



**Mariana Fernandes
Correia**

**Produção de bioetanol a partir de licor de
cozimento ao sulfito ácido**



**Mariana Fernandes
Correia**

**Produção de bioetanol a partir de licor de cozimento
ao sulfito ácido**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor. Dmitry Victorovich Evtuguin, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Ana Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro do Projecto
“Biorrefinaria: Potencialidades do licor
de cozimento de *Eucalyptus globulus*
ao sulfito ácido” com a indústria Caima,
S.A. no âmbito do Projecto de
Investigação Científica e
Desenvolvimento Tecnológico
CICECO/DQUA

o júri

presidente

Prof. Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Isabel Maria Pires Belo
Professora Auxiliar da Universidade do Minho

Prof. Doutor Dmitry Evtuguin
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Eng. António Fernandes dos Santos Prates
Director de Laboratório e Ambiente, Caima – Indústria de Celulose, S.A.

agradecimentos

À Professora Doutora Ana Xavier agradeço a orientação de todo o trabalho, apoio, empenho, carinho e amizade.

Ao Professor Doutor Dmitry Evtuguin agradeço todo o apoio, ensinamento incansável e amizade.

Ao Engenheiro António Prates em representação da Caima, S.A., agradeço o apoio financeiro de toda a investigação que permitiu desenvolver um trabalho em cooperação com a indústria de grande interesse actual, assim como a cedência do licor para todo o projecto. Agradeço também o apoio financeiro para deslocamentos a congressos e a concessão da Bolsa de Investigação.

À Professora Doutora Isabel Spencer-Martins agradeço toda a orientação durante o trabalho experimental, assim como a oferta das leveduras desacidificantes da Portuguese Yeast Culture Collection da qual é directora.

À Dra. Mimi agradeço a ajuda incansável e orientação nas análises de HPLC.

Às colegas de laboratório Sandra, Sara e Paula agradeço a orientação nas análises de GC-FID.

Aos colegas de laboratório e amigos Raquel, Ana Sofia, Rui, Nuno, Pedro, Ana Patrícia, Gisela e Catarina agradeço a amizade e ajuda durante a parte experimental do trabalho.

À Universidade de Aveiro agradeço a oportunidade de realizar esta investigação.

À minha família, pais, irmã e Hugo agradeço o apoio, incentivo, amizade e carinho que sempre demonstraram durante toda a minha formação académica e especialmente na concretização deste projecto.

palavras-chave

Bioetanol, xilose, fermentação, licor ao sulfito ácido, *Eucalyptus globulus*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, desacidificação.

resumo

O Licor de Cozimento ao Sulfito Ácido (HSSL) utilizado neste trabalho é um subproduto da indústria papeleira originado a partir do processo de cozimento da madeira de *Eucalyptus globulus* com ácido bissulfito. Este contém dissolvido lenhosulfonatos e produtos resultantes da hidrólise das hemiceluloses dos quais $40\text{-}45\text{gL}^{-1}$ são monossacarídeos, e em maioria xilose.

A fracção de açúcares presente, pode ser usada como substrato na produção de vários compostos, nomeadamente etanol. O objectivo deste estudo é desenvolver um processo biotecnológico de produção de bioetanol a partir deste licor usando uma levedura fermentadora de pentoses, a *Pichia stipitis*, tendo como finalidade a produção de um biocombustível em alternativa às fontes fósseis.

A primeira parte do trabalho foi o estudo do metabolismo da *Pichia stipitis* na presença de diferentes concentrações de licor e em diferentes reactores: Erlenmeyer e Biorreactor com controlo de pH. No entanto, os rendimentos e produtividades de etanol foram reduzidos devido à presença de compostos inibidores como o ácido acético (cerca de 8gL^{-1}), o hidroximetilfurfural e os lenhosulfonatos.

