada em resíduos florestais, e Nakagame et al. (2011) reduziram o efeito de adsorção improdutivo entre lignina e celulasas pela adição de lignina enriquecida em ácido carboxílico. Estes fatos se explicam porque os efeitos negativos de adsorção de enzimas e redução da atividade enzimática estão associados às interações hidrofóbicas da lignina (Van Dyk & Pletschke, 2012). Portanto, sua hidrofobicidade tem um papel determinante no desenvolvimento de uma resposta positiva ou negativa durante a hidrólise enzimática. Além disso, a composição química da lignina influencia em seu potencial inibitório, sendo reportado que as ligninas com maior proporção de unidades de guaiacil são mais inibitórias durante a sacarificação enzimática (Nakagame et al., 2010).

A comparação entre a conversão de celulose obtidos entre diferentes trabalhos é dificultada pela heterogeneidade das condições operacionais empregadas na hidrólise enzimática, especialmente quanto ao coquetel enzimático empregado, a concentração de enzimas e o teor de sólidos totais que influenciam diretamente nas respostas. Entretanto, nota-se que os índices de conversão do bagaço hidrotérmico foram baixos e podem estar relacionados ao curto tempo de reação (15 min a 190 °C). Sabe-se que o rendimento de conversão tende a aumentar sob condições de severidade mais altas para madeira (*poplar*), no qual a conversão máxima de 61% de celulose à glicose foi atingida com biomassa pré-tratada a 200°C por 30 minutos (Kim et al., 2014). A severidade do pré-tratamento normalmente é estimada pela relação entre a temperatura e o tempo de

residência no reator hidrotérmico, entretanto esta relação parece não ser diretamente proporcional para o bagaço de cana-de-açúcar como é para madeira. Investigando as melhores condições de pré-tratamento hidrotérmico especificamente para o bagaço de cana-de-açúcar, Michelin et al., (2015) reportaram que a concentração de glicose mais alta foi obtida a partir de amostras pré-tratadas em temperaturas menores (ex. 180°C) e com maiores tempos de residência no reator (ex. 30 minutos), permitindo uma despolimerização mais adequada aos fins de hidrólise enzimática neste material.

Foi verificado que o efeito inibitório do licor sobre o bagaço OHT reduziu cerca de 87% da conversão de celulose à glicose em comparação ao mesmo bagaço na presença de solução-tampão. O forte efeito inibitório do licor deve ser resultado dos produtos de degradação de açúcares e da lignina durante os pré-tratamentos, conforme a composição química do licor reportada na Tabela 2. Foram detectados compostos fenólicos fragmentados, entre eles: ácido p-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxibenzaldeído, ácido vanilínico e vanilina, que tem efeitos adversos sob enzimas celulolíticas amplamente reconhecidos por mecanismos de inibição e desativação (Ximenes et al., 2010; Ximenes et al., 2011; Tejirian, Xu, 2011).

Tabela 2. Composição química dos inibidores presentes em licor resultante do processo de pré-tratamento combinado de ozonólise e hidrotérmico.

Classe	Componente do licor	Concentração (g·L ⁻¹)
Subprodutos de carboidratos	Furfural	2,1
	Hidroximetilfurfural	0,5
	Ácido acético	2,1
	Ácido fórmico	1,2
Subprodutos da lignina	Ácido p-hidroxibenzóico	0,18
	Ácido 4-hidroxibenzaldeído	0,15
	Ácido siríngico	n.d.
	Ácido vanilínico	0,016
	Vanilina	0,04
	Compostos fenólicos totais (equivalente de ácido gálico)	2,2
	pH	~2,0

*n.d. = não detectado. *Fonte: elaborado pelo autor.*

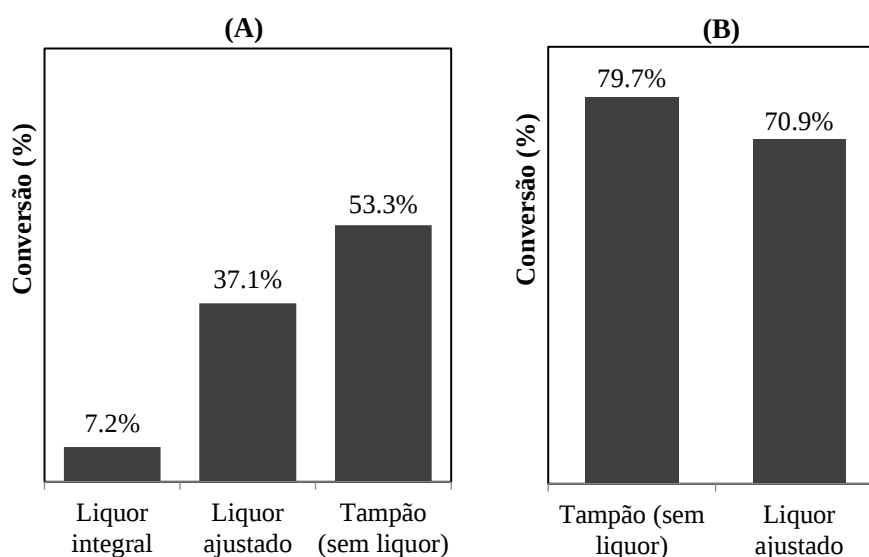
A presença dos compostos fenólicos está associada aos processos de despolimerização da lignina nativa, que por sofrer sucessivas reações de desmetilação, solubilização e ruptura de ligações durante o pré-tratamento, libera fragmentos fenólicos de menor massa molecular. Além dos fenóis, o licor hidrotérmico também foi composto por altas concentrações de compostos furânicos (furfural e HMF) formados pela desidratação de carboidratos, e ácidos carboxílicos gerados especialmente da hidrólise de grupos acetila durante a solubilização das hemiceluloses (Jönsson, Martín, 2016).

Os compostos furânicos são efetivamente inibidores de micro-organismos, como as leveduras da fermentação, porém possuem baixo efeito inibitório sobre as enzimas (Jönsson & Martín, 2016). Entretanto, os ácidos carboxílicos – especialmente ácido fórmico e ácido acético – presentes no licor e formados nas condições de ozonólise e hidrotérmico, respectivamente, são os responsáveis pela elevada acidez (pH 2,0) do meio que limita a atividade enzimática e certamente colaborou para o baixo desempenho catalítico observado na presença do licor. A neutralização dos ácidos orgânicos do licor é um procedimento simples e foi realizado posteriormente, em uma segunda avaliação, pela adição de um agente alcalinizante (pérolas de hidróxido de sódio) para corrigir o pH de 2,0 para 5,0 antes da sacarificação. Com este novo experimento de hidrólise usando bagaço OHT e licor com pH ajustado foi possível demonstrar que a conversão de celulose à glicose pode ser incrementada de 7% para 37% de rendimento (Fig. 6A) apenas pela correção do pH do meio. Entretanto, este percentual ainda foi 35% inferior ao rendimento de glicose observado no experimento com bagaço OHT diluído em tampão, que chegou a 53% de conversão. Dessa forma, seria possível descrever que o efeito inibitório do licor bruto resultante da combinação de ozonólise e pré-tratamento hidrotérmico foi $\frac{2}{3}$ derivados da ação acidificante dos ácidos carboxílicos, e $\frac{1}{3}$ pela toxicidade dos demais subprodutos, dentre os quais se estima que os fenóis tenham maior contribuição inibitória.

Buscando comprovar o efeito inibitório dos fenóis do licor em um substrato inerte e livre de quaisquer outros inibidores, foi realizado um experimento de hidrólise enzimática empregando Solka Floc[®] 300, uma celulose comercial de alta concentração de glucana (80%), ao invés de bagaço. Neste experimento, Solka Floc[®] foi hidrolisada na presença de licor com pH ajustado ou de solução-tampão, ambos com pH 5,0 para fins comparativos. Foi detectada uma redução de aproximadamente 9% na conversão de

celulose à glicose na presença do licor em relação ao tampão (Fig. 6B). Portanto, confirmou-se que a composição do licor – livre de ácidos orgânicos – também influenciou negativamente na hidrólise enzimática de um material de ampla acessibilidade de substrato e sem lignina. Neste sentido, recomenda-se a separação do licor de pré-tratamento dos sólidos pré-tratados para garantir condições mais favoráveis à hidrólise enzimática do bagaço OHT.

Figura 6. Influência do licor do pré-tratamento na conversão de bagaço OHT e celulose comercial Solka Floc® durante hidrólise enzimática de 96 h com Cellic CTEC2 e HTEC2 (9 mg proteína / g glucana).



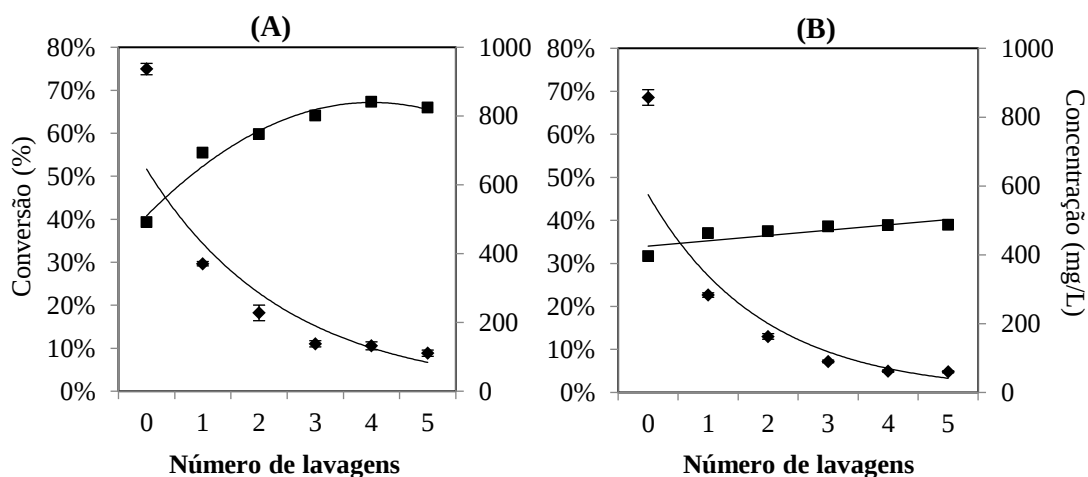
Legenda: (A) bagaço OHT; (B) Solka Floc®. Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.Efeito da lavagem do bagaço pré-tratado na conversão enzimática

Os bagaços ozonizado e hidrotérmico foram submetidos a 5 ciclos de lavagem a temperatura ambiente visando a redução dos subprodutos que permaneceram sobre as fibras após cada pré-tratamento. A performance enzimática na sacarificação dos bagaços lavados foi superior e crescente aos controles (amostras sem lavagem) em ambos pré-tratamentos. Os benefícios da lavagem foram mais evidentes sobre o bagaço ozonizado, no qual 33 g·L⁻¹ de glicose foram obtidas a partir do material lavado 4 vezes, o que representou um incremento de 67% na concentração de glicose em comparação ao

controle, que obteve $19,7 \text{ g L}^{-1}$ de glicose (Fig. 7). O efeito da lavagem sobre o bagaço hidrotérmico foi similar, entretanto os ganhos de conversão nas amostras lavadas foram inferiores. A concentração máxima de glicose atingida foi 20 g L^{-1} com 3 etapas de lavagem, representando um ganho de 22% sobre o controle (16.5 g L^{-1}).

Figura 7. Relação entre lavagem de bagaço e conversão de celulose a glicose em hidrólise enzimática de 72 horas utilizando Cellic CTEC2 e HTEC2 ($11 \text{ mg proteína/g glucana}$).



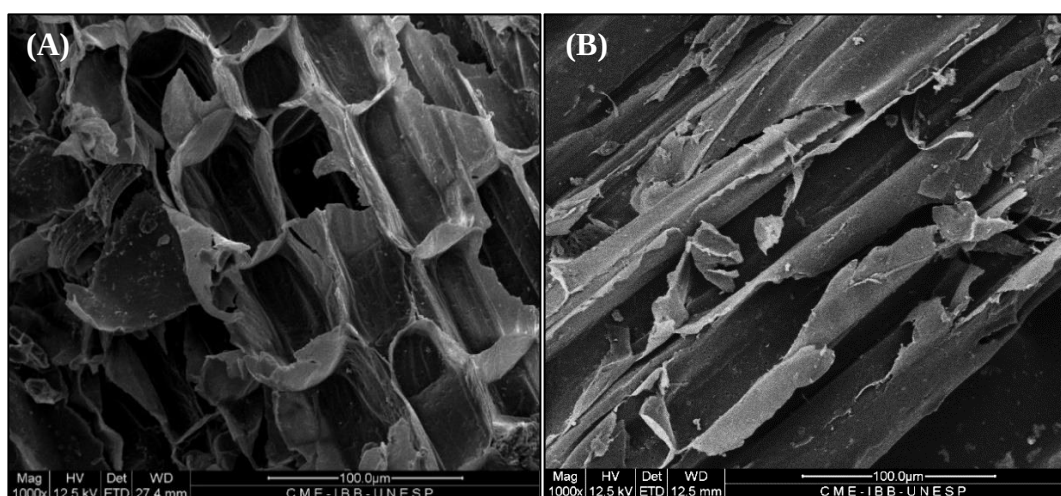
Legenda: (♦) concentração de compostos fenólicos; (■) conversão de celulose a glicose; (A) bagaço ozonizado; (B) bagaço hidrotérmico. Fonte: elaborado pelo autor.

Estima-se que a eficiência superior na lavagem de bagaço ozonizado em relação ao bagaço hidrotérmico esteja fortemente relacionada à natureza do pré-tratamento. Deve-se considerar que a ozonólise, sendo um processo químico gasoso, não gera uma fase líquida de separação dos compostos solubilizados na reação, como acontece no processo hidrotérmico, portanto, os sólidos ozonizados carregam todos os subprodutos formados nas reações entre o ozônio e o material lignocelulósico. Entre estes subprodutos da degradação parcial dos carboidratos e da lignina estão, principalmente, ácidos orgânicos fracos, como o ácido acético e o ácido fórmico e, potencialmente, ácido oxálico ou fórmico, além dos fragmentos fenólicos da deslignificação. Por outro lado, não é comum o acúmulo de furfural ou HMF na ozonólise (Travaini et al., 2016b). Dessa maneira, a operação de lavagem após o pré-tratamento apresentou-se como uma alternativa efetiva de detoxificação dos sólidos ozonizados. Efeitos positivos de

operações de lavagem de diferentes biomassas após pré-tratamentos hidrotérmico e ozonólise são reportados por outros autores (Kim et al., 2013; Toquero & Bolado, 2014; Travaini et al., 2016a).

