

# PROCESSAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL: UMA REVISÃO

## PROCESSING LIGNOCELLULOSIC BIOMASS FOR ETHANOL PRODUCTION: A REVIEW

B. L. S. SANTIAGO<sup>1</sup> e F. A. RODRIGUES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Brasil  
E-mail: barbara.santiago@ufv.br

### *article info*

Article history:

Received 2017-07-03

Accepted 2017-09-27

Available online 2017-11-20

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomassa; Pré-tratamento; Etanol.

**KEYWORDS:** Biomass; Pre-treatment; Ethanol.

**RESUMO:** *A sociedade é atualmente desafiada a conciliar a crescente demanda de energia com irrefutável necessidade de sustentabilidade. O esgotamento progressivo dos combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa motivam o emprego de fontes de energia de caráter renovável, sustentável e de baixo custo. Nesse contexto, o etanol de segunda geração tem sido apontado com alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, uma vez que é obtido a partir de biomassa lignocelulósica. A efetiva aplicação dos materiais lignocelulósicos requer etapas de pré-tratamento que promovem o fracionamento dos seus principais constituintes (celulose, hemicelulose e lignina). A combinação de diferentes tipos de pré-tratamentos é explorada visando aumento da recuperação dos açúcares e a mínima liberação de substâncias com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano, que afetam a eficiência e produtividade do processo fermentativo. Esta breve revisão de literatura apresenta as principais tecnologias envolvidas no processamento da biomassa lignocelulósica para produção de etanol.*

**ABSTRACT:** *Society is currently challenged by a growing need for energy with an irrefutable need for sustainability. The progressive depletion of fossil fuels and greenhouse gas emissions motivates the use of renewable, sustainable and low-cost energy sources. In this context, second-generation ethanol has been identified as an alternative to petroleum-derived fuels, since it is obtained from lignocellulosic biomass. The effective application of lignocellulosic materials requires pretreatment steps that promote the fractionation of its main constituents (cellulose, hemicellulose, lignin). The combination of different types of pre-treatments and exploration aimed at increasing the recovery of sugars and a minimum release of substances with potential inhibitory action to the microbial metabolism, affecting an efficiency and fermentative process. This brief review presents the main technologies involved in the processing of lignocellulosic biomass for ethanol production.*

## 1. INTRODUÇÃO

A sociedade é atualmente desafiada a conciliar a crescente demanda de energia com irrefutável necessidade de sustentabilidade. O esgotamento progressivo dos combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa motivam o emprego de fontes de energia de

caráter renovável, sustentável e de baixo custo. Nesse contexto, o etanol de segunda geração tem sido apontado com alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, uma vez que é obtido a partir de biomassa lignocelulósica. Esta biomassa é renovável; geograficamente bem distribuída; é favorável ao meio ambiente, já que é uma forma de fixar o CO<sub>2</sub>; não compete com a agricultura voltada para alimentação humana; é encontrado em abundância e a baixo custo.

A efetiva aplicação dos materiais lignocelulósicos requer etapas de pré-tratamento que promovem o fracionamento dos seus principais constituintes (celulose, hemicelulose e lignina). A combinação de diferentes tipos de pré-tratamentos é explorada visando aumento da recuperação dos açúcares e a mínima liberação de substâncias com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano, que afetam a eficiência e produtividade do processo fermentativo. Uma alternativa promissora é a realização pré-tratamento com álcali diluído anterior ao pré-tratamento ácido, permitindo obtenção de hidrolisado hemicelulósico rico em xilose e com baixa concentração de compostos inibidores, e ainda um sólido rico em celulose e mais susceptível à ação das enzimas. A sacarificação enzimática e fermentação podem ser realizadas simultaneamente (SSF) ou em separado (SHF). A primeira configuração é favorável por reduzir a inibição exercida pela glicose ao complexo enzimática, uma vez que é constantemente convertida a etanol pelas leveduras.

## 2. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Os materiais lignocelulósicos são uma alternativa ao material açucarados que é atualmente empregado como matéria prima para a produção de etanol (mosto açucarado da cana). Estes materiais são considerados vantajosos pois são uma fonte de energia renovável, favorável ao meio ambiente; não competem com a agricultura voltada para alimentação humana e animal; e especialmente, é encontrado em abundância e a baixo custo (RUBIN, 2008). O material lignocelulósico é composto principalmente por estrutura aromática denominada lignina e polímeros de carboidratos, homopolissacarídeo denominado celulose, e heteropolissacarídeos denominado hemicelulose.