A segunda parte envolveu a remoção desses mesmos inibidores por diferentes métodos incluindo a desacidificação biológica com diferentes leveduras, das quais a *Saccharomyces cerevisiae* apresentou melhores resultados removendo todo o ácido acético em menos de 30h. A evaporação para redução de compostos voláteis e separação da fracção de açúcares usando resinas de troca iónica foram os outros dois métodos. Os melhores resultados foram obtidos usando este último com rendimento de etanol de $0,48\text{g etanol/g açúcar consumido}$. Ainda na optimização do meio fermentativo foi testada uma enzima comercial para aumento dos açúcares disponíveis à fermentação, o que resultou num aumento de 30% de xilose e a glucose quase quadruplicou.

keywords

Bioethanol, xylose, fermentation, Hardwood Spent Sulphite Liquor, *Eucalyptus globulus*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, deacidification.

abstract

Hardwood Spent Sulfite Liquor (HSSL) is a waste by-product of pulp mills formed during wood delignification with bisulfite solution. HSSL contains dissolved lignosulfonates and hemicellulose hydrolysis products, which comprises 40-45 gL⁻¹ sugars, mainly xylose.

The sugar fraction can be used as a substrate for the production of diverse products including ethanol. The objective of this study is to propose a biotechnological approach to produce bioethanol, alternative to fossil fuels, from this liquor using a xylose fermenting yeast: *Pichia stipitis*.

The first part of this work was to study *Pichia stipitis* metabolism in the presence of different HSSL concentrations and in different reactors: Erlenmeyer and Biorreactor with pH control. However, ethanol yield and productivities obtained were reduced due to presence of inhibiting compounds like acetic acid (about 8gL⁻¹), hydroxymethylfurfural and lignosulfonates.

The second part involved different detoxification methods including biological methods with different deacidificant yeasts, evaporation to reduce volatile compounds and sugar fraction separation using ion-change resins. The best results were obtained with this separation device, where the ethanol yield was maximum (0,48g ethanol/g sugar consumed). The best deacidification was reached with *Saccharomyces cerevisiae* allowing the total acetic acid removal during 30h. In addition to media optimization trials some enzymatic hydrolysis were also carried out and resulted in 30% xylose increase and about four times of glucose.

ÍNDICE

ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS	4
2.1.1 Biocombustíveis em Portugal	6
2.1.2 O caso do Bioetanol	7
2.2 MICRORGANISMOS	9
2.2.1 Microbiologia do Género Pichia	9
2.2.2 Leveduras Desacidificantes	10
2.3 PROCESSO FERMENTATIVO	11
2.3.1 Bioquímica da Fermentação Etanólica	11
2.3.2 Cinética de Fermentação	14
2.4 FORMAÇÃO E ORIGEM DOS LENHOSULFONATOS	17
2.4.1 Composição Química da Madeira	17
2.4.2 Processo de Cozimento ao Sulfito Ácido (Sulfite Pulping)	20
2.4.3 Degradação do Material Lenhocelulósico	22
1.5 REMOÇÃO DE INIBIDORES	25
1.5.1 Métodos Físico-Químicos	25
1.5.2 Métodos Biológicos	26
2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS	27
2.1 MICRORGANISMOS – manuseamento e manutenção	28
2.2 MEIOS DE CULTURA	28
2.2.1 Meios de Cultura Gerais	28
2.2.2 Meios de Cultura Selectivos	29
2.3 ASSÉPSIA E AMOSTRAGEM	32
2.3.1 Assépsia	32
2.3.2 Amostragem	32
2.4 CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO E CRESCIMENTO	33
2.4.1 Pré -Tratamento do Licor	33