A maior digestibilidade do bagaço ozonizado lavado em comparação ao bagaço hidrotérmico lavado pode ainda estar relacionada a questões de organização estrutural e acessibilidade do substrato. Quando observamos a estrutura física de cada uma das biomassas após os pré-tratamentos, constatamos que a porosidade parece ser especialmente superior no bagaço ozonizado e, portanto, a permeabilidade das enzimas tende a ser favorecida, apesar de ambos apresentaram rupturas bastante intensas em seus tecidos. A representação das estruturas celulares está apresentada através da microscopia eletrônica de varredura na Figura 8.

Figura 8. Eletromicrografias (MEV) de bagaço pré-tratado com lente de 1000x.



Legenda: (A) bagaço ozonizado; (B) bagaço hidrotérmico. Fonte: elaborado pelo autor.

A superfície da célula vegetal atacada pelo ozônio mostra-se mais exposta pela remoção quase integral de sua “cobertura”, permanecendo, entretanto, íntegra quanto a sua compartimentação, permitindo nitidamente observar a estrutura das células vegetais individualizadas. Por outro lado, as células resultantes da ação da água quente apresentaram principalmente danos longitudinais e fraturas aleatórias, caracterizando-a como uma estrutura mais irregular. Tais constatações vão de encontro com a maior

especificidade de reação do ozônio e suas condições mais brandas de operação, especialmente no que diz respeito a baixa temperatura de reação, que possivelmente teria preservado melhor a estrutura celular original, ao contrário do pré-tratamento hidrotérmico, que em condições operacionais mais severas (elevada temperatura e pressão), tende a promover um desarranjo mais destrutivo e inespecífico. Desta maneira, destaca-se que a organização estrutural das biomassas pré-tratadas pode ter contribuído diretamente na acessibilidade das enzimas ao substrato e, portanto, teria uma resposta direta na conversão de celulose à glicose observados na sacarificação enzimática destas amostras.

3.3.Lavagem e conversão enzimática do bagaço OHT

Motivado pelas respostas positivas de lavagem observadas nas amostras anteriores, foi realizado um estudo comparativo envolvendo lavagem simples e lavagem extrativa do bagaço OHT a fim de estimar as conversões de celulose à glicose em três concentrações decrescentes de enzimas (12,0, 6,0 e 3,0 mg proteína $\times$ g⁻¹ glucana), usando o bagaço não-lavado como controle. Tomando como parâmetro a redução na concentração de compostos fenólicos totais (CFT), pode-se afirmar que a lavagem simples atingiu uma eficiência de remoção de 75%, enquanto a lavagem extrativa obteve 98% de redução de CFT empregando sequencialmente extração com água a 84 °C e etanol a 70 °C. Surpreendentemente, a biomassa praticamente livre de CFT ($\sim$ 0,01 g L⁻¹) não produziu a maior concentração de glicose via sacarificação enzimática, ao contrário, a conversão foi negativamente afetada para este substrato em relação aos demais (Tabela 3). Enquanto o controle e o bagaço OHT lavado em temperatura ambiente acumularam 52 g L⁻¹ e 54 g L⁻¹ de glicose, respectivamente, o bagaço submetido à lavagem extrativa rendeu apenas 43 g L⁻¹ (Fig. 9). O mesmo perfil de conversão enzimática foi observado para as três concentrações de enzimas testadas, deixando claro que o processo de lavagem extrativa desfavoreceu a sacarificação, enquanto a lavagem simples contribuiu levemente para o incremento dos índices de conversão do bagaço OHT.

Tabela 3. Conversão de celulose a glicose obtidos na sacarificação de bagaço OHT lavado por lavagem simples e extrativa.

Amostra de bagaço OHT	Concentração de compostos fenólicos (mg·L ⁻¹)	Conversão (%)		
		12 mg proteína /g glucana	6 mg proteína /g glucana	3 mg proteína /g glucana
Não-lavado (controle)	681,3 ±50,5	66%	45%	32%
Com lavagem simples	170,8 ±25,7	67%	48%	37%
Com lavagem extrativa	10,6 ±0,7	54%	40%	27%

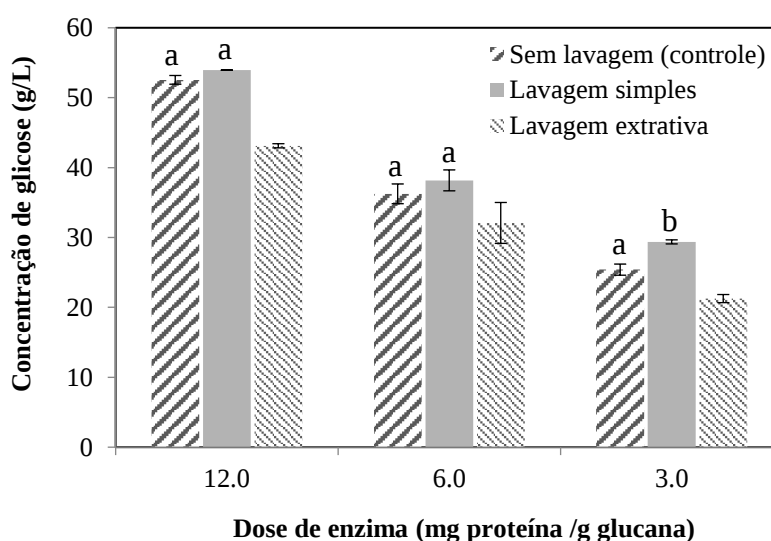
Fonte: elaborado pelo autor.

É importante destacar que apesar do pequeno incremento de conversão promovido pela lavagem simples, nota-se que a sua relevância tende a crescer à medida que se reduz a carga enzimática na sacarificação. Empregando um teste de comparação de médias (teste de Tukey 95% IC), é possível notar que a diferença entre a conversão do bagaço lavado e a conversão do bagaço-controle foi significativa apenas sob a menor carga enzimática de 3,0 mg proteína × g⁻¹ glucana (Fig. 9). Dessa forma, considera-se que em condições mais exigentes de hidrólise, vislumbradas por reduzir o custo operacional do processo, a lavagem simples do bagaço OHT assume um papel colaborativo na remoção de subprodutos dos pré-tratamentos e favorece a ação enzimática, garantindo índices de conversão superiores. Entretanto a lavagem em condições severas, como aquelas aplicada na lavagem extrativa, parece prejudicar a acessibilidade das enzimas ao substrato e reduzir a conversão, sendo, portanto, não recomendada para estes fins.

A hipótese que explicaria o efeito negativo da lavagem extrativa sobre o bagaço de cana-de-açúcar baseia-se no fato de que, possivelmente, o contato excessivo do material lignocelulósico com o solvente orgânico utilizado no procedimento para solubilizar os compostos fenólicos também afetou a organização das microfibrilas de celulose, resultando em um arranjo estrutural menos susceptível à hidrólise por via enzimática. A provável agregação da celulose seria causada principalmente pela remoção dos demais componentes da parede celular que são mais facilmente solubilizados pelo etanol, entre esses estão a xilana e a própria lignina (Boeriu et al., 2014; Ishizawa et al., 2009). Estudos de Zhuang et al. (2016) comprovaram através de modelos sintéticos que

filmes contendo uma proporção mediana de lignina e celulose são mais facilmente hidrolisáveis por enzimas do que filmes contendo menor proporção de lignina, ou mesmo filmes isentos de lignina. Segundo os autores, a presença da lignina aumentou a porosidade e aspereza dos filmes, garantindo maior superfície de contato que, consequentemente, resultou em um material mais susceptível à hidrólise.

Figura 9. Sacarificação de bagaço OHT submetido a lavagem simples e extrativa seguida de hidrólise em diferentes concentrações enzimáticas de Cellic CTEC2 e HTEC2 em 96 horas.



Legenda: letras iguais representam ausência de diferença estatística significativa ao nível de 95% confiança.
 Fonte: elaborado pelo autor.

3.4. Conversão enzimática do bagaço OHT a partir de ozonólise em meio ácido e alcalino

O desenvolvimento da ozonólise para a obtenção do bagaço OHT até então foi realizado empregando apenas água destilada como agente umidificante do bagaço *in natura*, e atingiu 48% de conversão de celulose à glicose em 72 horas usando 9 mg de proteína / g glucana. O emprego de soluções ácidas (H_2SO_4) e alcalinas ($NaOH$) foi avaliada nesta etapa em substituição à água como agente umidificante da ozonólise, visando um entendimento mais amplo dos produtos gerados pela interação do ozônio em meio ácido e alcalino, bem como a expectativa de incremento dos índices de conversão a partir da hidrólise enzimática destas biomassas.

Empregando 8 combinações de ozonólise realizadas em duplicata, cada solução (ácida ou básica) foi avaliada em duas concentrações molares e dois tempos de reação durante o pré-tratamento, conforme apresentado na Tabela 4. O procedimento hidrotérmico subsequente foi realizado conforme já descrito anteriormente, de forma padronizada para todas as 8 combinações. As respostas da hidrólise enzimática demonstraram uma ampla faixa de resultados quanto à concentração de glicose liberada destas diferentes biomassas pré-tratadas, que variou entre 33 e 47 g L⁻¹ no meio hidrolisado, correspondente a conversões de 41% a 59%. De maneira geral, foi possível notar uma predominância de conversões superiores nas amostras de bagaço acidificadas em relação às amostras alcalinizadas durante a ozonólise.

Tabela 4. Concentrações de glicose obtidas pela sacarificação do bagaço OHT a partir de ozonólise em meio ácido e alcalino submetido à hidrólise enzimática com Cellic CTEC2 e HTEC2 (9 mg proteína /g glucana) em 72 horas.

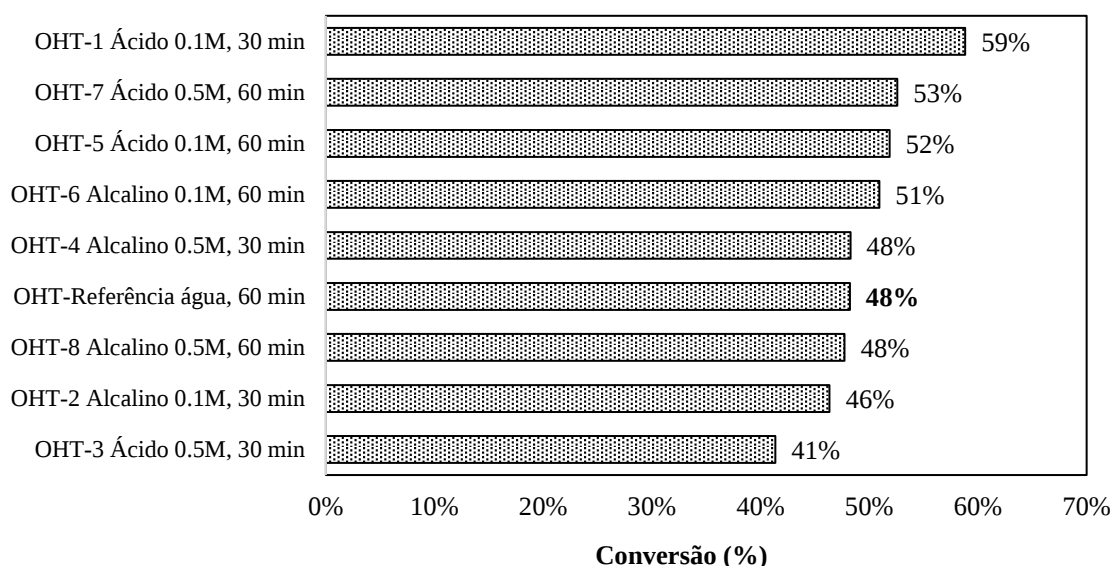
Tratamento	Fatores (níveis codificados)			Fatores (níveis reais)			Respostas
	Meio	Concentração	Tempo	Solução umidificante	Concentração molar (M)	Tempo (min)	
OHT-1	-1	-1	-1	H ₂ SO ₄	0,1	30	47,4 ±10,5
OHT-2	1	-1	-1	NaOH	0,1	30	37,3 ±1,3
OHT-3	-1	1	-1	H ₂ SO ₄	0,5	30	33,3 ±0,8
OHT-4	1	1	-1	NaOH	0,5	30	38,9 ±1,5
OHT-5	-1	-1	1	H ₂ SO ₄	0,1	60	41,8 ±0,4
OHT-6	1	-1	1	NaOH	0,1	60	41,0 ±0,8
OHT-7	-1	1	1	H ₂ SO ₄	0,5	60	42,4 ±5,7
OHT-8	1	1	1	NaOH	0,5	60	38,5 ±0,4
OHT-R	-	-	-	H ₂ O	-	60	38,9 ±3,1

Fonte: elaborado pelo autor.

Para facilitar a interpretação das respostas das combinações de pré-tratamento, as amostras foram reordenadas de forma crescente quanto à conversão de celulose à glicose, conforme apresentado na Figura 10. Observamos que a menor conversão (41%) foi obtida com 30 minutos de ozonólise utilizando ácido sulfúrico 0,5M (OHT-3), enquanto a maior conversão (59%) também foi obtida com 30 minutos de ozonólise com ácido sulfúrico, porém sob concentração molar inferior e correspondente a 0,1 M (OHT-1). Neste ponto,

parece que a molaridade do ácido foi determinante para o desenvolvimento de uma resposta positiva ou negativa sob a celulose nas condições testadas na ozonólise. O rendimento do tratamento OHT-3 (41%) foi ainda sensivelmente inferior ao tratamento de referência com água (48%), demonstrando o potencial depreciativo do ácido sulfúrico de maior concentração.

Figura 10. Conversão de sacarificação de bagaço OHT a partir de ozonólise em meio ácido e alcalino em hidrólise enzimática com Cellic CTEC2 e HTEC2 (9 mg proteína /g glucana) em 72 horas.



Fonte: elaborado pelo autor.

A reatividade do ozônio é especialmente dependente da condição de pH do meio porque a sua depreciação é acelerada na presença de íons hidroxila (OH^-). Desta maneira, é habitual observar um incremento na reatividade de ozônio em condições ácidas, especialmente aquelas inferiores a 4,0 (Pan *et al.*, 1984). Quando se promove a ozonólise de material lignocelulósico em meio aquoso, como o pré-tratamento de referência deste trabalho, o procedimento inicia-se com o pH da água, que é próximo da neutralidade, e rapidamente é reduzido até pH 2,0 pela formação e acúmulo dos ácidos carboxílicos como subprodutos da ozonólise, criando naturalmente um ambiente mais favorável à reatividade do gás ozônio ao longo do processo. Esta acidificação intrínseca ao processo explica o fato de que a maioria dos trabalhos com ozonólise obtém altos níveis de

conversão de açúcares e deslignificação utilizando apenas água. A partir da substituição da água por um ácido de baixa molaridade no sistema, estima-se que a condição ótima de reação para o gás ozônio foi antecipada, abreviando a fase de acidificação natural e, assim, permitindo atingir índices de conversão similares ou superiores com menor tempo de ozonólise. Neste trabalho, foi observada uma redução de 50% do tempo de processo e um ganho de 23% na conversão de celulose na presença de ácido sulfúrico 0,1 M em relação à água. Portanto, destaca-se que o emprego de ácido de baixa molaridade melhorou a eficiência da ozonólise em bagaço de cana-de-açúcar.