A celulose é um polímero linear de unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosose, unidas por ligação glicosídica  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, e grau de polimerização variado. Este polímero se encontra na forma de fibras compostas por microfibrilas, ordenadas paralelamente e ligadas por ligação de hidrogênio, que conferem rigidez a estrutura, e são responsáveis por organizar as fibrilas, estruturas altamente ordenadas que formam as fibras de celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Uma propriedade que define as fibrilas de celulose é o grau de cristalinidade, que determina quão firmemente as cadeias de glicanas estão ligadas umas as outras. Regiões com alto ordenamento são conhecidas como região cristalina e a fibra nessa região tem maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação. Regiões com menor grau de ordenamento são chamadas regiões amorfas, nas quais a fibra possui maior flexibilidade (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

A hemicelulose é um complexo heteropolissacarídeo que consiste em cadeias ramificadas de açúcares, hexoses como  $\beta$ -D-glicose,  $\beta$ -D-manose e  $\alpha$ -D-galactose, e pentoses como  $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-arabinose ligadas por ligações glicosídicas de diferentes tipos. Esta macromolécula pode conter ainda ácidos urônicos, outros açúcares como  $\alpha$ -L-ramnose, e  $\alpha$ -

L-fucose, e seus açúcares podem estar parcialmente substituídos por grupos acetil. Pode ser classificada em função dos diferentes tipos de açúcares que as compõe, como xilanas, mananas e galactanas por exemplo (FENGEL; WEGENER, 1989). Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molar (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto mais susceptível a hidrólise química sob condições mais brandas (SUN; CHENG, 2005).

A lignina tem estrutura formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligação tipo éter, que estabelecem ligações cruzadas entre si. É composta por três diferentes precursores de monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989).

### 3. PROCESSAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

A estrutura do material lignocelulósico que constitui a biomassa foi desenvolvido evolutivamente para evitar a degradação por micro-organismos e animais. Portanto existem vários mecanismos de resistência à quebra de ligações químicas, como por exemplo a lignina que atua como barreira física e restringe acesso de enzimas às frações açucaradas; o grupamento acetil da hemicelulose que altera o reconhecimento catalítico das enzimas diminuindo o rendimento de hidrólise; a cristalinidade da celulose que diminui sua área superficial, essencial para a ação das enzimas celulasas, entre outros (ZHAO *et al.*, 2012).

Dessa forma a primeira etapa do processamento da biomassa deve ser o pré-tratamento, que tem a função de solubilizar açúcares da hemicelulose e aumentar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose. A fermentação da porção hemicelulósica depende de micro-organismos capazes de fermentar pentoses, como por exemplo a levedura *Pichia stipitis*. A fermentação da porção celulósica, por sua vez, depende da hidrólise enzimática, de forma a liberar os monômeros de glicose, que por sua vez serão fermentados por leveduras capazes de fermentar hexoses, como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. A última etapa do processamento é a recuperação do etanol através do processo de destilação. O efluente da destilação apresenta uma fração sólida rica em lignina, que pode ser queimada para a geração de vapor (KUMAR *et al.*, 2011). A sequência das etapas descritas está ilustrada no esquema da Figura 1.

O tipo de biomassa, o pré-tratamento empregado, o custo das enzimas, o rendimento da hidrólise enzimática e a estratégia do bioprocessamento (SSF, SHF), são fatores que influenciam diretamente no custo final do etanol produzido, e por isso devem ser muito bem compreendidos e otimizados (KUMAR *et al.*, 2011). A escolha da biomassa influencia na eficiência do pré-tratamento, que por sua vez altera a biomassa de forma a facilitar ou dificultar a sacarificação enzimática, o que tem efeito direto na produtividade e rendimento da etapa de fermentação, tanto pela concentração de açúcar disponível quanto na presença ou ausência de inibidores.

Segundo Kumar *et al.* (2011), um fator determinante para que o etanol produzido tenha menor custo de produção é o aproveitamento total dos açúcares disponíveis na biomassa. É essencial que, além das hexoses oriundas da fração lignocelulósica, as pentoses que compõe a hemicelulose também sejam fermentadas a etanol. Para comprovar essa necessidade o autor supôs uma variação nos valores da eficiência de fermentação de pentoses e concluiu que o

custo do etanol decresce de \$1,20/L para \$0,76/L quando a eficiência de fermentação aumenta de 10 para 90%.