2.4.2 Condições de Fermentação Líquida	33
2.4.2.1 Fermentações em Erlenmeyer	34
2.4.2.2 Fermentações em Biorreactor	34
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	35
2.5.1 Análise do Licor (Hardwood Spent Sulfite Liquor)	35
2.5.1.1 – Teor de lenhosulfonatos	35
2.5.1.2 – Teor de Cinzas e pH	35
2.5.1.3 – Teor de Açúcares Redutores por oxidação do ácido 3,5- dinitrosalicílico (método de DNS)	35
2.5.1.4. – Análise de Monossacarídeos	36
Recta de Calibração	37
Quantificação de Açúcares nas Amostras	38
2.5.2 Determinação de Biomassa	38
2.5.2.1 Método Gravimétrico	38
2.5.2.2 Método Turbidimétrico	39
2.5.3 Análise por HPLC (Consumos e Produção)	39
2.5.4 Espectroscopia de FT-IR	40
2.5.4 Análise Elementar	40
2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	40
2.7 REMOÇÃO DE INIBIDORES	41
2.7.1 Desacidificação Biológica	42
2.7.1.1 Meio Sólido	42
2.7.1.2 Meio Líquido	42
2.7.2 Desacidificação por Evaporação	43
2.7.3 Remoção de Lenhosulfonatos	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1.COMPOSIÇÃO DO LICOR	47
3.2 FERMENTAÇÕES EM ERLLENMEYER	48
3.2.1 Meios Sintéticos	48
3.2.2 Fermentações Sequenciais com Licor Industrial	50
3.3 FERMENTAÇÕES EM BIORREACTOR	53
3.3.1 Ensaio Abiótico	54
3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	55

3.5 DESACIDIFICAÇÃO POR ARRASTAMENTO DE VAPOR.....	57
3.6 DESACIDIFICAÇÃO – ABORDAGEM BIOLÓGICA.....	57
3.6.1 Escolha de Levedura desacidificante em meio sólido.....	58
<i>A – Meios com Açúcares e Ácido acético.....</i>	<i>58</i>
i)- Meio com 0,6% (p/v) de ácido acético:	59
ii) - Meio com 0,8% (p/v) de ácido acético:	59
<i>B – Meios sem Açúcares com Ácido acético.....</i>	<i>60</i>
i) Meio com 0,6% (p/v) de ácido acético:	61
ii) Meio com 0,8% (p/v) de ácido acético:.....	61
3.6.2 Optimização da etapa de desacidificação	63
<i>A - Fermentação com Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>63</i>
<i>B - Fermentação com Candida tropicalis.....</i>	<i>64</i>
<i>C - Fermentação com Candida utilis.....</i>	<i>65</i>
<i>D - Fermentação com Pichia anomala</i>	<i>66</i>
3.7 RESINAS DE TROCA IÓNICA.....	68
4. CONCLUSÕES	71
5. BIBLIOGRAFIA	74
6. ANEXOS	79
ANEXO 1 – Rectas de Calibração (HPLC).....	80
ANEXO 2 – Rectas de Calibração (GC-FID).....	81
ANEXO 3 – Gráficos correspondentes às fermentações em Erlenmeyers	82
ANEXO 4 – Espectro de FT-IR relativo ao ensaio abiótico.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de CO ₂ na utilização de biocombustíveis [4].	5
Figura 2 – Evolução do Consumo de Biocombustíveis em Portugal. [1]	6
Figura 3 – Evolução da produção de bioetanol na UE-15 [8].	8
Figura 4 – Célula típica de levedura: a) esquema representativo b) fotografia ao microscópio electrónico (Adaptado de Rocha, C.M.R, 1996).	10
Figura 5 – Esquema representativo do processo de fermentação etanólica a partir de glucose.	12
Figura 6 - Vias metabólicas de conversão de xilose a xilulose e consequente conversão de xilulose a etanol	12
Figura 7 – Curva de crescimento microbiano.	15
Figura 8 – Esquema da estrutura da celulose (Adaptado de Moore et al, 1998).	17
Figura 9 – Monossacarídeos principais das hemiceluloses.	18
Figura 10 – Esquema da estrutura da lenhina proposto por Adler, em 1977 (Adaptado de Lee, J., 1997 [34]).	19
Figura 11 – Esquema de Produção da pasta de papel e formação do HSSL.	21
Figura 12 – Esquema da decomposição da madeira originando compostos inibidores (Adaptado de Mussatto et al,2004)	23
Figura 13 – Exemplos de alguns compostos fenólicos existentes no HSSL.	24
Figura 14 – Influência da concentração de ácido acético na produtividade e rendimento de etanol pela <i>P. stipitis</i>	24
Figura 15 – Curva de calibração obtida entre o peso seco e a densidade óptica a 650nm de <i>Pichia stipitis</i> .	39
Figura 16 – Esquema ilustrativo do trabalho desenvolvido na tese.	45
Figura 17 – Curvas de crescimento nos meios sintéticos em Erlenmeyer.	49
Figura 18 – Curvas de consumo de açúcares e produção de etanol em meios sintéticos (símbolos a cheio correspondem ao meio com ácido acético e símbolos a vazio ao meio sem ácido).	49
Figura 19 – Gráfico de barras representativo da produtividade volumétrica das fermentações em Erlenmeyer.	52
Figura 20 – Exemplo de uma das contaminações obtidas para alguns ensaios em Erlenmeyer:	52
A) observação em placa de Petri ; B) observação ao microscópio.	52
Figura 21 – Fotografia do depósito observado no ensaio abiótico com 40% de licor.	54