O uso de bagaço acidificado em ozonólise foi anteriormente relatado por aumentar 4 vezes a produção de glicose em relação ao tratamento controle feito apenas com ácido sulfúrico diluído (Gitifar et al., 2013). De maneira similar, outros resíduos florestais alcançaram melhores índices de deslignificação e maior concentração de glicose na sacarificação de biomassa pré-tratada com ozônio em pH 2,0 do que pH 7,0 (Yu et al., 2011a). Em contrapartida, a ozonólise em condições alcalinizadas tende a diminuir a deslignificação promovida pelo ozônio, além de potencialmente aumentar a degradação de carboidratos, especialmente das hemiceluloses (García-Cubero et al., 2009). Nesse trabalho, os tratamentos em meio alcalino não foram substancialmente diferentes do tratamento de referência em termos de rendimento de glicose na sacarificação. A expectativa de uso de meio alcalinizado foi motivada pelo uso recorrente de soluções alcalinas em procedimentos de deslignificação de materiais lignocelulósicos, entretanto, esta condição não se mostrou compatível com a ozonólise, já que os possíveis efeitos secundários de deslignificação a partir das soluções alcalinas não superaram as perdas de reatividade do gás ozônio no processo.

Apesar dos ganhos de produção de glicose promovidos pelo uso de ácido sulfúrico de menor molaridade na ozonólise, o emprego de químicos pode ser agressivo e estimular a degradação dos carboidratos gerando, conseqüentemente, o acúmulo de maior quantidade de produtos inibitórios em relação ao procedimento realizado apenas com água. A partir desta preocupação foram monitorados os produtos de degradação originados em cada combinação de pré-tratamento analisando o licor resultante na etapa hidrotérmica de cada bagaço, conforme apresentado na Figura 11. Foram estimadas as solubilizações de glicose e xilose no licor, bem como a formação de ácido acético, furfural

e hidroximetilfurfural, e a liberação de compostos fenólicos e determinação do pH final, que variou no intervalo entre 1,88 a 2,76.

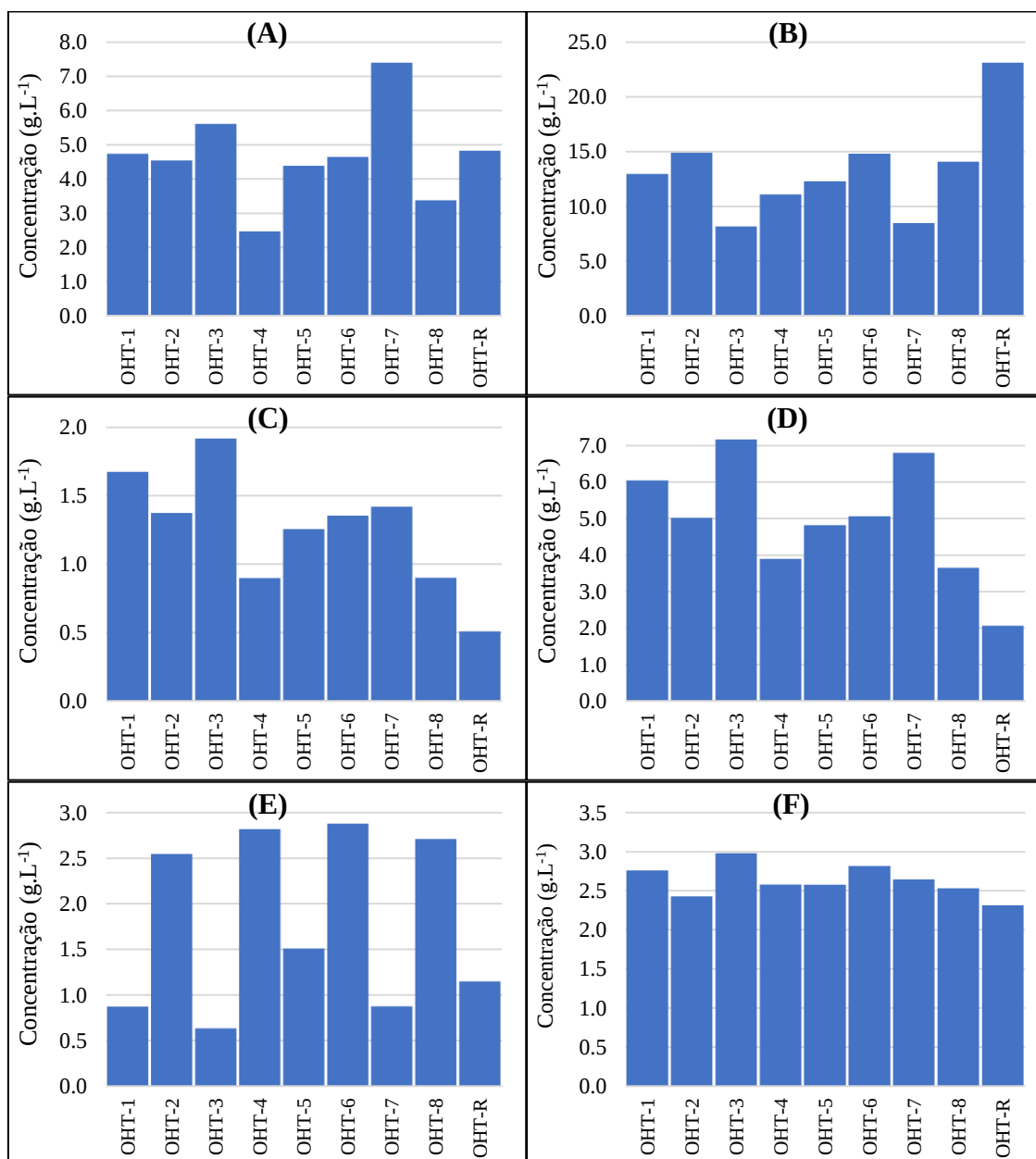
Constatou-se que a solubilização de glicose no licor foi mais intensa nos pré-tratamentos ácidos ($\sim 5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ou superior) do que nas amostras de bagaço alcalinizado (Fig. 11-A). Além disso, as maiores solubilizações foram registradas para as duas amostras (OHT-7 e OHT-3) que receberam ácido sulfúrico a 0,5 M, sugerindo que o emprego de ácidos de menor concentração minimiza este efeito indesejável. Por outro lado, a solubilização das hemiceluloses, estimada pela concentração de xilose e ácido acético no licor, foi claramente favorecida pelas soluções alcalinas durante a ozonólise (Figs. 11-B e 11-E). O pré-tratamento com água foi o mais agressivo para a solubilização das hemiceluloses, liberando cerca de $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose no licor hidrotérmico.

A formação dos inibidores de grande preocupação para a etapa fermentativa, como furfural e HMF, foi intensificada na condição ácida, e bastante reduzida no tratamento com água, que apresentou concentrações na ordem de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de HMF e $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural, enquanto o tratamento ácido OHT-3 chegou a $1,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de HMF e mais de $7,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de furfural (Figs. 11-C e 11-D), indicando intensa desidratação dos carboidratos e síntese de furanos na presença de ácido sulfúrico. Na presença de hidróxido de sódio também houve aumento na produção de furfural e HMF em relação ao controle, porém em menores concentrações do que nas amostras acidificadas. Por fim, a liberação de compostos fenólicos seguiu a mesma tendência e foi menor no pré-tratamento de referência com água ($2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), seguida de acúmulo crescente para os demais tratamentos, tanto ácido quanto alcalino, chegando a até $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Portanto, a presença dos reagentes químicos na reação de ozonólise parece ter potencializado a solubilização da lignina nestas amostras (Fig. 11-F).

De maneira geral, destaca-se que foi possível atingir maiores conversões em glicose a partir da incorporação de ácido sulfúrico diluído e de baixa molaridade ao bagaço durante a ozonólise seguida do tratamento hidrotérmico, ao mesmo tempo em que são gerados licores de maior grau de toxicidade. Portanto, parece haver uma relação direta e dependente de agressividade do pré-tratamento e sacarificação de celulose. Diante desta característica, torna-se inevitável atribuir adequadas operações de *downstream* para o

fracionamento dos produtos (bagaço OHT e licor OHT) gerados nesta combinação de pré-tratamentos.

Figura 11. Composição dos licores resultante dos pré-tratamento combinado (ozonólise com hidrotérmico) em diferentes condições ácidas e alcalinas para obtenção de bagaço OHT.



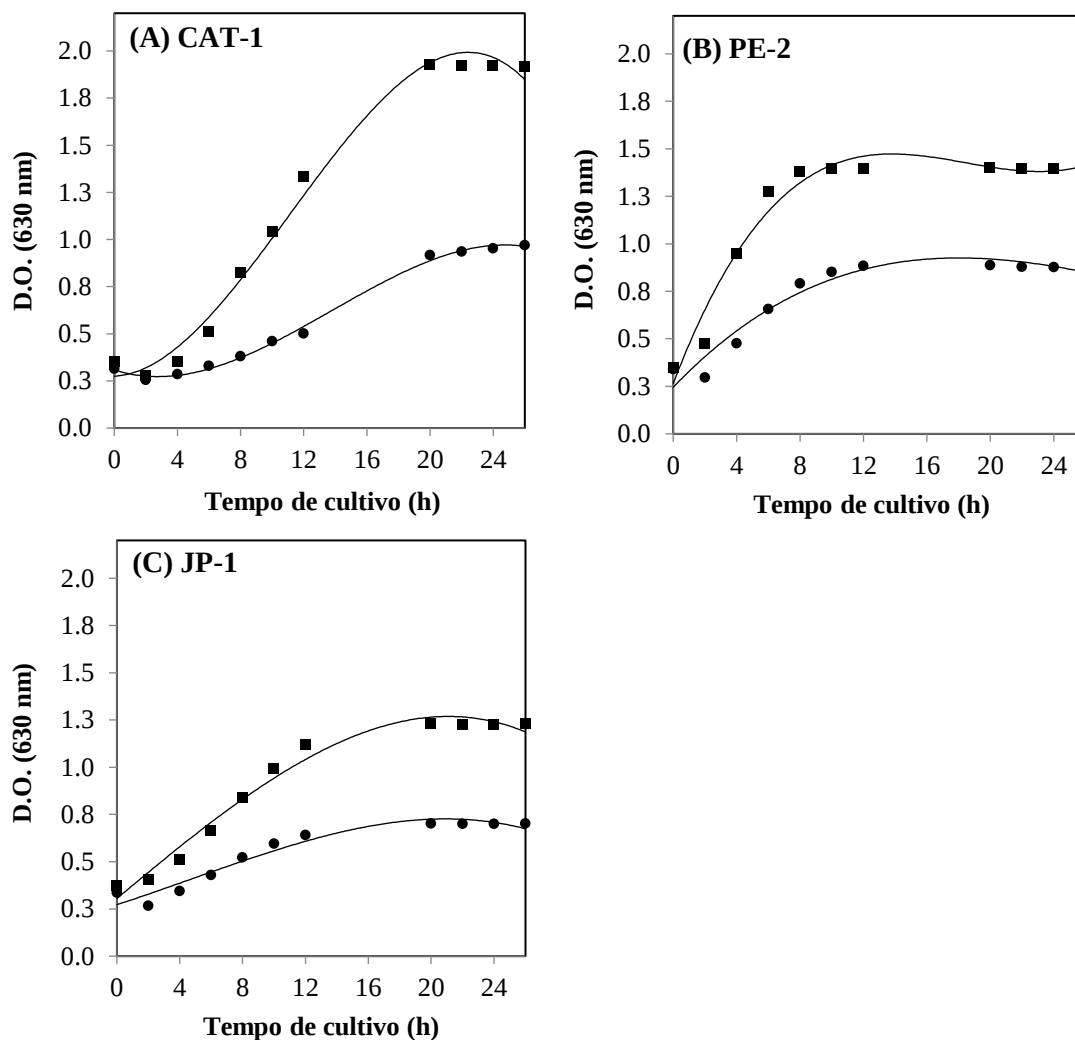
Legenda: (A) glicose; (B) xilose; (C) hidroximetilfurfural; (D) furfural; (E) ácido acético; (F) compostos fenólicos totais. Fonte: elaborado pelo autor.

3.5. Cultivo de leveduras em meio hidrolisado de bagaço ozonizado

Inicialmente a capacidade de crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foi testada no meio hidrolisado obtido do bagaço ozonizado visando comprovar a sua fermentabilidade para a produção de etanol. Poucos estudos anteriores relatam o uso de material lignocelulósico ozonizado em experimentos de fermentação (Cassia Pereira et al., 2016; Travaini et al., 2016a). O desenvolvimento dos experimentos iniciais de cultivo e fermentação das três leveduras industriais (CAT-1, PE-2 e JP-1) foi feito a partir de um conteúdo único hidrolisado obtido da homogeneização dos sobrenadantes de uma série de experimentos de hidrólise enzimática, que geraram um substrato homogêneo com $17,5 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose como fonte de carbono.

Ensaio de cultivo em microplacas revelaram efeitos negativos da composição do meio hidrolisado ozonizado sobre o desenvolvimento celular das leveduras. Nestes experimentos, o crescimento das leveduras foi comparativamente avaliado entre o meio hidrolisado e um meio sintético, composto por sacarose na mesma concentração de fonte de carbono e livre de inibidores. Com 20 horas de cultivo – correspondente ao final da fase exponencial de crescimento – foram observados níveis de inibição celular de cerca de 52% para CAT-1, 43% para JP-1 e 37% para PE-2, deixando evidente a ação antagonística do meio. As curvas de crescimento celular de cada linhagem são apresentadas através da Figura 12. Estes dados ainda revelaram que a levedura CAT-1 obteve a maior densidade celular em meio com sacarose, indiretamente medida pela densidade óptica e que correspondeu a aproximadamente $1,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de células, enquanto a levedura PE-2 multiplicou-se mais rapidamente que as demais, atingindo a fase estacionária entre 10 e 12 horas após o inóculo em sacarose. O crescimento em meio hidrolisado foi semelhante para todas as leveduras, que iniciaram com aproximadamente $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa e atingiram cerca de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nas condições do ensaio em microplaca.

Figura 12. Cultivo comparativo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* industriais em meio sintético de sacarose e meio natural de hidrolisado de bagaço ozonizado.