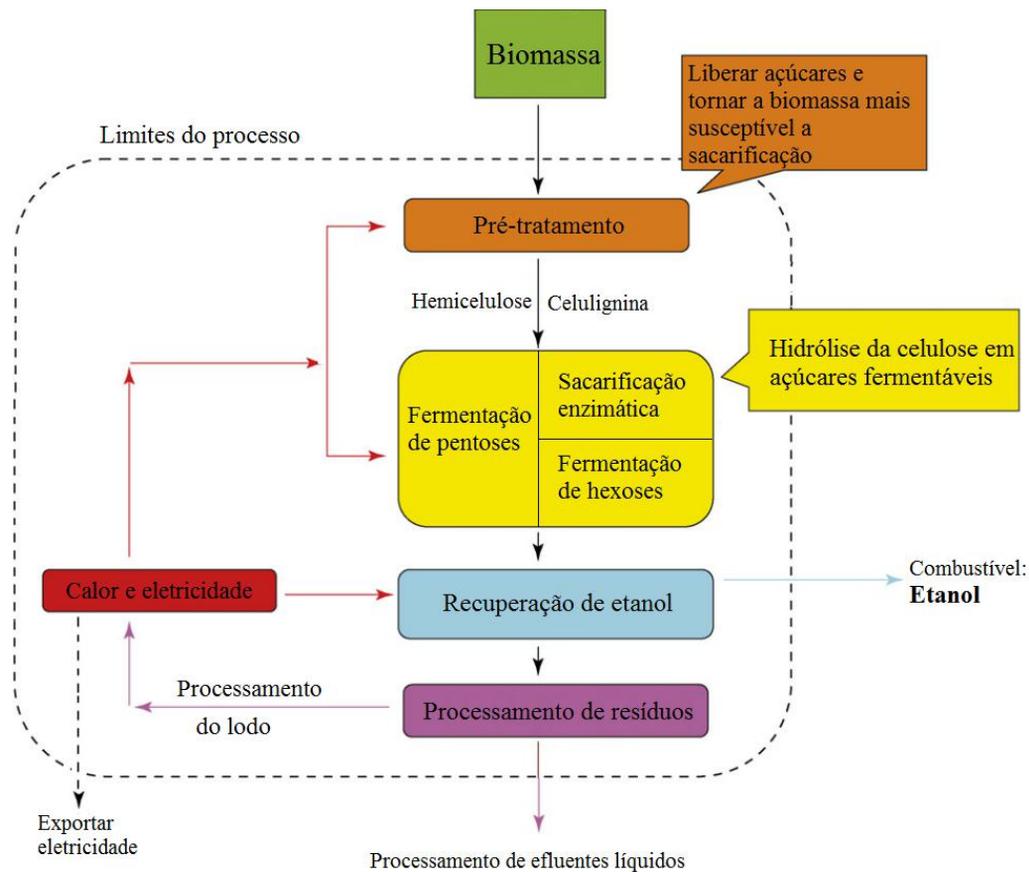


Figura 1. Etapas de processamento da biomassa lignocelulósica. Adaptado de Wyman (2007)

Seguida a etapa de fermentação é realizada a recuperação do etanol que envolve o processo de destilação. A primeira coluna de destilação separa o vapor enriquecido com etanol, do efluente que contém grande parte da lignina, proteínas insolúveis e compostos não fermentados. O vapor rico em etanol passa por uma coluna de retificação que separa a mistura azeotrópica de água e álcool. Essa mistura passa por peneira molecular da qual se obtém etanol anidro. O efluente da primeira coluna de destilação é separado em uma fração sólida rica em lignina, e uma líquida rica em água e sólidos solúveis. A fração rica em lignina pode conter até 50% de umidade, como é o caso do pré-tratamento ácido, e é queimada para geração de vapor (KUMAR *et al.*, 2011). Parte da fração líquida é evaporada, condensada, e retorna para o processo, sendo reciclada. Outra parte é tratada na estação de tratamento de água da planta, num digestor anaeróbio produzindo biogás que é queimado com a fração sólida rica em lignina, juntamente com o lodo proveniente da fração evaporada. O vapor obtido da queima da fração rica em lignina é maior que o necessário no processo. Assim o excesso pode ser transformado em eletricidade, e ainda o excesso de eletricidade pode ser vendido, como mostra o esquema da Figura 1.

### 3.1. Pré tratamento

A primeira etapa do processamento da biomassa é o pré-tratamento, e visa diminuir sua recalcitrância, aumentando a acessibilidade das enzimas na estrutura da celulose e a recuperação dos monômeros de glicose que a compõe, para posterior fermentação. O pré-tratamento também pode ser visto como uma etapa de fracionamento da biomassa, quando a celulose é separada da fração hemicelulósica, para que ambas possam ser fermentadas separadamente. O pré-tratamento tem influência direta no arranjo dos componentes da estrutura do material lignocelulósico, e baseia-se em técnicas como tratamentos térmicos, químicos, físicos, biológicos e/ou combinação deles.