Figura 22 - Gráfico de barras representativo do aumento de glucose por hidrólises enzimática	55
Figura 23 - Gráfico de barras representativo do aumento de xilose por hidrólises enzimática	56
Figura 24 - Esquema do estudo de pH de acordo com as zonas de viragem dos indicadores.....	58
Figura 25 - Exemplos das fotografias tiradas às placas de meio sólido diferencial: a) mudança de cor no meio púrpura por <i>C. utilis</i> , b) crescimento em meio verde por <i>S. cerevisiae</i>	61
Figura 26 - Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
Figura 27 - Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com <i>Candida tropicalis</i>	64
Figura 28- Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com <i>Candida utilis</i>	65
Figura 29 - Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com <i>Pichia anomala</i> . .	66
Figura 30 - Curvas de consumos do processo de desacidificação em meio líquido: a) com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> seguida de adição de <i>Pichia stipitis</i> b) com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> seguida de filtração e adição de <i>Pichia stipitis</i>	68
Figura 30- Fermentação da solução de açúcares a pH 7,0 (linhas a cheio) e pH 5,8 (linhas a tracejado).	70
Figura 31- Fermentação em meio suplementar (MS) e 0% de licor.	82
Figura 32 - Fermentação com 20% de licor.....	82
Figura 33 - Fermentação com 40% de licor.....	83
Figura 34 - Fermentação com 60% de licor.....	83
Figura 35 - Fermentação com 40% de licor em biorreactor	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades da Gasolina em comparação com o Bioetanol (Adaptado de <i>European Biomass Industry Association</i>).....	9
Tabela 2 – Composição química da madeira (compostos principais).	20
Tabela 3 – Composição do meio YM.	29
Tabela 4 – Composição do meio MS.	29
Tabela 5 – Composição das soluções base que permitiram preparar os diferentes meios de cultura selectivos sólidos.....	30
Tabela 6 – Esquema das composições das fermentações em % (v/v).....	34
Tabela 7 – Tabela resumo dos ensaios feitos para a hidrólise enzimática.	41
Tabela 8 – Tabela resumo dos ensaios feitos com a solução de açúcares recolhida das colunas de permuta iónica.	44
Tabela 9 – Composição do Hardwood Spent Sulfito Liquor (HSSL) de <i>Eucalyptus globulus</i> ao sulfito ácido.	47
Tabela 10 – Composição dos meios de fermentação sintéticos (concentrações em gL ⁻¹).48	
Tabela 11 – Composição das fermentações em Erlenmeyer em termos de concentração (gL ⁻¹).	50
Tabela 12 – Composição inicial das fermentações e dados das curvas de crescimento.	51
Tabela 13 – Tabela resumo dos resultados de consumos e produção das fermentações em Erlenmeyers.....	51
Tabela 14 – Tabela resumo da fermentação feita em biorreactor com 40% (v/v) de licor.53	
Tabela 15 – Resultados obtidos por análise elementar	54
Tabela 16 – Composição do licor no início e final da destilação por arrastamento de vapor.	57
Tabela 17 – Resultados do crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo com açúcares e 6,0gL ⁻¹ de ácido acético.....	59
Tabela 18 – Resultados do crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo com açúcares e 8,0gL ⁻¹ de ácido acético.....	60
Tabela 19 – Resultados de crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo sem açúcares e 6,0gL ⁻¹ de ácido acético.....	61
Tabela 20 – Resultados de crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo sem açúcares e 8,0g/L de ácido acético.....	62
Tabela 21 – Tabela resumo das fermentações com leveduras desacidificantes.....	66
Tabela 22 – Composição da solução de açúcares recolhida a partir de separação iónica do licor por resinas catiónica e aniónica.....	69