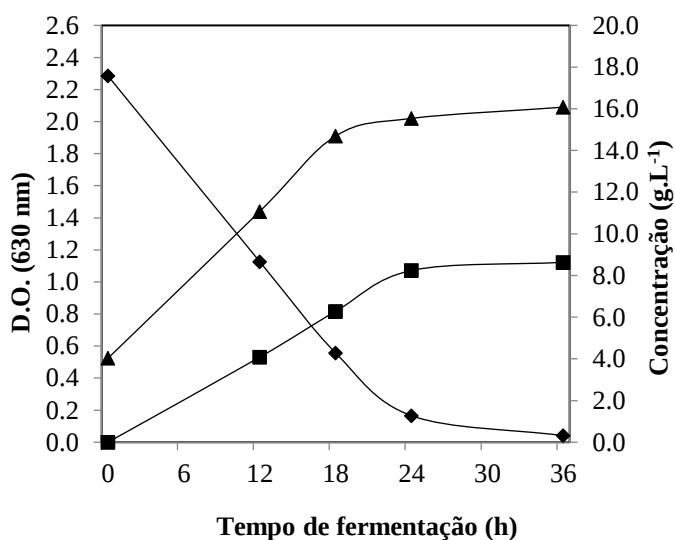


Legenda: (A) linhagem CAT-1; (B) linhagem PE-2; (C) linhagem JP-1; (■) meio de cultura com sacarose; (●) meio de cultivo hidrolisado. Fonte: elaborado pelo autor.

Uma vez comprovada a capacidade de consumo da fonte de carbono do meio hidrolisado de bagaço ozonizado, foram realizados experimentos de cinética de fermentação de 36 horas visando produzir etanol para atestar a fermentabilidade do meio e selecionar a levedura mais compatível com o processo. Diferentes perfis de consumo de substrato foram observados para cada uma das linhagens industriais nas condições de fermentação, evidenciando um desempenho superior da levedura JP-1 na produção de etanol. Contrariando as expectativas decorrentes do experimento anterior em microplaca,

a levedura JP-1 parece ter se adaptado melhor ao meio hidrolisado pois consumiu toda a glicose em 36 horas, resultando na maior concentração de biomassa ($1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e maior produção de etanol ($8,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) dentre as três leveduras avaliadas (Figs. 13 e 14).

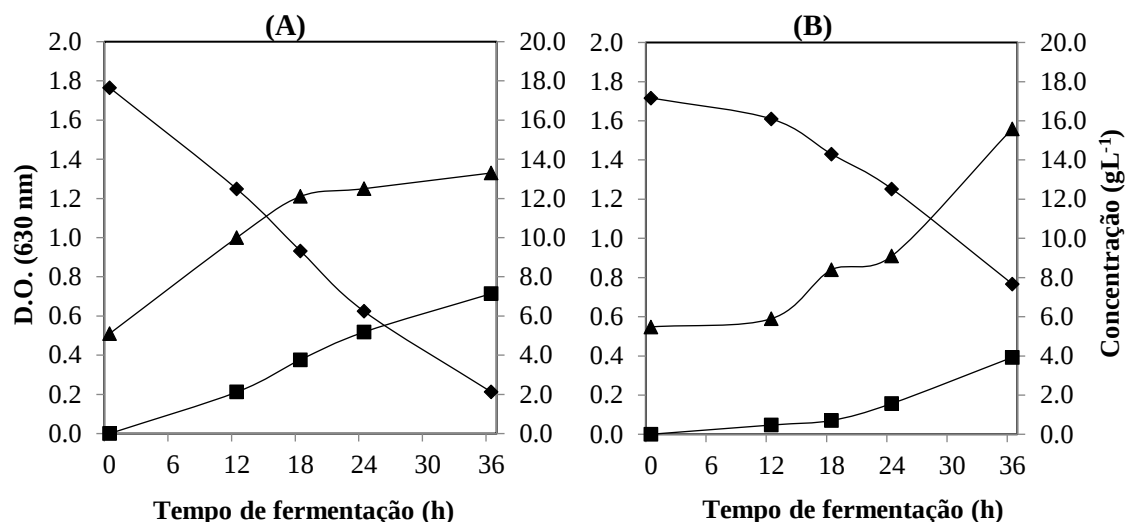
Figura 13. Cinética de fermentação alcoólica da levedura JP-1 em meio hidrolisado de bagaço ozonizado.



Legenda: (♦) glicose; (▲) células; (■) etanol. Fonte: elaborado pelo autor.

A fonte de carbono não foi esgotada pelas leveduras CAT-1 e PE-2, restando ainda cerca de 12% e 45% do substrato em 36 horas de fermentação, respectivamente. Dessa maneira, os indicadores de rendimento e eficiência para estas linhagens foram inferiores àqueles observados para JP-1, que atingiu um rendimento máximo de substrato em produto de 98% (Tabela 5) e se mostrou como a linhagem mais compatível com o substrato derivado da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por ozonólise. Assim, a levedura comercial JP-1 foi escolhida para os experimentos posteriores de fermentação envolvendo os meios hidrolisados dos diferentes pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 14. Cinética de fermentação alcoólica da levedura CAT-1 e PE-2 em meio hidrolisado de bagaço ozonizado.



Legenda: (♦) glicose; (▲) células; (■) etanol; (A) CAT-1; (B) PE-2. Fonte: elaborado pelo autor.

De maneira geral denota-se que o tempo de fermentação foi longo (36 horas ou superior). Este é um efeito típico em meios de cultivo contendo compostos inibitórios, como os meios resultantes da hidrólise de material lignocelulósico. Devido ao ataque do ozônio sobre a estrutura polimérica da lignina, uma série de compostos fenólicos de baixa massa molecular foi liberada como subprodutos de degradação, sendo estes parcialmente removidos pelas operações de lavagem realizadas após o pré-tratamento. Entretanto, outra parte de compostos fenólicos parece permanecer no hidrolisado e afetar o desempenho das leveduras na fermentação. Estes compostos fenólicos devem ser originados da porção de lignina insolúvel não afetada pelo pré-tratamento que ainda permanecia covalentemente ligada à celulose. A partir da despolimerização da celulose, promovida pelas enzimas durante a hidrólise, estima-se que haja uma liberação simultânea de resíduos fenólicos devido ao rompimento destas ligações intermoleculares. Portanto, atribui-se especialmente aos compostos fenólicos o efeito de retardo do processo fermentativo por inibição parcial das leveduras.

O efeito antagonístico de fenólicos e outros aromáticos sobre células microbianas é bastante dependente dos grupos funcionais específicos presentes no meio, entretanto, de maneira geral assume-se que os compostos fenólicos são capazes de interferir em

funções fisiológicas e alterar a proporção de lipídios e proteínas na membrana celular (Jönsson et al., 2013). Ainda assim, *S. cerevisiae* é capaz de converter alguns compostos fenólicos em produtos de menor toxicidade, garantindo sua sobrevivência nestes meios (Larsson et. al, 2000). Este processo de adaptação envolve a ativação da expressão de determinados genes capazes de direcionar este novo metabolismo, por isso, observa-se um aumento da fase *lag* de adaptação e, conseqüentemente, a extensão do tempo total de fermentação. Cunha et al. (2015) observaram aumentos significativos na fase *lag* de *S. cerevisiae* de 6,5 horas em meio sintético de glicose sem inibidores, para períodos entre 12 e 28 horas em meios hidrolisados contendo inibidores lignocelulósicos. Normalmente o uso de inóculos mais concentrados minimiza tais efeitos e reduz o período de fase *lag*, que foi minimamente observado nestes experimentos por empregar elevada concentração celular inicial ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Tabela 5. Resumo de indicadores da fermentação alcoólica de hidrolisado de bagaço ozonizado por leveduras industriais.

Indicadores	<i>Linhagens</i>		
	PE-2	CAT-1	JP-1
Concentração ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	3,93	7,14	8,64
Produção total (%)	0,5%	0,9%	1,1%
Produtividade* ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	0,1	0,2	0,2
Rendimento ($Y_{P/S}$)	0,414	0,460	0,500
Eficiência (%)	81%	90%	98%

*Produtividade calculada para 36 h de tempo total de processo. *Fonte: elaborado pelo autor.*

3.6.Fermentação alcoólica de hidrolisados de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT

Os produtos da sacarificação dos bagaços ozonizado, hidrotérmico e OHT foram utilizados como substrato de fermentação visando estimar o potencial de fermentabilidade de cada meio com a levedura comercial JP-1, que obteve o melhor desempenho nos experimentos anteriores. Além de JP-1, a linhagem de *S. cerevisiae* Y-150 foi testada comparativamente em todos os meios por ser uma linhagem adaptada por exposição e

crescimento em licor hidrotérmico de madeira *poplar*. O objetivo desta comparação foi avaliar se a melhoria adaptativa da linhagem aos compostos fenólicos da madeira seria capaz de atribuir alguma vantagem tecnológica frente a uma levedura nativa no processo fermentativo de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, no qual não havia sido avaliada anteriormente. As fermentações de ambas leveduras foram realizadas após a uniformização dos sobrenadantes dos vários experimentos de hidrólise enzimática, resultando nos substratos hidrolisados de composição química conforme apresentado na Tabela 6 que foram empregados nas replicatas de fermentação. Destaca-se que os compostos fenólicos estão presentes em todos os meios hidrolisado, entretanto, não foi detectada a presença de ácido acético no meio hidrolisado de bagaço OHT, possivelmente liberado em sua totalidade através do licor de pré-tratamento.

Tabela 6. Composição química de meios hidrolisados obtidos dos diferentes pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar.

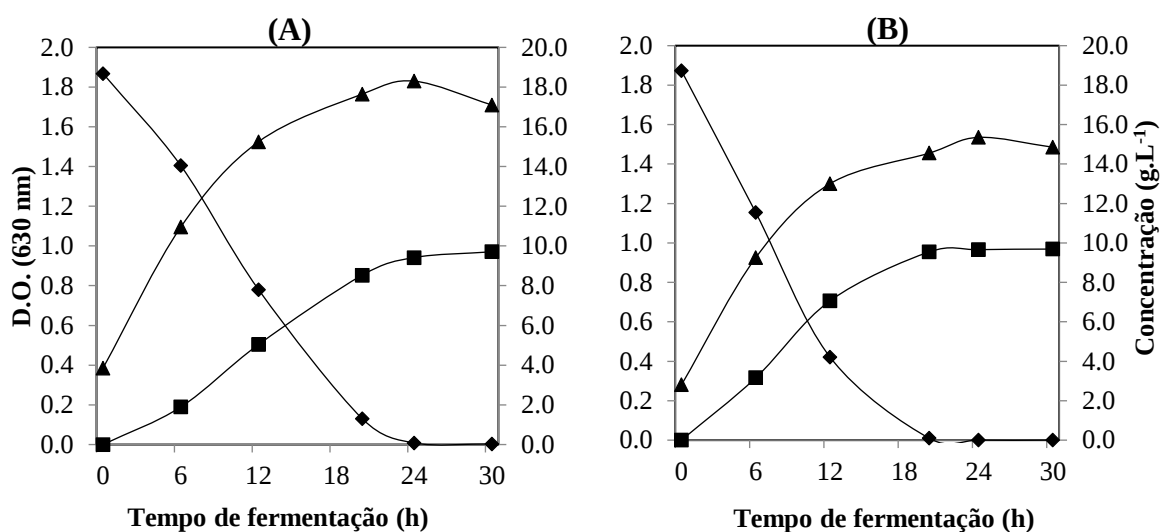
Composição	Concentração (g L^{-1})		
	Ozonizado	Hidrotérmico	OHT
Glicose	18,68	13,82	29,97
Xilose	9,72	5,05	3,55
Arabinose	0,88	n.d.	n.d.
Ácido acético	0,99	0,96	n.d.
HMF	n.d.	n.d.	n.d.
Furfural	n.d.	n.d.	n.d.
pH	4,52	4,69	4,53
Compostos fenólicos totais	0,80	0,53	0,59

*n.d. = não detectado. Fonte: elaborado pelo autor.

A produção máxima de etanol obtida por ambas linhagens no meio hidrolisado ozonizado foi muito similar ($\sim 9,7 \text{ g L}^{-1}$), entretanto destaca-se que apesar da densidade celular superior de JP-1, a levedura Y-150 consumiu toda a glicose em tempo inferior que JP-1 (Fig. 15). Este mesmo comportamento foi observado para o meio hidrolisado proveniente do bagaço hidrotérmico que continha cerca de 14 g L^{-1} de glicose e foi rapidamente consumida em 12 horas por Y-150, e em 20 horas por JP-1, ambas acumulando cerca de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de etanol em 30 horas (Fig. 16). Dessa maneira, a

fermentabilidade dos hidrolisados de bagaço ozonizado e hidrotérmico foi confirmada mesmo na presença de ácido acético e compostos fenólicos resultantes da degradação da lignina nos pré-tratamentos.

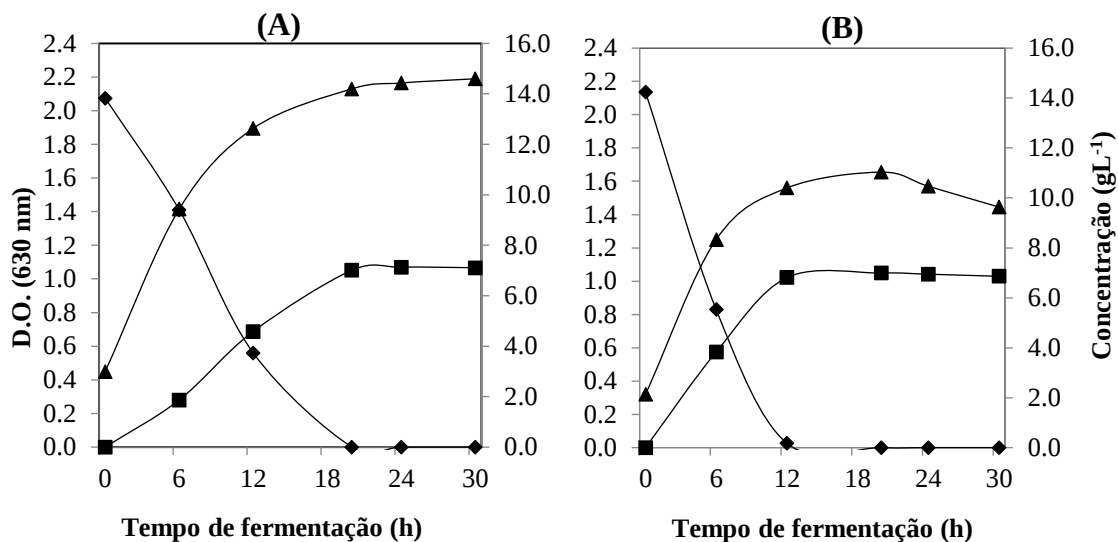
Figura 15. Cinética de fermentação alcoólica em meio hidrolisado de bagaço ozonizado para leveduras JP-1 e Y-150.



Legenda: (♦) glicose; (▲) células; (■) etanol; (A) JP-1; (B) Y-150. Fonte: elaborado pelo autor.