O rendimento de açúcar recuperado, tanto da celulose insolúvel quanto da hemicelulose solúvel, e formação de inibidores por degradação de açúcares são alguns dos parâmetros usados para avaliar o pré-tratamento (SUN; CHENG, 2002). A eficiência dos processos de pré-tratamentos na recuperação das frações é influenciada por variáveis como: tipo de catalisador, concentração do catalisador, temperatura, relação sólido:líquido e tamanho da partícula da biomassa. Exemplos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são: pré-tratamento alcalino e pré-tratamento ácido.

O pré-tratamento alcalino é um método que visa principalmente a remoção da fração da lignina do material. Dependendo das condições de processo, a utilização do álcali pode ainda alterar a estrutura da celulose (FENGEL; WEGENER, 1989). Este pré-tratamento baseia-se na utilização de compostos alcalis como agente catalisador, e acarreta em uma série de reações de clivagem das ligações tipo éter entre as unidades de fenilpropano que compõe a lignina, promovendo a sua dissolução. Além disso a reação alcalina contribui para aumentar a área superficial da celulose e diminuir o seu grau de polimerização e cristalinidade, tornando-a mais acessível às enzimas na etapa de sacarificação.

Chen *et al.*(2012) estudaram o efeito do pré-tratamento alcalino sobre a recuperação das frações de celulose e hemicelulose empregando diferentes biomassas, incluindo: *silvergrass*, capim elefante e palha de arroz. O tratamento foi realizado por 8 semanas a 25°C, utilizando de hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>) e hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), nas concentrações de 0,1 g/g e 0,03 g/g de biomassa respectivamente. Segundo os autores a recuperação da celulose foi maior que 90% em ambos pré-tratamentos avaliados, porém a remoção de hemicelulose e lignina variou fortemente. Para todas as biomassas estudadas, o tratamento com hidróxido de cálcio removeu aproximadamente 70% da hemicelulose, enquanto que o tratamento com hidróxido de amônio removeu apenas 45% da hemicelulose. A maior remoção de lignina (42%) foi obtida no tratamento com hidróxido de cálcio empregando palha de arroz, seguida da *silvergrass* (22,7%) e capim elefante (12,9%). Segundo os autores a composição e o tipo de ligação presente na lignina foram determinantes para sua remoção em cada biomassa.

O efeito da concentração de hidróxido de sódio sobre a concentração de glicose liberada após a etapa de sacarificação enzimática do bagaço de colza foi avaliado por Mathew *et al.*(2011). A reação foi realizada a 130 °C por 30 minutos e os resultados revelaram que o rendimento de glicose na sacarificação aumentou de 67,7% para 119,6% com o aumento da concentração de hidróxido de sódio de 0,13 para 0,75 mol/L, o que corresponde a 0,52% e 3% respectivamente. O rendimento superior a 100% foi atribuído a

liberação da glicose a partir do amido presente no bagaço de colza.

O pré-tratamento ácido é uma técnica muito difundida para solubilização dos açúcares da biomassa lignocelulósica e baseia-se na adição de ácido mineral ao material, e a mistura é submetida a diferentes condições de temperatura e tempo.

A recuperação dos açúcares no pré-tratamento com ácido diluído é baseada na hidrólise das ligações glicosídicas entre os açúcares que compõe principalmente a hemicelulose. Segundo Fengel e Wegener (1989) existe uma relação entre a taxa de hidrólise e o tipo de açúcar que compõe o polissacarídeo. Essa característica de cada açúcar está relacionada à sua conformação da cadeia polissacarídica, anéis de cinco carbonos (furanos) são hidrolisados mais rapidamente quando comparados com anéis de seis carbonos (piranos), pois apresentam maior tensão angular para manutenção do anel.

A escolha das condições (concentração do ácido, temperatura, tempo, relação sólido:líquido) a serem utilizadas no pré-tratamento ácido dependem do material a ser utilizado. Por exemplo, a hidrólise da grama costeira (*Cynodondactylon L.*) foi realizada por Redding *et al.* (2011). A maior recuperação de xilose foi de 83%, empregando 1,2% de ácido sulfúrico, a 140 °C por 30 minutos. Esse tratamento se mostrou estatisticamente similar em relação a liberação de xilose àqueles com 0,9% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 160 °C a 15 minutos ou 140 °C a 60 minutos, ou ainda com 1,2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 160 °C por 5 minutos.