Tabela 23- Resumo das fermentações com a solução de açúcares a diferente pH. 70

LISTA DE ABREVIATURAS

GEE – Gases com Efeito de Estufa

PNAC – Plano Nacional de Alterações Climáticas

FT-IR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

HPLC – Cromatografia Gasosa de Alta Eficiência

YM – Yeast Medium

MS – Meio Suplementar

HSSL – Hardwood Spent Sulfite Liquor

NRRL –Northern Regional Research Laboratory (Illinois, USA)

PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection

UV/Vis – Espectroscopia de Ultravioleta/Vível

μ_0 – taxa específica de crescimento

Yp/s- rendimento (gramas de produto/ g de substrato consumido)

Qp_{max} – produtividade máxima (g de produto formado/ L meio fermentado x hora)

1. INTRODUÇÃO

O recurso a biocombustíveis em alternativa aos combustíveis fósseis tem sido cada vez mais uma das grandes prioridades a nível mundial em termos económicos e ambientais. Em países como os Estados Unidos ou o Brasil, o bioetanol é já uma realidade bastante bem estruturada e com uma produção cada vez maior. No entanto, este biocombustível é classificado de 1ª geração, ou seja, são cultivadas culturas como a beterraba e o milho com a finalidade quase exclusiva de produzir bioetanol por fermentação.

Neste trabalho pretende-se precisamente evitar este processo, que levaria a longo prazo, à distorção de valores de mercado destes bens alimentares. Deste modo, pretende obter-se etanol a partir de um subproduto da indústria papelreira e assim desenvolver biocombustível de 2ª geração, ou seja, de produtos não comestíveis. A grande vantagem deste processo é o baixo custo que o substrato apresenta para a indústria o que se torna vantajoso em casos de rendimentos etanólicos elevados, em que o custo de produção final será mais baixo

A Indústria Papelreira envolvida nesta cooperação – Caima, SA., produz pasta branca para o fabrico de papel de acordo com o método de cozimento ao sulfito ácido de *Eucalyptus globulus* produzindo, para além da pasta, um licor denominado Licor de Cozimento ao Sulfito Ácido (Hardwood Spent Sulfite Liquor ou HSSL). É este licor, rico em pentoses, que se pretende ser valorizado e, por fermentação com leveduras, obter o bioetanol.

Na primeira parte do trabalho foi então escolhida e aplicada em vários processos de fermentação, quer em Erlenmeyer quer em biorreactor, a levedura *Pichia stiptis* Y-7124 por ser conhecida como uma das melhores leveduras fermentadoras de pentoses. No entanto, à medida que foram sendo avaliados os resultados das fermentações concluiu-se que o licor apresentava alguns compostos inibidores que teriam que ser minimizados ou removidos. A segunda parte do trabalho teve então como principal objectivo a remoção precisamente destes compostos, nomeadamente do ácido acético, lenhosulfonatos e compostos fenólicos, optimizando desse modo o rendimento de etanol produzido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

A União Europeia está longe de ser auto-suficiente em energia e na Europa dos 23, a dependência de produtos energéticos está estimada em cerca de 50%, essencialmente em petróleo, gás natural e carvão.