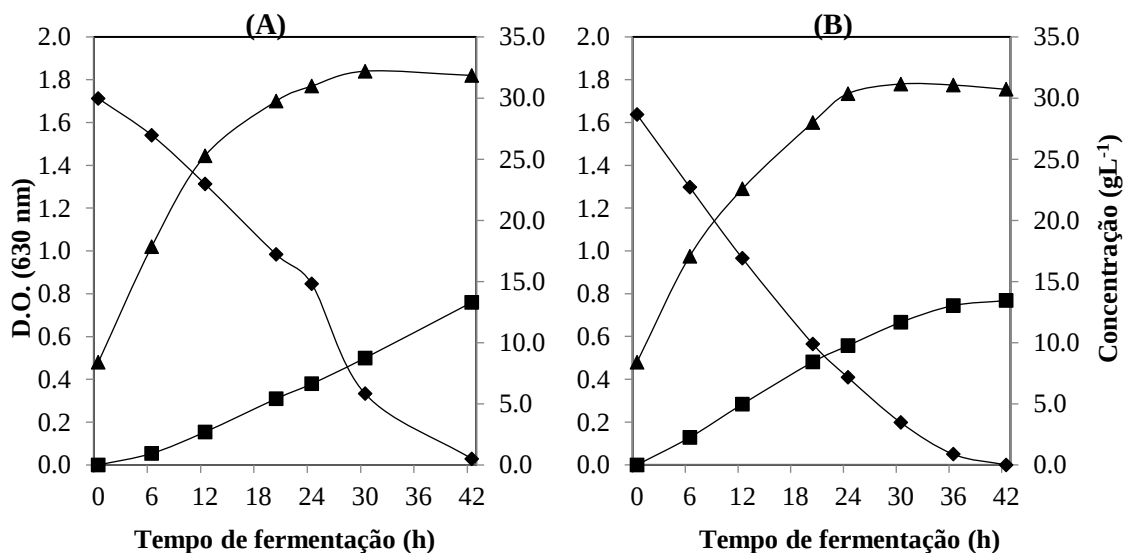
O meio hidrolisado obtido dos experimentos de hidrólise do bagaço OHT foi composto de cerca de 30 g.L⁻¹ de glicose e, portanto, demandou um maior tempo para o consumo dos carboidratos no processo fermentativo, que foi estendido até 42 horas e resultou no acúmulo de cerca de 13,4 g.L⁻¹ de etanol para ambas leveduras (Fig. 17).

Figura 16. Cinética de fermentação alcoólica em meio hidrolisado de bagaço hidrotérmico para leveduras JP-1 e Y-150.



Legenda: (♦) glicose; (▲) células; (■) etanol; (A) JP-1; (B) Y-150. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17. Cinética de fermentação alcoólica em meio hidrolisado de bagaço OHT para leveduras JP-1 e Y-150.



Legenda: (♦) glicose; (▲) células; (■) etanol; (A) JP-1; (B) Y-150. Fonte: elaborado pelo autor.

As respostas do estudo comparativo entre as leveduras JP-1 e Y-150 para a fermentação de hidrolisados está sumarizado através da Tabela 7. Assume-se que o desempenho global de ambas as linhagens foi equiparado quanto a produção total de etanol em todos os meios, porém outras considerações devem ser destacadas. Por um lado, a linhagem Y-150 apresentou uma vantagem tecnológica na produtividade, atingindo os mesmos índices de produção da JP-1 em menor tempo de fermentação. Este critério tem elevada relevância para processos industriais e pode ser entendido como um indicativo de sucesso do processo de adaptação fisiológica aos compostos fenólicos, apesar de não terem sido realizados estudos com a mesma linhagem nativa como controle para validar tal suposição. Por outro lado, a linhagem JP-1 apresentou maior eficiência na conversão de substrato em produto do que Y-150, atingindo rendimentos máximos nos meios hidrolisados da ozonólise e hidrotérmico, exceto no meio hidrolisado OHT, onde a eficiência foi de 90% para JP-1 e 92% para Y-150, reforçando que a aquisição de tolerância a fenólicos em algum nível é positiva para a fermentação de meios derivados de substrato lignocelulósico. A eficiência superior da levedura JP-1 poderia ser justificada pelo fato de ser uma linhagem comercial já empregada na indústria de etanol de primeira geração, porém não preparada para os possíveis agentes inibitórios presentes no conteúdo hidrolisado de etanol de segunda geração.

Tabela 7. Resumo de indicadores da fermentação alcoólica dos três meios hidrolisado de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT pelas leveduras JP-1 e Y-150.

Indicadores	Linhagem JP-1			Linhagem Y-150		
	Ozon.	Hidrot.	OHT	Ozon.	Hidrot.	OHT
<i>Concentração ($g \cdot L^{-1}$)</i>	9,71	7,11	13,30	9,69	6,86	13,43
<i>Produção total (%)</i>	1,2%	0,9%	1,7%	1,2%	0,9%	1,7%
<i>Produtividade* ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)</i>	0,40	0,36	0,32	0,48	0,57	0,32
<i>Rendimento ($Y_{P/S}$)</i>	0,511	0,511	0,444	0,511	0,482	0,469
<i>Eficiência (%)</i>	100%	100%	90%	100%	94%	92%

*Produtividade calculada no tempo final de consumo de glicose de cada processo.

Fonte: elaborado pelo autor.

A maior produção de etanol atingiu 1,7% (v/v) no caldo fermentado do bagaço OHT. Apesar da alta eficiência fermentativa observada, há uma necessidade de

incremento na concentração total de etanol para viabilizar um possível processo de destilação. Em geral, assume-se que caldos com 4% (v/v) ou mais de etanol são economicamente viáveis e, portanto, demanda-se de, pelo menos 8% (v/v) de glicose no meio hidrolisado (Modenbach & Nokes, 2013). Para atingir 80 g·L⁻¹ de glicose no final da sacarificação utilizando a melhor condição observada neste trabalho (ozonólise ácida e pré-tratamento hidrotérmico), que apresentou rendimento de 59% na conversão de celulose à glicose (47 g·L⁻¹ de glicose), seriam necessários, no mínimo, 135 g·L⁻¹ de bagaço OHT, ou seja, teoricamente 13,5% (m/v) de sólidos totais na hidrólise. Entretanto, deve-se considerar que processo de sacarificação em alta concentração de sólidos tendem a ser menos eficientes devido às dificuldades de transferência de massa, aumento de viscosidade e menor acessibilidade das enzimas em um conteúdo com maior massa seca e menor disponibilidade de água livre (Cassia Pereira et al., 2016; Modenbach & Nokes, 2013). Assim, estima-se que um processo adequado deveria considerar níveis de 15% (m/v) ou superiores de sólidos pré-tratados em suspensão durante a etapa de sacarificação nas condições apresentadas.

3.7. O processo global

A produção de etanol celulósico utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar foi estudada empregando as técnicas de ozonólise e tratamento hidrotérmico na etapa de pré-tratamentos, seguido da sacarificação com enzimas comerciais como estratégia de hidrólise, e, por fim, a fermentação alcoólica foi realizada por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* industriais para a conversão da glicose em etanol. A associação dos pré-tratamentos, nominada como Tratamento Hidrotérmico acidificado com Ozônio (THAO), foi vantajosa por produzir a biomassa pré-tratada – o bagaço OHT – mais rica em relação ao substrato de interesse, chegando a 72% de celulose, e com 48% de eficiência no processo. Além disso, o bagaço OHT mostrou-se mais acessível para as enzimas celulolíticas durante a hidrólise enzimática, permitindo uma conversão de até 67% da celulose em glicose. A levedura JP-1 apresentou o melhor desempenho cinético no meio hidrolisado derivado do bagaço ozonizado, e atingiu uma eficiência fermentativa

de 90% no hidrolisado de bagaço OHT, acumulando cerca de 1,7% (v/v) de etanol no meio fermentado. Assumindo estes fatores de conversão em cada etapa, bem como os fatores estequiométricos de celulose para glicose (1,11), e de glicose para etanol (0,511), o processo THAO apresentou um rendimento global de 10% (substrato: bagaço; produto: etanol), e um rendimento específico de 28% em relação a fração C6 de hexoses da biomassa lignocelulósica. O rendimento foi calculado através de balanço de massas utilizando uma base de cálculo de 10 g de bagaço na base seca, correspondente a 3,6 g de celulose, no qual se obtém 1,0 g de etanol (Tabela 8).

Tabela 8. Balanço de massas para processo THAO.

Produto	Entrada (g)	Saída (g)
Bagaço	10,000	10,000
Ozônio	0,760	0,760
Água	295,700	295,700
Glicose	2,200	2,200
Resíduo sólido	1,880	1,880
Etanol	1,012	-

Fonte: elaborado pelo autor.

4. Conclusões

Este capítulo tratou do desenvolvimento das etapas de sacarificação e fermentação alcoólica de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por ozonólise, pré-tratamento hidrotérmico, e pela combinação de ambos processos na obtenção do bagaço OHT. Foi possível observar que:

- Há uma relação diretamente proporcional entre a remoção do conteúdo amorfo, representado por hemiceluloses e lignina, e o aumento da conversão de celulose na hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar;
- A digestibilidade do bagaço OHT por enzimas celulolíticas é superior aos bagaços ozonizado e hidrotérmico, comprovando que a combinação das técnicas pode liberar mais de 50 g·L⁻¹ de glicose no meio hidrolisado, atingindo uma conversão correspondente a 67% de rendimento com 96 horas de hidrólise;
- A elevada toxicidade do licor gerado junto ao bagaço OHT inviabiliza sua utilização na hidrólise enzimática, sendo, portanto, necessária a separação e destinação a outras aplicações tecnológicas;
- A incorporação de ácido de baixa molaridade à ozonólise potencializa a ação oxidativa do ozônio e resulta na redução de 50% do tempo de ozonólise com ganho de 23% da conversão de celulose a glicose na hidrólise do bagaço OHT;
- Os substratos hidrolisados de bagaço ozonizado, hidrotérmico e OHT são fermentescíveis, porém demandam de um longo tempo de fermentação para o consumo de glicose, que pode ser explicado por efeitos retardatários devido a presença de compostos inibitórios da composição do meio sobre as leveduras;
- A levedura JP-1 foi a linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* melhor adaptada às condições ambientais do meio hidrolisado de bagaço ozonizado e obteve desempenho similar à linhagem Y-150 com adaptação fisiológica à compostos fenólicos, atingindo 90% de eficiência de fermentação do hidrolisado de bagaço OHT.

Referências

- Boeriu, C.G., Fițigău, F.I., Gosselink, R.J.A., Frissen, A.E., Stoutjesdijk, J., Peter, F., 2014. Fractionation of five technical lignins by selective extraction in green solvents and characterisation of isolated fractions. **Ind. Crops Prod.** 62, 481–490.
- Cao, G., Ximenes, E., Nichols, N.N., Zhang, L., Ladisch, M., 2013. Biological abatement of cellulase inhibitors. **Bioresour. Technol.** 146, 604–610.
- Cassia Pereira, J., Travaini, R., Paganini Marques, N., Bolado, S., Bocchini Martins, D.A., 2016. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresour. Technol.** 204, 122–129.
- Cunha, J.T., Aguiar, T.Q., Romani, A., Oliveira, C., Domingues, L., 2015. Contribution of PRS3, RPB4 and ZWF1 to the resistance of industrial *Saccharomyces cerevisiae* CCUG53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors. **Bioresour. Technol.** 191, 7–16.
- Delabona, P. da S., Lima, D.J., Robl, D., Rabelo, S.C., Farinas, C.S., da Cruz Pradella, J.G., 2016. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 43, 617–626.
- Favaro, L., Basaglia, M., Trento, A., Van Rensburg, E., García-Aparicio, M., Van Zyl, W.H., Casella, S., 2013. Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. **Biotechnol. Biofuels** 6, 168.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresour. Technol.** 100, 1608–1613.
- Gitifar, V., Eslamloueyan, R., Sarshar, M., 2013. Experimental study and neural network modeling of sugarcane bagasse pretreatment with H₂SO₄ and O₃ for cellulosic material conversion to sugar. **Bioresour. Technol.** 148, 47–52.
- Hu, F., Ragauskas, A., 2012. Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. **Bioenergy Res.** 5, 1043–1066.
- Hu, J.; Arantes, V.; Pribo, A.; Gourlay, K.; Saddler, J.N. Substrate Factors That Influence The Synergistic Interaction Of Aa9 And Cellulases During The Enzymatic Hydrolysis Of Biomass. **Energy Environ. Sci.**, V. 7, P. 2308-2315, 2014.
- Ishizawa, C.I., Jeoh, T., Adney, W.S., Himmel, M.E., Johnson, D.K., Davis, M.F., 2009. Can delignification decrease cellulose digestibility in acid pretreated corn stover? **Cellulose** 16, 677–686.

- Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N.-O., 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnol. Biofuels** 6, 16.
- Jönsson, L.J., Martín, C., 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.** 199, 103–112.
- Kapoor, R.K., Rajan, K., Carrier, D.J., 2015. Applications of *Trametes versicolor* crude culture filtrates in detoxification of biomass pretreatment hydrolyzates. **Bioresour. Technol.** 189, 99–106.
- Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M.R., 2013. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresour. Technol.** 135, 30–38.
- Kim, Y., Kreke, T., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2014. Severity Factor Coefficients for Subcritical Liquid Hot Water Pretreatment of Hardwood Chips. **Biotechnol. Bioeng.** 111-2, 254-263.
- Larsson S, Quintana-Sáinz A, Reimann A, Nilvebrant N-O, Jönsson LJ: Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygenlimited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Biochem Biotechnol** 2000, 84:617–632.
- Liu, X., Ma, Y., Zhang, M., 2015. Research advances in expansins and expansion-like proteins involved in lignocellulose degradation. **Biotechnol. Lett.** 37, 1541–1551.
- Michelin, M., Ximenes, E., de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, M., Ladisch, M.R., 2015. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresour. Technol.** 199, 275–278.
- Modenbach, A.A., Nokes, S.E., 2013. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings e A review. **Biomass and Bioenergy** 56, 526–544.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F., Roberto, I.C., 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme Microb. Technol.** 43, 124–129.
- Nakagame, S., Chandra, R.P., Saddler, J.N., 2010. The effect of isolated lignins, obtained from a range of pretreated lignocellulosic substrates, on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 105, 871–879.
- Nakagame, S., Chandra, R.P., Kadla, J.F., Saddler, J.N., 2011. Enhancing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by increasing the carboxylic acid content of the associated lignin. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 538–548. doi:10.1002/bit.22981
- Nichols, N.N., Dien, B.S., Cotta, M.A., 2010. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. **Bioresour. Technol.** 101,

7545–7550.

Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., Zacchi, G., 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresour. Technol.** 98, 2503–2510.

Pan, G.Y., Chen, C.L., Chang, H.M., Gratzl, J.S., 1984. Studies on ozone bleaching. I. The effect of pH, temperature, buffer systems and heavy metal-ions on stability of ozone in aqueous solution. **J. Wood Chem. Technol.** 4, 367–387.

Perrone, O.M., Rossi, J.S., Maria, M., Moretti, D.S., Carreira, C., Bordignon, S.E., Gomes, E., Da-silva, R., Boscolo, M., 2016. Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment : Effects on the fiber and enzymatic saccharification. **Bioresour. Technol.**, *in press*.