Mussatto e Roberto (2005) estudaram por meio de planejamento fatorial, as variáveis que influenciam no pré-tratamento do bagaço de malte a fim de otimizar a recuperação da fração hemicelulósica no hidrolisado. A maior recuperação da fração hemicelulósica foi de 96,5% obtida com relação sólido:líquido de 1:12 g/g, concentração de ácido de 140 mg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por grama de matéria seca e tempo de reação de 37 minutos. Nessas condições foi recuperado 94,2% de xilana e 100% de arabinana. A menor recuperação de hemicelulose foi de 88,7% nas condições de 1:10 relação sólido:líquido, concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 120 mg/g e 27 minutos de reação.

De acordo com Hendriks e Zeeman (2009) a vantagem do pré-tratamento com ácido diluído é tornar a celulose mais acessível para as enzimas na etapa de sacarificação enzimática, além de permitir o aproveitamento da fração hemicelulósica separadamente. Mussatto e Roberto (2008) analisaram o efeito da hidrólise ácida na celulignina de bagaço de malte. A hidrólise ácida com 1,25% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 17 minutos a 120 °C removeu 86,5% da hemicelulose, 14% da lignina e apenas 1,8% da celulose. O estudo morfológico da estrutura da biomassa mostrou que o material não tratado apresentou fibras rígidas e altamente ordenadas. A remoção da hemicelulose modificou o material, aumentando o volume de seus poros mantendo a estrutura rígida inicial. Os autores também analisaram o efeito da hidrólise ácida sobre a sacarificação enzimática, e concluíram que a remoção da hemicelulose durante o pré-tratamento favorece o ataque das enzimas celulolíticas, e conseqüentemente a liberação dos monômeros de glicose. A conversão de celulose na etapa de sacarificação aumentou 3,5 vezes em relação ao controle não pré-tratado.

O processo de pré-tratamento da biomassa pode acarretar na liberação de substâncias com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano, podendo desta forma afetar a

eficiência e produtividade do processo fermentativo (BALLESTEROS *et al.*, 2000). A natureza dos compostos inibidores e sua concentração nos hidrolisados dependem da matéria prima e do método de pré-tratamento empregado (DU *et al.*, 2010). Tais compostos podem ser classificados de acordo com sua origem: 1) produtos de degradação da lignina, como compostos fenólicos e polifenólicos; 2) produtos de degradação de pentoses e hexoses, como furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente; 3) produtos hidrolisados da estrutura da hemicelulose, como ácido acético. Eles podem influenciar fortemente o metabolismo microbiano e assim afetar a eficiência e produtividade do processo fermentativo. Tais inibidores agem de uma forma diferente na estrutura celular e a concentração tóxica de cada composto depende das condições de fermentação, do microorganismo em questão, e do efeito sinérgico entre eles (KWON *et al.*, 2011).

A explosão a vapor tem o objetivo de desorganizar a estrutura lignocelulósica, favorecendo a atuação das enzimas na etapa de sacarificação enzimática, e conseqüentemente aumentando a recuperação de açúcares da biomassa. Neste método a biomassa é tratada com vapor pressurizado, com adição ou ausência de ácido mineral diluído (BALLESTEROS *et al.*, 2000). A alta temperatura do vapor acarreta em liberação de grupos acetil ligados aos componentes da biomassa. Estes grupos na forma de ácido acético catalisam a hidrólise da ligação glicosídica que une os açúcares que compõe a hemicelulose, o que resulta na sua solubilização aquosa (ZIMBARDI *et al.*, 2007)

O pré-tratamento por explosão a vapor tem como vantagem o baixo impacto ambiental, devido ao uso de baixas concentrações de compostos químicos, comparado aos processos de hidrólise ácida e alcalina (RUIZ *et al.*, 2008). Segundo os autores, o processo apresenta a desvantagem de liberar altas concentrações de produtos de degradação da lignina e de açúcares, que são inibidores da etapa de fermentação dos açúcares (SÖDERSTRÖM *et al.*, 2002).

Cara *et al.*(2008) avaliaram o efeito da impregnação de água e solução ácida na biomassa proveniente da poda de oliveiras no pré-tratamento por explosão a vapor. Segundo os autores a impregnação de água na biomassa antes do pré-tratamento por explosão a vapor aumentou a taxa de transferência de massa pelo material, favorecendo a hidrólise das ligações glicosídicas, o que foi ainda mais favorecido com a impregnação com solução ácida, que age como catalisador da reação. A recuperação em massa do material variou de 66 a 96%, sendo menor quando a impregnação foi realizada com 2% de ácido sulfúrico na temperatura de 210 °C, e maior quando a biomassa foi impregnada com água e pré-tratada a 200 °C.