No entanto, esta tendência para a dependência energética aumentou com a entrada dos novos países da adesão e poderá atingir os 70% nos próximos 20 a 30 anos, se não tornarmos mais competitiva a produção interna de energia (nuclear e renovável) e se não utilizarmos a energia de uma forma mais racional (conservação e eficiência).

O sector dos transportes é responsável por mais de 30% do consumo final de energia na EU e depende 98% de produtos petrolíferos, sendo responsável pela emissão de quase mil milhões de toneladas de CO₂ (um terço das emissões totais).

Os desafios europeus neste sector vêm com a substituição de uma parte dos combustíveis fósseis convencionais (gasóleo e gasolina) por combustíveis alternativos eliminando o chumbo e o enxofre nesta área [1].

O termo biocombustível engloba todos os combustíveis (sólido, líquido ou gás) produzidos a partir de organismos vivos ou de subprodutos metabólicos e que tenham origem em materiais renováveis [2]. Com os biocombustíveis estão sempre associados conceitos de sustentabilidade, redução do efeito de estufa devido à diminuição de emissões gasosas, desenvolvimento regional, social e agrícola.

Teoricamente um biocombustível pode ser produzido a partir de qualquer fonte de carbono, no entanto a mais comum tem sido as plantas fotossintéticas que capturam a energia solar. Esta biomassa tem sido reconhecida como a maior fonte de energia renovável para suprimir o declínio das fontes fósseis. É de facto uma reserva atractiva essencialmente por três razões. Primeiro, por ser renovável e conseqüentemente, sustentável a um desenvolvimento futuro. Segundo, porque demonstra propriedades ambientais positivas muito boas tais como baixos níveis de CO₂ e enxofre nas suas várias formas. Terceiro, aparentemente o potencial económico é bastante significativo relativamente ao aumento sucessivo dos preços dos combustíveis fósseis no futuro [3].

Os biocombustíveis trazem então várias vantagens:

- São facilmente conseguidos a partir de diversas fontes de biomassa;
- São biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade [3];

- Permitem a mistura, em pequenas percentagens, com os combustíveis actualmente utilizados sem perda das características destes;
- Não implicam alterações dos motores dos veículos actuais, se misturados em pequenas percentagens;
- Não há alterações profundas na logística de distribuição de combustíveis, uma vez que se podem aproveitar as existentes, sem custos adicionais ou muito reduzidos para os postos de abastecimento;
- A produção de biocombustíveis poderia ser completamente feita a partir de biomassa produzida na própria EU até cerca de 8%;
- A sua combustão é neutra em relação ao CO_2 , pois o carbono contido na biomassa foi capturado na atmosfera (Figura 1).