Rabelo, S.C. **Avaliação e Otimização de Pré-tratamentos e Hidrólise Enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 2010, 447p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas/SP.

Rezende, C.A., de Lima, M.A., Maziero, P., Deazevedo, E.R., Garcia, W., Polikarpov, I., 2011. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnol. Biofuels** 4, 54.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** 150, 76–85.

Tejirian, A., Xu, F., 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme Microb. Technol.** 48, 239–47.

Toquero, C., Bolado, S., 2014. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresour. Technol.** 157, 68–76.

Travaini, R., Barrado, E., Bolado-rodríguez, S., 2016a. Effect of ozonolysis parameters on the inhibitory compound generation and on the production of ethanol by *Pichia stipitis* and acetone-butanol-ethanol by *Clostridium* from ozonated and water washed sugarcane bagasse. **Bioresour. Technol.** 218, 850–858.

Travaini, R., Martín-Juárez, J., Lorenzo-Hernando, A., Bolado-Rodríguez, S., 2016b. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresour. Technol.** 199, 2–12.

Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnol. Adv.** 30, 1458–80.

- Wang, W., Zhu, Y., Du, J., Yang, Y., Jin, Y., 2015. Influence of lignin addition on the enzymatic digestibility of pretreated lignocellulosic biomasses. **Bioresour. Technol.** 181, 7–12.
- Wang, X., Bai, X., Chen, D.-F., Chen, F.-Z., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., 2015. Increasing proline and myo-inositol improves tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to the mixture of multiple lignocellulose-derived inhibitors. **Biotechnol. Biofuels** 8, 142.
- Wimalasena, T.T., Greetham, D., Marvin, M.E., Liti, G., Chandelia, Y., Hart, A., Louis, E.J., Phister, T.G., Tucker, G. a, Smart, K. a, 2014. Phenotypic characterisation of *Saccharomyces* spp. yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. **Microb. Cell Fact.** 13, 47.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme Microb. Technol.** 48, 54–60.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2010. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme Microb. Technol.** 46, 170–176.
- Yan, Z., Li, J., Li, S., Chang, S., Cui, T., Jiang, Y., Cong, G., Yu, M., Zhang, L., 2015. Impact of lignin removal on the enzymatic hydrolysis of fermented sweet sorghum bagasse. **Appl. Energy** 160, 641–647.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H.-M., Park, S., 2011a. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 102, 9083–9.
- Yu, Z., Jameel, H., Chang, H., Park, S., 2011b. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 102, 9083–9089.
- Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Zhou, G., Yuan, Z., 2016. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. **Bioresour. Technol.** 199, 68–75.

Anexos: Dados suplementares de utilização biológica do licor de pré-tratamento

Apresentação

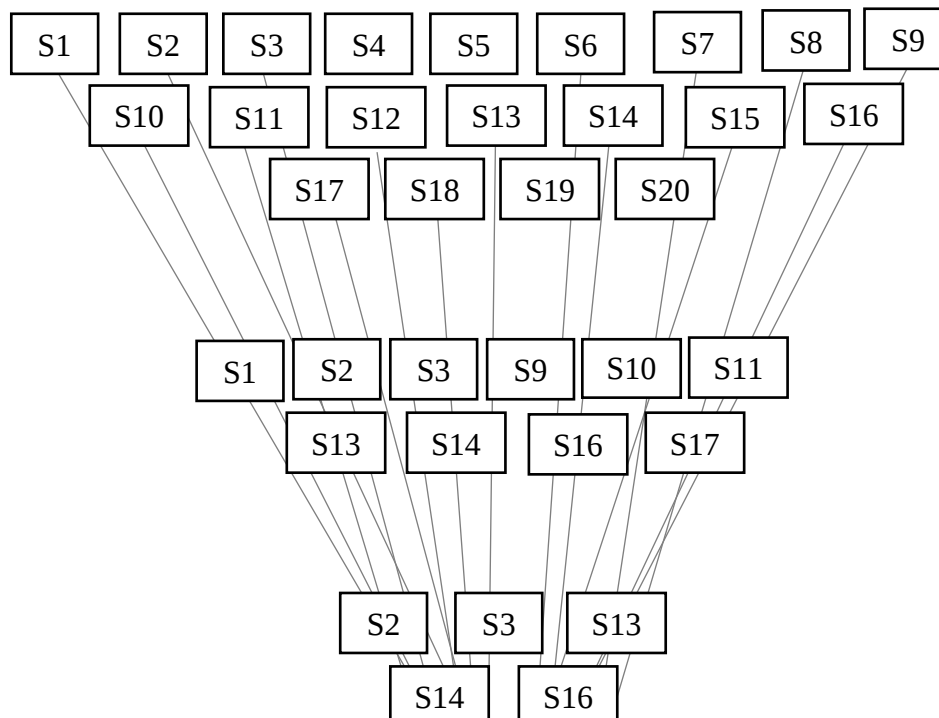
Os anexos reúnem dados de experimentos complementares de seleção de micro-organismos fúngicos – leveduriformes e filamentosos, com habilidade de crescer e consumir a fonte de carbono baseada em xilose presente no licor resultante da combinação dos pré-tratamento ozonólise e hidrotérmico. O licor representa, em princípio, um subproduto do beneficiamento do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Devido a sua composição química composta por fragmentos fenólicos da degradação da lignina, e compostos furânicos da degradação de carboidratos, além dos carboidratos monoméricos xilose, glicose e arabinose, sua metabolização representa um grande desafio biológico em termos de tolerância e possível assimilação de compostos inibitórios derivados da biomassa lignocelulósica. Os experimentos reportados a seguir representam sugestões com perspectivas de utilização deste subproduto com vistas a agregar valor ao material residuário por meio de bioprocessos que possam ser desenvolvidos futuramente a partir dos micro-organismos selecionados.

Anexo 1 – Cultivo de leveduras em licor

Vinte isolados de leveduras fermentadoras de pentoses foram selecionados para estudos de triagem a partir do banco de linhagens do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista, UNESP São José do Rio Preto. As linhagens foram previamente isoladas e identificadas por diferentes autores (Baffi et al., 2011; Bezerra-Bussoli et al., 2013; Martins, 2015).

Os ensaios de triagem de leveduras foram realizados em 3 etapas visando selecionar as cepas com maior capacidade de crescimento na presença de compostos inibitórios resultantes da degradação da lignina e da desidratação ácida dos próprios carboidratos, gerando compostos furânicos, conforme ilustrado a seguir (Fig. 1):

Figura 1. Representação esquemática da seleção de leveduras em licor.



Fonte: elaborado pelo autor.

Inicialmente as 20 linhagens foram reativadas a partir do estoque de culturas congeladas (*freezer* -80 °C) em meio sólido YEPD (20 g·L⁻¹ glicose; 20 g·L⁻¹ peptona; 10 g·L⁻¹ extrato de levedura, 15 g·L⁻¹ ágar), seguido pela transferência de colônias para caldo YEPX (20 g·L⁻¹ xilose; 20 g·L⁻¹ peptona; 10 g·L⁻¹ extrato de levedura) incubado em *shaker* a 30 °C e 200 rpm por 36 horas. As suspensões celulares obtidas em caldo YEPX foram utilizadas como inóculo nos ensaios de seleção realizados em microplacas de 96 poços com inóculo padronizado como 10% (v/v) da suspensão celular nos experimentos.

O licor bruto utilizado na primeira fase da seleção foi preparado através de ajuste de pH de 2,0 para 4,5 usando hidróxido de sódio, seguido de diluições 1:2, 1:5 e 1:10 com água destilada e filtração em membrana de 0,22 µm. Neste primeiro ensaio o objetivo foi determinar quais dos 20 isolados apresentava alguma tolerância à composição do licor e seria capaz de multiplicar-se em diferentes níveis de diluição. O caldo YEPX foi utilizado como controle positivo de crescimento livre de inibidores. Cada formulação de licor diluído e do controle foi distribuída em triplicata em poços das placas de micro diluição em um volume de 270 µL em cada poço, e outros 30 µL foram adicionados como inóculo de cada isolado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por até 60 horas. O crescimento celular foi estimado através de leitura da densidade óptica em espectrofotômetro equipado com leitor de microplacas a 630 nm nos tempos de 10h, 20h, 40h e 60h de incubação. A média de leitura de absorbância em “branco” – poços que receberam água destilada esterilizada ao invés de inóculo em cada formulação – foi subtraída das médias de leitura das amostras inoculadas. O incremento na turbidez dos poços ao longo do tempo foi considerado como resultado positivo de crescimento celular. Nesta primeira fase apenas 10 dos 20 isolados avaliados foram capazes de consumir as fontes de carbono na presença dos inibidores (dados não apresentados). Os isolados pré-selecionados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de 10 leveduras pré-selecionadas com consumo carboidratos na presença de inibidores do licor de pré-tratamento combinado.

Identificação deste trabalho	Identificação original da cepa	Espécie
S1	A11	<i>Trichosporon multisporum</i>
S2	B2	<i>Debaryomyces</i> sp.
S3	BR6-2AY	<i>Candida shehatae</i> var. <i>Insectosa</i>
S9	U2	<i>Cryptococcus laurentii</i>
S10	PT1-1BASP	<i>Candida shehatae</i> var. <i>Shehatae</i>
S11	LB3.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>
S13	-	<i>Pichia</i> sp.
S14	-	<i>Trichosporon laibachii</i>
S16	-	<i>Pichia kluyveri</i>
S17	G7.1	<i>Hanseniaspora</i> sp.

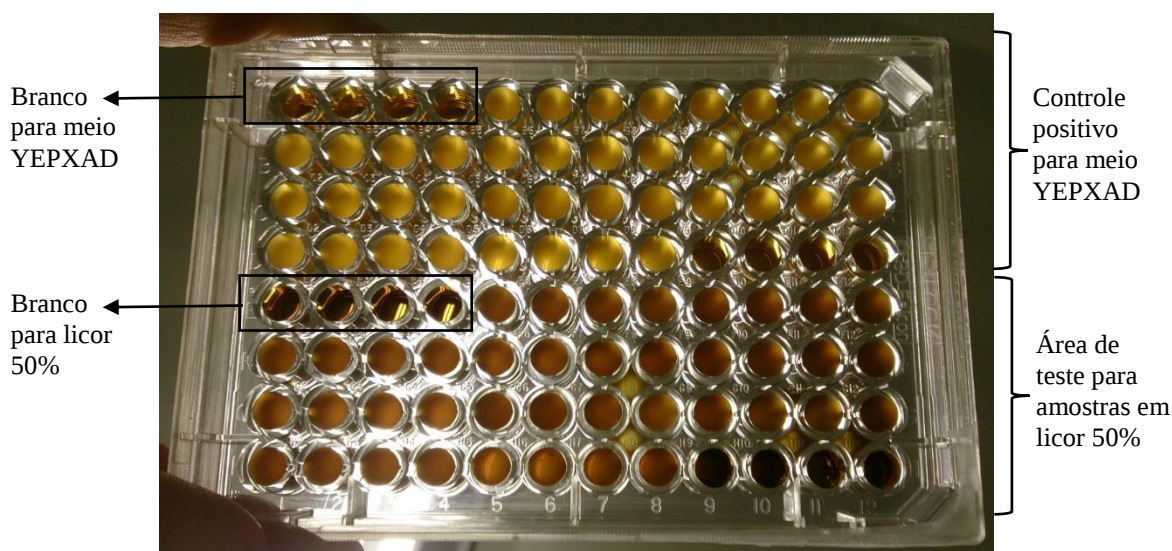
Fonte: elaborado pelo autor.

As 10 espécies pré-selecionadas foram a seguir testadas quanto a taxa de inibição do licor na concentração de 50% (segunda etapa), sendo que a diluição do licor foi realizada com meio de cultura YEPXAD ao invés de água destilada, visando manter uma proporção equivalente de açúcares entre o meio natural (licor diluído) e o meio sintético como controle (YEPXAD). O meio YEPXAD foi uma composição própria e derivada do meio YEPD adaptado à composição de açúcares presente no licor. Assim, o meio YEPXAD foi composto por: 10 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g·L⁻¹ de peptona, 5 g·L⁻¹ de glicose, 10 g·L⁻¹ de xilose, e 5 g·L⁻¹ de arabinose.

O ensaio de inibição envolveu o preparo da formulação de licor diluída na proporção de 50%, seguido de ajuste de pH e filtração, conforme já descrito. O pré-cultivo das 10 linhagens e preparo dos inóculos (10% v/v) foram iguais, e o ensaio utilizou o meio YEPXAD puro e adicionado de inóculo de cada linhagem como controle positivo (sem inibidores), e meio de cultivo natural (licor 50%) com inóculo de cada linhagem como teste. Também foram incluídos “brancos” para descontar a leitura de absorbância da cor de cada meio, conforme ilustrado através da Figura 2. A placa de micro diluição permaneceu incubada em estufa bacteriológica a 30 °C com agitação de 150 rpm por 72h até a leitura da densidade óptica em 630 nm. A diferença de absorbância entre as médias

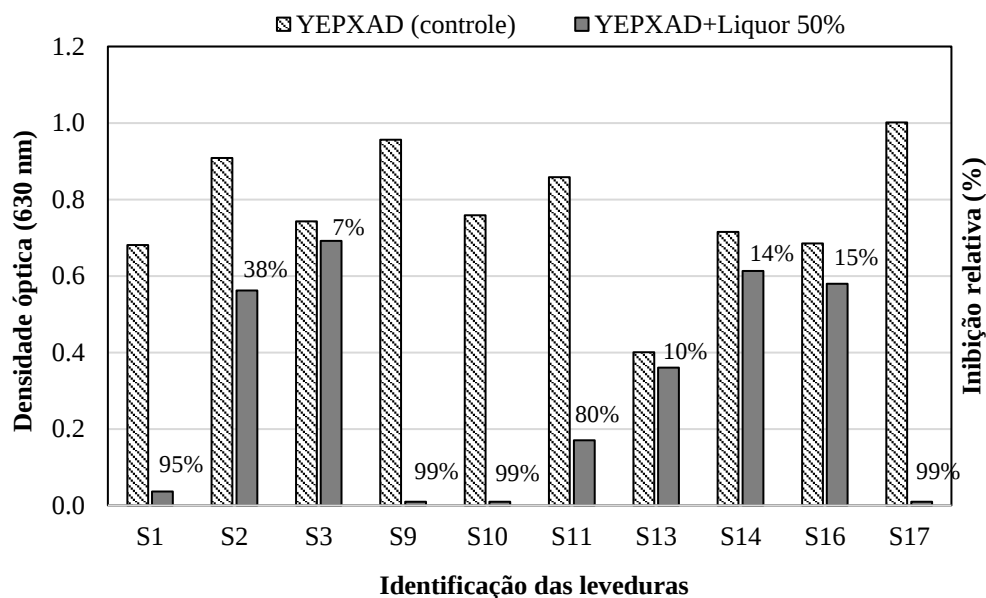
de cada amostra e a média de seus respectivos controles positivos foi definida como inibição relativa, expressa em percentual (%) de inibição de crescimento.