Ruiz *et al.*(2008) observaram que a sacarificação enzimática de talos de girassol pré-tratados por explosão a vapor a 220 °C foi capaz de recuperar 50% da glicose potencial da celulignina. Entretanto, no material pré-tratado a 210 °C foram recuperadas apenas 40,7% da glicose potencial. De acordo com os autores, o aumento da temperatura no tratamento de explosão a vapor aumenta a proporção de celulignina na fração insolúvel, e prepara a fibra para melhor ataque das enzimas celulolíticas que hidrolisam essa fração da etapa de sacarificação enzimática.

A autohidrólise, assim como o tratamento por explosão a vapor, tem como objetivo a desorganização da estrutura lignocelulósica da biomassa e conseqüentemente favorecer a liberação dos açúcares na sacarificação enzimática (LI *et al.*, 2007). Este pré-tratamento

envolve água no estado vapor e alta pressão, porém não requer rápida descompressão do reator e nem adição de agentes químicos. A reação de hidrólise é catalisada por ácidos orgânicos liberados durante o contato com o vapor a altas temperaturas (160 a 240 °C). A concentração dos ácidos solubilizados da hemicelulose é refletida no perfil de pH do hidrolisado obtido após o pré tratamento, e portanto indica sua severidade. Simultaneamente há solubilização de extrativos, parcial dissolução da lignina e cinzas e solubilização de proteínas (LEE *et al.*, 2009).

De acordo com Monsier *et al.*(2005) a autohidrólise promove uma menor formação de inibidores quando comparado ao tratamento por explosão a vapor. Neste tratamento, os açúcares da hemicelulose são solubilizados na forma de oligossacarídeos, minimizando a formação de produtos de degradação. Essa característica exige que ambas as frações (celulose e hemicelulose) obtidas da autohidrólise da biomassa sejam novamente hidrolisadas aos monômeros de açúcares fermentáveis. (LEE *et al.*, 2009)

Kumar *et al.*(2011) estudaram o efeito da autohidrólise sobre a recuperação das frações celulose, hemicelulose e lignina na biomassa *switchgrass*. Os autores constataram que o aumento da temperatura foi responsável por aumentar a solubilização da hemicelulose de 30% para 70% quando a temperatura aumentou de 150 °C para 190 °C, durante o pré tratamento por 20 minutos. Foi ainda observado uma solubilização de 40% da fração de lignina, independente da temperatura empregada. Segundo os autores, a porção de celulose na fração insolúvel aumentou para 51% no material pré-tratado a temperatura de 150 °C, e aumentou para 58% a 190 °C, em comparação com a *switchgrass* nativa (38,9%). O rendimento de recuperação de glicose na sacarificação também aumentou de 25% para 82% com o respectivo aumento de temperatura.

Mosier *et al.*(2005) estudaram as condições (tempo e temperatura) que permitissem maior recuperação de açúcares das frações de celulose e hemicelulose no pré-tratamento autohidrólise de palha de milho. Os autores observaram que com 15 minutos de pré-tratamento a 190 °C, foram recuperados 32,5 g/L de glicose e 18 g/L de xilose após sacarificação enzimática do material, o que correspondeu a recuperação de 90% dos açúcares da biomassa.

### **3.2. Fermentação da fração hemicelulósica**

A bioconversão da fração hemicelulósica é precedida pelo fracionamento da biomassa e solubilização das suas unidades monoméricas. O método mais empregado para esse fracionamento é pré-tratamento ácido diluído, que fornece o hidrolisado hemicelulósico, composto principalmente de unidades monoméricas de xilose. De uma forma geral os maiores rendimentos e produtividades da bioconversão desse açúcar em etanol são obtidos por leveduras. A levedura *Pichia stipitis* é relatada como a mais promissora para essa conversão, uma vez que possui capacidade de fermentar uma ampla variedade de açúcares, não necessita de adição de vitaminas ao meio de fermentação e apresenta altos rendimentos de etanol a partir de xilose (NIGAN *et al.*, 2001).

A produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz pela levedura *Pichia stipitis* foi avaliada por Silva *et al.*(2010). A biomassa foi pré-tratada com

ácido sulfúrico na concentração de 100 mg/g de massa seca, por 30 minutos a 120 °C, obtendo-se um hidrolisado de 19 g/L de xilose. Segundo os autores os melhores resultados foram obtidos com uma concentração de xilose de 50 g/L no hidrolisado, agitação de 200 rpm e aeração de 2,5 (relação  $V_{\text{fraco}}/V_{\text{meio}}$ ). Nestas condições o fator de conversão de substrato em produto (YP/S) foi de 0,37 g/g e produtividade volumétrica em etanol ( $Q_P$ ) foi de 0,39 g/L.h.