Figura 2. Esquematização do ensaio de inibição em microplaca.



Neste ensaio de inibição, comparando o crescimento relativo de cada linhagem no meio sintético (sem inibidores) e no meio natural com 50% de licor, observamos que dentre as 10 linhagens pré-selecionadas, cinco delas (S1, S9, S10, S11 e S17) foram bastante sensíveis à formulação e seus índices de inibição foram estimados em mais de 80% (Fig. 3), revelando menor capacidade de tolerância aos compostos inibitórios do licor. Dessa maneira, os outros 5 isolados (S2, S3, S13, S14 e S16) com os menores índices de inibição, que variou entre 7% e 38%, foram selecionados para o próximo ensaio de tolerância em diluições crescentes do licor.

Figura 3. Experimento de inibição utilizando meio YEPXAD com 50% de licor em 72h de cultivo.



Fonte: elaborado pelo autor.

Na terceira etapa de seleção de leveduras foram testados apenas as cinco melhores linhagens, ou seja, aquelas com menor taxa de inibição relativa. Neste experimento as respostas de crescimento celular foram avaliadas frente a concentrações crescentes de inibidores, obtidas pela diluição do licor bruto nas proporções de 30%, 50%, 70% e 90% em meio YEPXAD. Nestas formulações a concentração estimada (calculada) dos principais inibidores foi aquela descrita na Tabela 2. O ensaio foi realizado em microplaca e preparado conforme descrito anteriormente, com incubação em estufa bacteriológica a 30 °C com agitação de 150 RPM. As leituras de densidade óptica (630 nm) foram feitas em 24, 48, 72 e 140 horas de cultivo. O incremento da absorbância ao longo do tempo indicou resistência e capacidade de multiplicação celular naquela concentração de inibidores, enquanto a ausência de turbidez indicou sensibilidade a determinada concentração de licor.

Tabela 2. Composição estimada dos compostos inibidores em licor diluído.

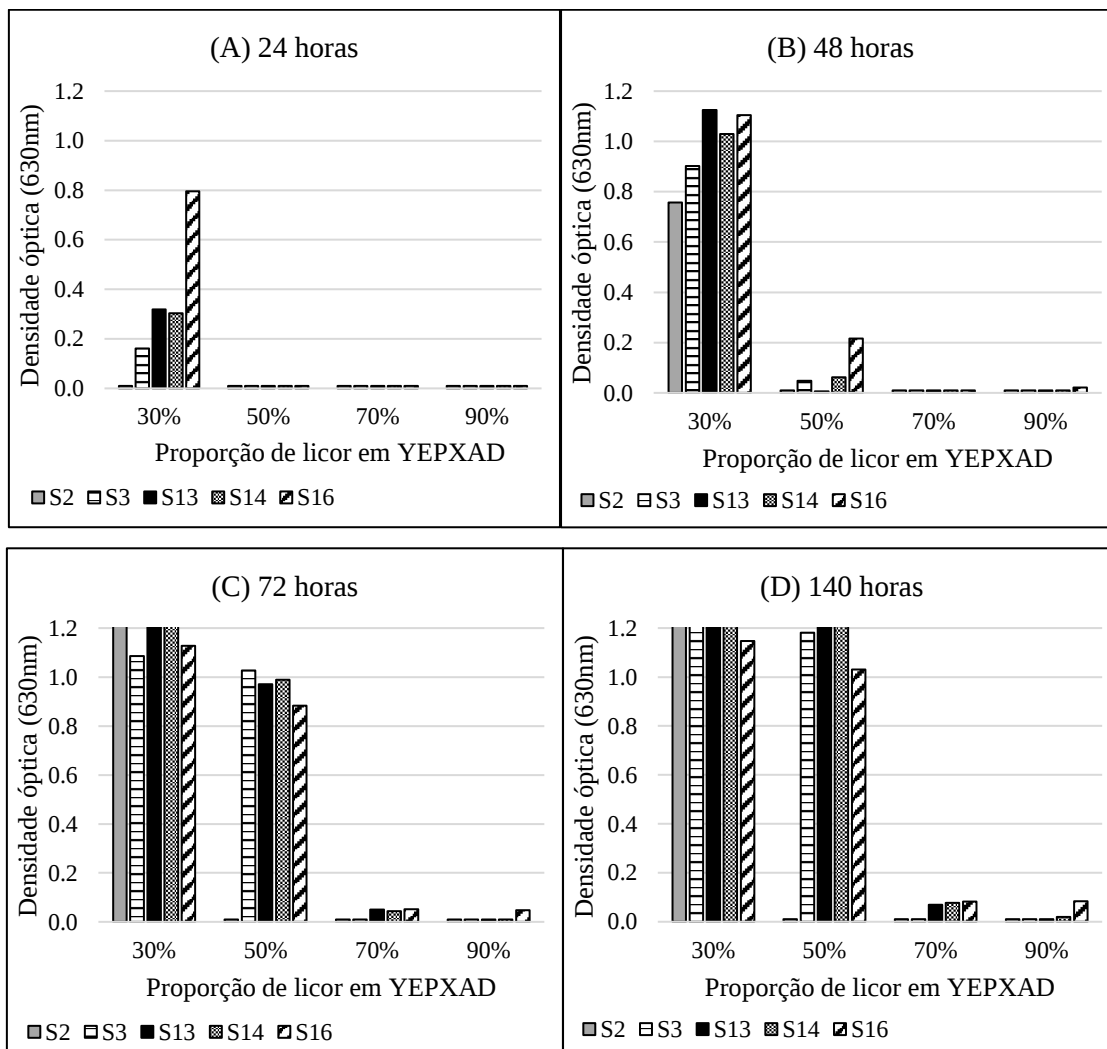
Componente	Concentração calculada (g·L ⁻¹)			
	Licor 30%	Licor 50%	Licor 70%	Licor 90%
Furfural	1,8	3,0	4,2	5,4
HMF	0,3	0,5	0,7	0,9
Ácido acético	0,6	1,1	1,5	1,9
Ácido fórmico	0,3	0,6	0,8	1,1
Fenólicos totais	0,6	1,1	1,5	2,0

Fonte: elaborado pelo autor.

Em 24 horas de cultivo (Fig. 4A) foi detectado crescimento apenas na formulação com 30% de licor para todos os isolados, exceto S2. Progressivamente todos demonstraram habilidade de crescimento nesta formulação ao longo do tempo de incubação. Empregando a formulação com 50% de licor, os isolados S3, S14 e S16 demonstram algum indicativo de crescimento em 48 horas, e crescimento vigoroso para todos em 72 horas, exceto para S2, que se mostrou sensível à concentração de 50% de licor neste experimento. Já as concentrações de 70% e 90% de licor não permitiram crescimentos celulares consideráveis, haja visto as elevadas concentrações de inibidores. Tendo em vista tais respostas, não se recomenda a utilização de licor com mais de 50% de concentração para as leveduras testadas.

Assim, considerou-se que as leveduras mais promissoras para o possível desenvolvimento de processos fermentativos utilizando licor como substrato foram: S3- *Candida shehatae* var. *Insectosa* BR6-2AY, S13- *Pichia* sp., S14- *Trichosporon laibachii*, e S16- *Pichia kluyveri* G1.1, que demonstraram habilidade de multiplicar-se adequadamente em meio de cultivo com concentrações estimadas de 3,0 g·L⁻¹ de furfural, 0,5 g·L⁻¹ de HMF e 1,1 g·L⁻¹ de fenóis como principais componentes tóxicos do licor.

Figura 4. Ensaio de resistência para cinco linhagens de leveduras selecionadas sob concentração crescente de licor em meio de cultura YEPXAD.



Fonte: elaborado pelo autor.

Referências

- Baffi, M. A.; Santos Bezerra-Bussoli, C. dos; Arévalo-Villena, M.; et al. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 75–78, 2011.
- Bezerra-Bussoli, C.; Baffi, M. A.; Gomes, E.; Da-Silva, R. Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a brazilian winery. **Current Microbiology**, v. 67, p. 356–361, 2013.
- Martins, G. M. **Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições do meio de cultivo visando processos de fermentação alcoólica**. São José do Rio Preto, 2015. 133p. (Tese de Doutorado em Microbiologia, UNESP).

Anexo 2 – Cultivo de fungos filamentosos em licor

O potencial de síntese de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas a partir de fungos filamentosos foi estudado empregando o licor como substrato de pré-cultivo de baixo custo, especialmente pela fonte disponível de carboidratos (majoritariamente xilose). Entretanto, a composição de subprodutos inibitórios representava o maior desafio para a assimilação e crescimento celular neste meio de cultivo, como previamente observado para as leveduras.

Vinte e cinco fungos filamentosos isolados de diferentes áreas da região Amazônica brasileira e pertencentes ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM) foram avaliados em estudos de triagem para cultivo em licor seguido de indução enzimática com substrato sólido. O cultivo de fungos filamentosos foi realizado em ágar PDA (*Potato dextrose agar*), e o meio de indução para síntese enzimática por fungos foi preparado de acordo com Delabona et al. (2016), conforme descrito na Tabela 1. Os reagentes químicos utilizados na formulação dos meios de cultivo foram da marca Sigma-Aldrich® ou equivalente.

Tabela 1. Composição química de meios de indução para fungos filamentosos.

Componente	Concentração (g·L ⁻¹)
Peptona	1,0
Fosfato Monopotássico (KH ₂ PO ₄)	2,0
Sulfato de Amônio ([NH ₄] ₂ SO ₄)	1,4
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0,4
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,3
Sulfato de Ferro (FeSO ₄)	0,005
Sulfato de Manganês (MnSO ₄)	0,0016
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄)	0,0014
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂)	0,002
Ureia	0,3

Fonte: adaptado de Delabona et al. (2016).

Os ensaios iniciais envolveram a tentativa de cultivo de 25 linhagens fúngicas, sendo destas 20 isolados de identificação taxonômica desconhecida, e 5 linhagens identificadas e utilizadas como referências. Inicialmente todas as linhagens foram reativadas em placas de ágar PDA a partir das culturas em estoque e incubadas em estufa bacteriológica a 29°C por um período de 5 a 7 dias para crescimento e obtenção dos inóculos para os experimentos com licor. Os inóculos foram feitos pela transferência de um disco de aproximadamente 2 cm de diâmetro, recortado da superfície do ágar recoberto pelos micélios crescidos, para frascos *erlenmeyer* contendo 25 mL de licor diluído a 50% em meio de indução, composto por água peptonada 0,1% e sais (vide Tabela 1). A formulação foi tamponada utilizando Biftalato de potássio/NaOH até pH 5,2 e filtrada em membrana de 0,22 µm para esterilização a frio antes da adição dos discos de inóculo. Os 25 cultivos foram mantidos em *shaker* a 29°C com agitação de 200 rpm por até 7 dias para o desenvolvimento de *pellets* ou turbidez como indicativos de crescimento celular. Apenas os fungos capazes de metabolizar os carboidratos na presença dos inibidores do licor a 50% de concentração na fase de triagem foram utilizados nos ensaios de indução enzimática.

A presença dos compostos tóxicos (furanos e compostos fenólicos especialmente) na composição do licor exerceu forte efeito inibitório sobre o desenvolvimento celular dos fungos filamentosos, sendo que das 25 linhagens submetidas ao cultivo, apenas 6 foram capazes de metabolizar os carboidratos e formar hifas na formulação com 50% de diluição. Os fungos selecionados estão listados na Tabela 2 e ilustrados na Figura 1.

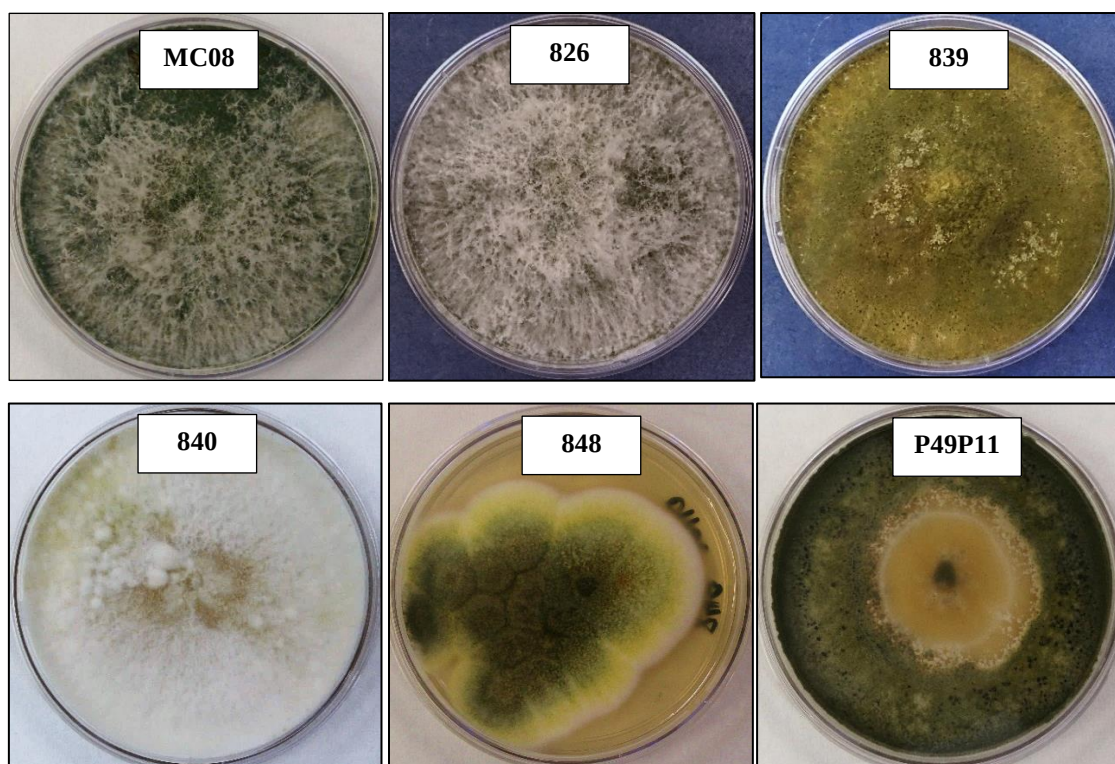
Estes fungos foram então pré-cultivados em um meio mínimo com baixa concentração de glicose ($4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e sais para obtenção de *pellets* no desenvolvimento dos inóculos. Nesta fase, um modelo de cultivo celular com alimentação pulsada de licor a partir do pré-cultivo em glicose foi desenvolvido visando o acúmulo de biomassa de hifas para os experimentos de indução enzimática posteriores (Fig. 2).