O estabelecimento das condições ótimas do meio de cultura é uma importante maneira de aumentar a produtividade e melhorar a eficiência do bioprocesso. A bioconversão de açúcares em etanol pode ser influenciada por fatores como temperatura, pH, oxigenação, adição de nutrientes e concentração inicial de substrato, inóculo e presença de inibidores, entre outros fatores (SILVA *et al.*, 2010).

### 3.3. Fermentação da fração celulósica

A bioconversão da fração celulósica em etanol ocorre em dois passos. Primeiramente a cadeia de celulose é hidrolisada enzimaticamente, gerando unidades monoméricas (glicose), que na segunda etapa serão fermentadas em etanol (CASTRO, 2014).

A hidrólise enzimática, também chamada de sacarificação enzimática, ocorre através da ação de enzimas celulases, que são um grupo de proteínas capazes de hidrolisar a celulose sinergisticamente. O grupo é composto principalmente por endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. A endoglucanase, (EG) ou endo-1,4-D-glucanohidrolase, ataca regiões de baixa cristalinidade da fibra da celulose hidrolisando as ligações glicosídicas intercadeia. A exoglucanase ou celobiohidrolase, 1,4-b-D-glucan celobiohidrolase age nas extremidades da fibra de celulose, e removendo unidade de celobiose. Já a enzima  $\beta$ -glicosidase age na estrutura da celobiose, hidrolisando-a a dois resíduos de glicose.

A sacarificação enzimática é um fenômeno de superfície, e como tal exige contato físico entre enzima e substrato. Por isso a principal barreira é o acesso das enzimas ao substrato, que é limitado devido as características da estrutura da celulose como a cristalinidade (recalcitrância), a área superficial, o grau de intumescimento, a polimerização da fibra da celulose e sua associação com outras frações da celulignina (ARANTES; SADDLER, 2011). É afetada ainda por fatores como: características do substrato, carga da enzima, condições de reação, e inibição causada pelo produto das reações (inibição por feedback ou retroalimentação). Esta etapa é responsável por grande impacto no custo total do processo. Baixa carga de enzimas gera baixos rendimentos e taxas de reação, enquanto elevada carga de enzimas aumenta o custo do processo (HAMELINCK *et al.*, 2005).

A influência da associação da celulose com outras frações da celulignina (hemicelulose e lignina) foram estudadas por Mussatto *et al.*(2008). Os autores observaram que a remoção da hemicelulose e da lignina do bagaço de malte permitiu a rendimento de glicose de 85,6%, e taxa de conversão de celulose de 91,7%. Esses valores correspondem a aumento do rendimento e taxa de conversão de 14,5 e 17,4% quando comparado àquele obtido para a celulignina, e aumento de 280 e 310% quando comparado com a biomassa sem qualquer pré-tratamento, respectivamente.

Após a liberação de glicose, o processo fermentativo pode ser conduzido empregando

duas configurações diferentes: hidrólise e fermentação em separado (SHS) e sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (GARCÍA-APARÍCIO *et al.*, 2011).

A sacarificação e fermentação em separado (SHF) é caracterizada pela inoculação do microorganismo fermentador após a etapa de sacarificação. Essa configuração tem a vantagem de realizar cada etapa em sua condição ideal: hidrólise enzimática a 45-50 °C e a fermentação a 30 °C. A principal desvantagem é a inibição sofrida pelas enzimas pelo acúmulo de glicose e celobiose, diminuindo o rendimento de hidrólise (OLOFSSON *et al.*, 2008). A inibição pode ser minimizada empregando menor carga de sólidos, ou maior carga enzimática (BALAT *et al.*, 2011). Porém, a menor carga de sólidos relaciona-se com menor concentração de glicose liberada, e conseqüentemente a menor quantidade de etanol obtida na etapa de fermentação. O aumento da carga enzimática por sua vez eleva o custo do processo (OHGREN *et al.*, 2007). Segundo Drussen *et al.* (2009) uma alternativa para diminuir o efeito de inibição por retroalimentação é a remoção contínua da glicose. Isso pode ser feito utilizando as etapas de sacarificação e fermentação simultaneamente (SSF), uma vez que as leveduras consomem a glicose, retirando-a do meio e produzindo etanol. O maior desafio da SSF é encontrar condições compatíveis para atuação das enzimas da sacarificação e dos microorganismos da fermentação. A condição de pH é a mesma para ambos, já que tanto as enzimas e as leveduras atuam na faixa entre 4,5 e 5. Entretanto a temperatura das celulasas é aproximadamente 50 °C, bem superior à das leveduras empregadas, de 30 a 37 °C. Para o sucesso da técnica é necessário o uso de leveduras termo tolerantes capazes de fermentar glicose a etanol em temperaturas acima de 40 °C (DRUSSEN *et al.*, 2009).