Tabela 2. Relação de fungos selecionados com consumo carboidratos na presença de inibidores do licor de pré-tratamento combinado.

Identificação	Espécies	Fonte / origem de isolamento
MC08	Sem identificação	Isolado de mandioca
826	Sem identificação	Isolado de serragem
839	Sem identificação	Isolado de serragem
840	Sem identificação	Isolado de serragem
848	Sem identificação	Isolado de serragem
P49P11	<i>Trichoderma harzianum</i>	Isolado de solo do bioma amazônico (Delabona <i>et al.</i> , 2012)

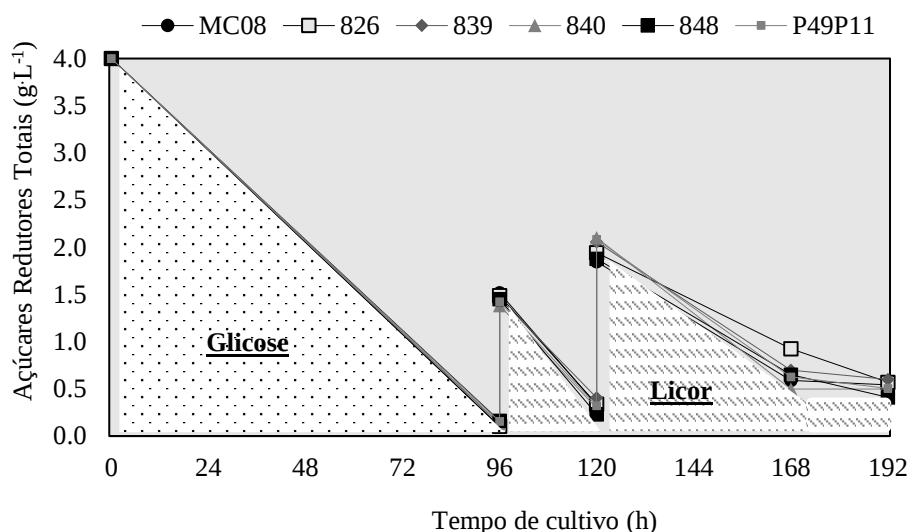
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 1. Representação dos fungos selecionados na triagem em placas de PDA com 5 a 7 dias de cultivo.



Fonte: autor.

Figura 2. Modelo de cultivo de fungos filamentosos em meio basal de glicose seguido de pulsos de alimentação com licor para produção de biomassa.



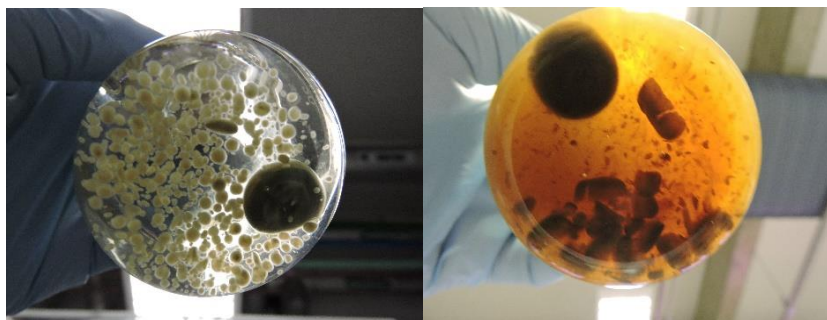
Fonte: elaborado pelo autor.

Neste modelo cada um dos 6 fungos selecionados foi inoculado (1 disco de 2 cm de diâmetro de micélio crescido em ágar PDA) em 15 mL de meio mínimo de glicose como fonte de carbono, e mantido a 29°C / 200 RPM por 96 h para a formação dos primeiros pellets (Fig. 3). Sequencialmente, à medida que se observou o esgotamento da fonte de carbono sintética (glicose), foi adicionado substrato natural (licor), sendo que o primeiro pulso de alimentação de 5 mL de licor diluído 50% foi feito com 96 h, e o segundo com 120 h de cultivo. O conteúdo total de 25 mL permaneceu incubado por até 192 h para o consumo de açúcares redutores totais do meio. Depois disso, a biomassa formada foi utilizada nos experimentos de indução enzimática como inóculo ao nível de 10% (v/v).

O acompanhamento do consumo dos açúcares redutores totais foi realizado pelo método de Miller (DNS) adaptada para escala de microplaca. A reação foi obtida pela mistura de 100 µL da amostra (diluída ou não) e 100 µL do reagente DNS, submetida ao aquecimento a 99°C por 5 minutos em equipamento termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™ Thermal Cycler 96-well) para reação. A leitura em

espectrofotômetro a 540 nm foi realizada a partir da transferência de 100 μ L da reação para placa de leitura de 96 poços.

Figura 3. Cultivo de fungos filamentosos em meio basal de glicose para produção de *pellets* (à esquerda) e aumento da biomassa com metabolização de licor (à direita).

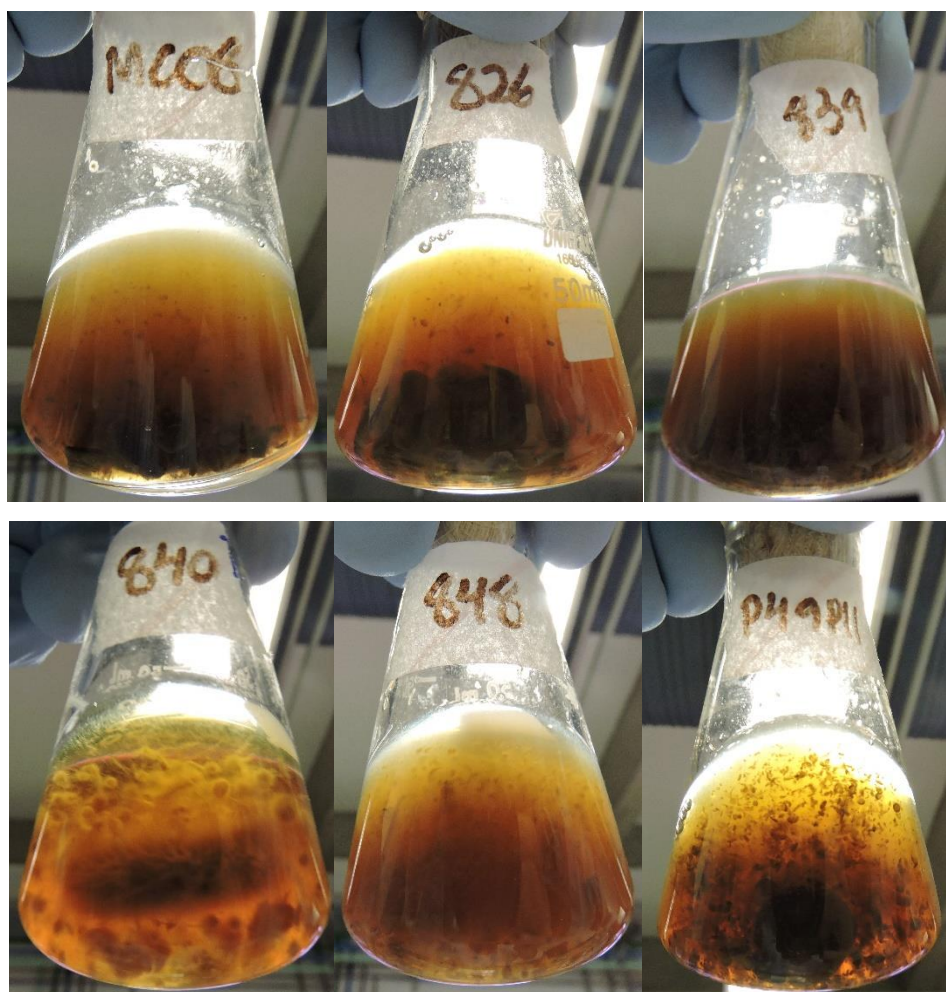


Fonte: autor.

O cultivo alimentado com licor simulou um ambiente de decomposição, que foi mantido sob baixa concentração de fonte de carbono e contínua exposição aos inibidores pela alimentação fracionada por pulsos. Assim foi possível promover o crescimento celular submerso dos fungos filamentosos e utilizar este conteúdo como inóculo para a produção de enzimas utilizando o método de indução com substrato lignocelulósico, conforme descrito por Delabona *et al.* (2016). A biomassa celular de cada fungo obtida em licor está representada através da Figura 4.

Os experimentos de indução enzimática foram realizados em frascos *erlenmeyer* de 500 mL contendo 225 mL de meio de indução, e 10 g·L⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar em suspensão como indutor. Bagaço *in natura* e bagaço OHT foram os indutores testados. O conteúdo (meio de indução com indutor) foi esterilizado por autoclavação e então adicionados dos 25 mL de inóculo de cada biomassa pré-cultivada em licor. Os frascos permaneceram incubados em *shaker* a 29°C e 200 RPM de agitação por 144 h para a produção de enzimas. As atividades enzimáticas de xilanase, β -glicosidase e FPase foram monitoradas pela amostragem de 5 mL do sobrenadante do cultivo em 72, 96, 120 e 144 h. O perfil de indução do bagaço pré-tratado e não-tratado foram comparados quanto à síntese de enzimas hidrolíticas extracelular.

Figura 4. Biomassa de hifas produzidas em licor ao final de 196 h de cultivo.



Fonte: autor.

As atividades enzimáticas foram determinadas a partir de metodologias adaptadas para redução de escala em 10 vezes, conforme descrito por Delabona *et al.* (2016). A atividade de papel filtro (FPase) seguiu a metodologia proposta por Ghose (1987), e as atividades de xilanase e β -glicosidase foram realizadas em microplacas de 96 poços. A atividade de β -glicosidase foi medida em pH 4,8 utilizando 80 μ L de p -nitrofenol- β -D-glicosidase (pNPG) 1 mM (Sigma-Aldrich®) como substrato e 20 μ L de amostra do sobrenadante livre de células, ambos diluídos em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). A mistura foi incubada para reação a 50 °C por 10 minutos em termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™ Thermal Cycler 96-well). A reação foi paralisada pela adição de 100 μ L de solução de carbonato de sódio 1 M (Na_2CO_3) e a absorbância foi

medida a partir de 100 μL de reação em espectrofotômetro a 400 nm. A atividade de xilanase foi determinada através da mistura de 50 μL de substrato *birchwood xylan* 0,5%, 40 μL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), e 10 μL de amostra do sobrenadante livre de células diluída no mesmo tampão. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos em termociclador e a reação foi paralisada pela adição de 100 μL de reagente DNS. A absorbância foi medida a partir de 100 μL de reação em espectrofotômetro a 540 nm utilizando xilose como padrão.

As respostas de indução com 1% de bagaço estão apresentadas na Tabela 3 com os picos de produção sublinhados. De maneira geral os índices de atividade enzimática encontrados foram baixos, entretanto, nota-se uma influência positiva no uso do bagaço pré-tratado ao invés do bagaço não-tratado como indutor. Por exemplo, as atividades FPase e β -glicosidase (exceto para fungo 848) foram incrementadas na presença do bagaço OHT. Já para a atividade de xilanase os índices foram similares ou inferiores com bagaço OHT e isso pode ser explicado pela baixa composição de hemicelulose (4%) restante no material após os pré-tratamentos ozonólise e hidrotérmico combinados, sendo, portanto, não apropriado para a indução de enzimas do complexo xilanolítico. A linhagem de *Trichoderma harzianum* P49P11 atingiu os picos de produção com bagaço OHT em 96 horas com 0,32 $\text{FPU}\cdot\text{mL}^{-1}$ de FPase, 29 $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ de xilanase e 3,1 $\text{UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ de β -glicosidase, sendo, entretanto, cerca de metade da produção atingida preliminarmente com 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose como pré-inóculo e 1% de bagaço DSB (explosão a vapor e deslignificado) como indutor (Delabona *et al.*, 2016).

De maneira geral, destaca-se que a linhagem 840 demonstrou um potencial relevante na obtenção de enzimas celulolíticas em bagaço tratado, com evidente incremento nas atividades enzimática de FPase e β -glicosidase a partir do bagaço OHT, sendo, portanto, um isolado com perspectivas de melhoria e possibilidade otimização para a atribuição das condições ambientais ótimas à indução da produção de enzimas. Adicionalmente, outros materiais lignocelulósicos de diferentes composições podem ser estudados a fim de determinar o potencial de indução de cada biomassa.

Tabela 3. Atividades enzimáticas em sobrenadante de cultivo de fungos com bagaço *in natura* e bagaço OHT como substrato indutor.

Linhagem	Atividades enzimáticas*	<i>Bagaço in natura</i>				<i>Bagaço OHT</i>			
		72 h	96 h	120 h	144 h	72 h	96 h	120 h	144 h
MC08	Xilanase	6,13	7,8	14,1	<u>15,7</u>	5,1	15,3	20,6	<u>24,4</u>
	β -glicosidase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	FPase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,11	0,27	<u>0,30</u>	0,30
826	Xilanase	6,1	7,5	12,9	<u>13,6</u>	1,9	12,0	13,7	<u>13,9</u>
	β -glicosidase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	0,12	0,12
	FPase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,12	0,26	<u>0,30</u>
839	Xilanase	5,3	6,8	11,2	<u>11,6</u>	1,5	6,9	9,6	<u>14,5</u>
	β -glicosidase	0,10	0,13	0,17	<u>0,18</u>	n.d.	0,42	<u>0,71</u>	0,12
	FPase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,17	0,16
840	Xilanase	11,3	13,4	17,5	<u>17,6</u>	3,4	13,1	10,6	<u>13,8</u>
	β -glicosidase	0,24	0,26	0,31	<u>0,34</u>	0,18	2,21	2,55	<u>3,46</u>
	FPase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,30	0,43	<u>0,45</u>
848	Xilanase	15,1	15,4	20,7	<u>20,9</u>	2,4	3,3	3,5	<u>7,4</u>
	β -glicosidase	0,55	0,56	0,62	<u>0,63</u>	0,67	1,32	1,41	<u>1,80</u>
	FPase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	0,13
P49P11	Xilanase	17,0	17,1	<u>24,7</u>	23,3	28,4	<u>28,8</u>	16,7	9,4
	β -glicosidase	0,50	0,53	0,52	<u>0,57</u>	2,84	<u>3,12</u>	2,77	3,00
	FPase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,27	<u>0,32</u>	0,31	0,32

n.d. = não detectado. *Atividades enzimáticas de xilanase e β -glicosidase em UI mL⁻¹, e atividade FPase em FPU mL⁻¹. Fonte: elaborado pelo autor.

Referências

- Delabona, P. da S., Farinas, C. S., da Silva, M. R., Azzoni, S. F., da Cruz Pradella, J.G., 2012. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugarcane bagasse for on-site cellulase production. **Biores. Technology** 107, 517-521.
- Delabona, P. da S., Lima, D.J., Robl, D., Rabelo, S.C., Farinas, C.S., da Cruz Pradella, J.G., 2016. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 43, 617-626.