#### 4. CONCLUSÃO

A produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos depende do processamento desses materiais através do pré-tratamento. Essa etapa deve maximizar a disponibilidade de açúcares fermentáveis, evitar a degradação dos carboidratos e a formação de compostos inibidores do metabolismo microbiano, além de ser viável economicamente. A fermentação das frações açucaradas da biomassa também é de suma importância e depende de microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses em diferentes configurações de processo. De forma geral é importante o desenvolvimento de tecnologias capazes de aumentar a conversão das frações açucaradas sem entretanto aumentar o custo de processamento, de forma a viabilizar a construção de unidades industriais de processamento do material lignocelulósico.

#### REFERÊNCIAS

- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 3, p. 1-16, 2011.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p. 858-875, 2011.
- BALLESTEROS, I.; OLIVA, J.; NAVARRO, A. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. **Applied Biochemistry**, v. 84, p. 97-110, 2000.
- CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; CASTRO,

- E. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Fuel**, v. 87, n.6, p.692–700, 2008
- CASTRO, R.C.A.; ROBERTO, I.C. Selection of thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n.3, p.1553-1564, 2014
- CHEN, X.; SHEKIRO, J.; ELANDER, R.; TUCKER, M. Improved Xylan Hydrolysis of Corn Stover by Deacetylation with High Solids Dilute Acid Pretreatment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n.1, p.70–76, 2012.
- DU, B.; SHARMA, L. N.; BECKER, C.; CHEN, S.-F.; MOWERY, R.A, VAN WALSUM, G. P.; CHAMBLISS, C. K.. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 103, p. 430-440, 2010.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.
- GARCIA-APARICIO, M.P.; OLIVA, J.M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A; NEGRO, M.J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**, v.90, p.1624-1630, 2011.
- HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G. van; FAAIJ A.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, **Biomassa and Bioenergy**, v. 28; p. 384-419, 2005
- HENDRIKS, A T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n.1, p.8-10, 2009
- KUMAR, D.; MURTHY, G.S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 27, 2011
- KUMAR, S.; KOTHARI, U.; KONG, L.; LEE, Y. Y.; GUPTA, R. B. Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. **Biomass and Bioenergy**, v. 35 n. 2, p. 956–968. 2011.
- KWON, Y.; MA, A.; LI, Q.; WANG, F.; ZHUANG, G.; LIU, C. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n.17, p. 8099–8104, 2011
- LEE, J. M.; SHI, J.; VENDITTI, R. A.; JAMEEL, H. Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n.24, p. 6434–6441, 2009.
- LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource technology**, v. 98, n.16, p. 3061–3068. 2007
- MATHEW, A. K.; CHANEY, K.; CROOK, M.; HUMPHRIES, A. C. Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption. **Bioresource technology**, v. 102, n. 11, p. 6547–53. 2011.
- MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource technology**,

- v.96, n.18, p. 1986–1993, 2005
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2453–2460, 2005
- MUSSATTO, S.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos. **Industrial Crops and Products**, v. 25, p. 231-237, 2007.
- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicelullulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Jornal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.
- OHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v.98, p.2503-2510, 2007.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 7, p. 1-14, 2008.
- REDDING, A. P., WANG, Z., KESHWANI, D. R., CHENG, J. J.. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 102, n.2, p. 1415–1424 , 2011
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels, **Nature**, v. 454, p.841–845, 2008.
- RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and microbial technology**, v. 42, n. 2, p.160–6, 2008
- SILVA, J; MUSSATTO, S.; I.; ROBERTO, I; C; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, p. 259-265, 2012
- SÖDERSTRÖM, J., PILCHER, L., GALBE, M., ZACCHI, G.. Two-step steam pretreatment of softwood with SO<sub>2</sub> impregnation for ethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 5, p. 98-100, 2002.
- SUN, Y.; CHENG, J. J.; Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002
- SUN, Y.; CHENG, J. J.; Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource technology**, v.96, n. 14, p.1599–606, 2005
- VÁSQUEZ, M. P. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation, **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 136, p. 141-153, 2007.
- ZHAO, Xu.; ZHOU, Y.; LIU, D. Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.105, p.160-168, 2012.
- ZIMBARDI, F.; VIOLA, E.; NANNA, F.; LAROCCA, E.; CARDINALE, M.; BARISANO, D. Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n.2, p. 195–206, 2007