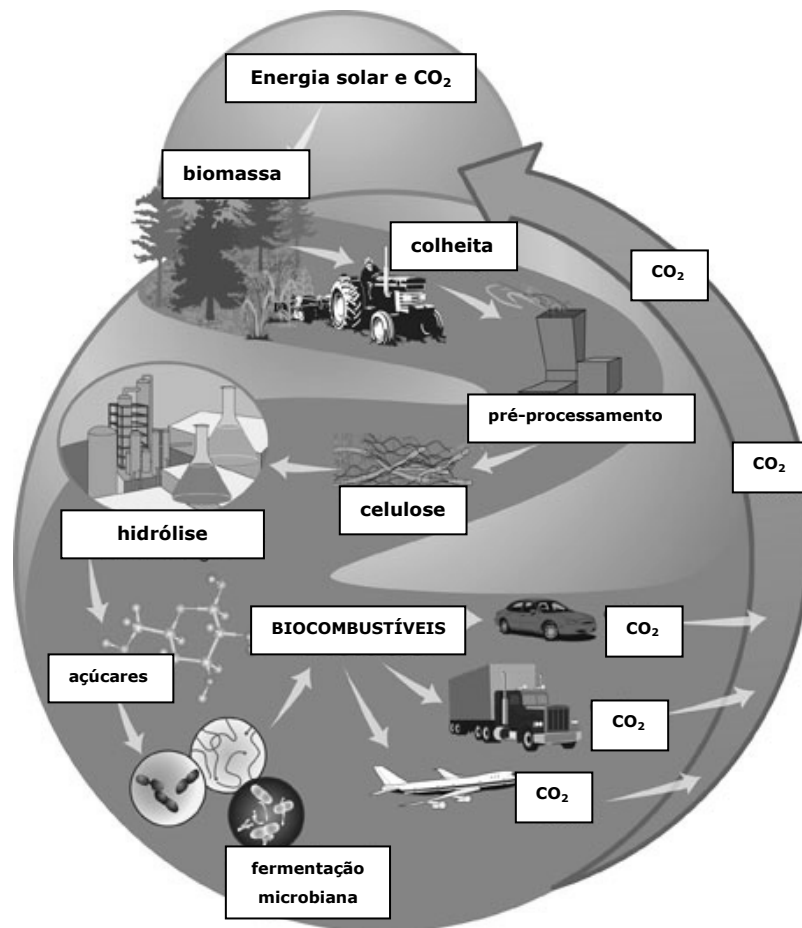


Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de CO_2 na utilização de biocombustíveis [4].

No entanto, há ainda a salientar alguns inconvenientes:

- Neste momento ainda são caros, em relação aos combustíveis convencionais que substituem, sobretudo em cenários de petróleo barato;
- Há uma reduzida disponibilidade de terreno agrícola para o cultivo de matérias-primas;
- Há já uma distorção dos valores de mercado de bens alimentares agrícolas e um risco dessa mesma distorção aplicada também aos produtos com origem na floresta (indústria papelreira e de aglomerados) face a uma potencial concorrência [1].

2.1.1 Biocombustíveis em Portugal

Em Portugal o Quadro Legal regula-se entre outros, pelo Decreto-Lei nº62/2006 que transpõe para a Directiva nº2003/30/CE e que cria mecanismos para promover a colocação no mercado de quotas mínimas de biocombustíveis. Esta prevê a celebração de acordos para a utilização de biocombustíveis em frotas de transportes públicos e ainda introduz o conceito de pequeno produtor com vocação para o aproveitamento de matérias residuais ou para a utilização de processos inovadores para o desenvolvimento tecnológico de produtos menos poluentes [1]. Na Figura 2 está representada a previsão da evolução do consumo de biocombustíveis em Portugal até 2010:

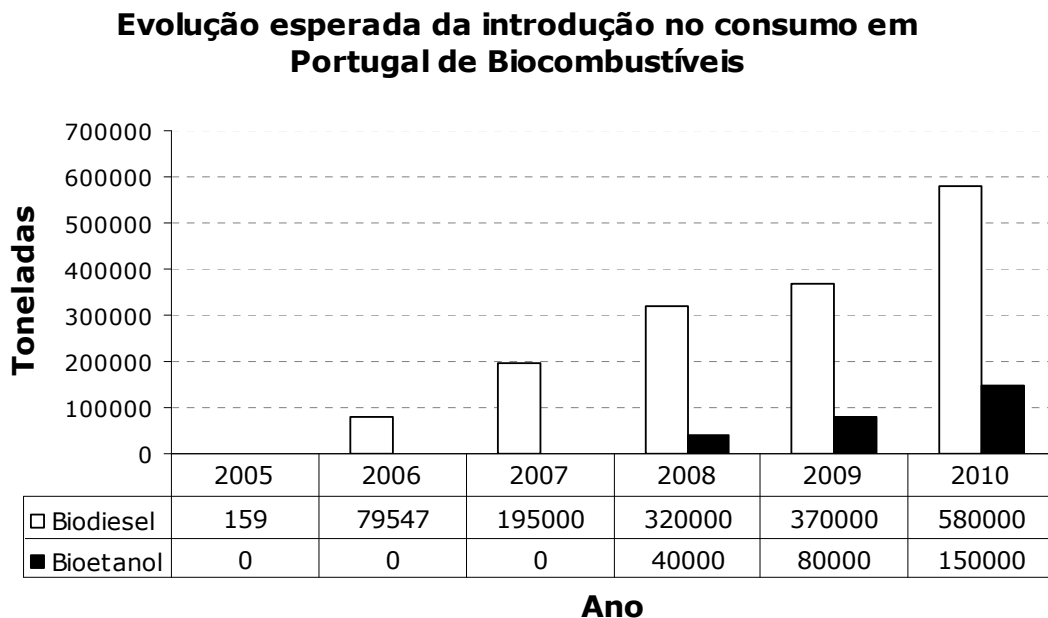


Figura 2 – Evolução do Consumo de Biocombustíveis em Portugal [1].

O sector dos transportes em Portugal é a segunda maior fonte de GEE (Gases com Efeito de Estufa) e representam cerca de 30% das emissões nacionais. O sector rodoviário representa 80% [1].

A Resolução do Conselho de Ministros n.º 119/2004, de 31 de Julho, estabeleceu, mediante a adopção do Programa Nacional para as Alterações Climáticas (PNAC 2004), as medidas tidas como adequadas para que Portugal viesse a atingir as metas que lhe estão fixadas no âmbito do Protocolo de Quioto (PQ) e do Acordo de partilha de responsabilidades da União Europeia.

Nos termos desse Acordo (Decisão n.º 2002/358/CE, de 25 de Abril) estão definidas metas diferenciadas para cada um dos Estados-Membros da União Europeia de modo a não pôr em causa a meta comunitária de 8% de redução global das emissões de gases com efeito de estufa (GEE) no primeiro período de cumprimento do PQ (2008-2012) face aos valores de 1990. Através desse Acordo, Portugal obrigou-se a limitar, nesse período, o aumento das suas emissões de GEE em 27% sobre o valor verificado em 1990 [5].

2.1.2 O caso do Bioetanol

O etanol ou álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) produzido a partir de materiais celulósicos é uma das soluções com vista à redução do consumo excessivo de crude e como consequência o aumento da poluição ambiental.

Ao contrário da gasolina, o etanol é um combustível oxigenado que contém 35% de oxigénio, o que reduz as emissões de NO_x levando a uma maior eficiência e portanto resultando numa combustão mais limpa a temperaturas relativamente baixas.

Consideram-se duas categorias principais: o bioetanol de primeira geração, fabricado a partir de matérias vegetais produzidas pela agricultura (beterraba, trigo, milho, colza, girassol, cana-de-açúcar) e que entram em concorrência com culturas alimentícias; e de segunda geração, produzido a partir da celulose e de outras fibras vegetais presentes na madeira ou apenas de subprodutos do seu processamento ou ainda das partes não comestíveis dos vegetais [6].

Actualmente este combustível é obtido essencialmente por fermentação de açúcares, amidos ou de biomassa celulósica. A produção comercial mais abundante é feita a partir da cana-de-açúcar (Brasil), da beterraba e do milho (EUA). O processo a

partir de biomassa celulósica normalmente requer pré-tratamentos o que encarece o produto [7].

Como representado no gráfico da Figura 3, a produção europeia de bioetanol atingiu as 309 500 toneladas em 2003. Com 18 0000 a Espanha é o produtor líder devendo o sucesso também à ausência de impostos cobrados pela utilização deste tipo de combustível.

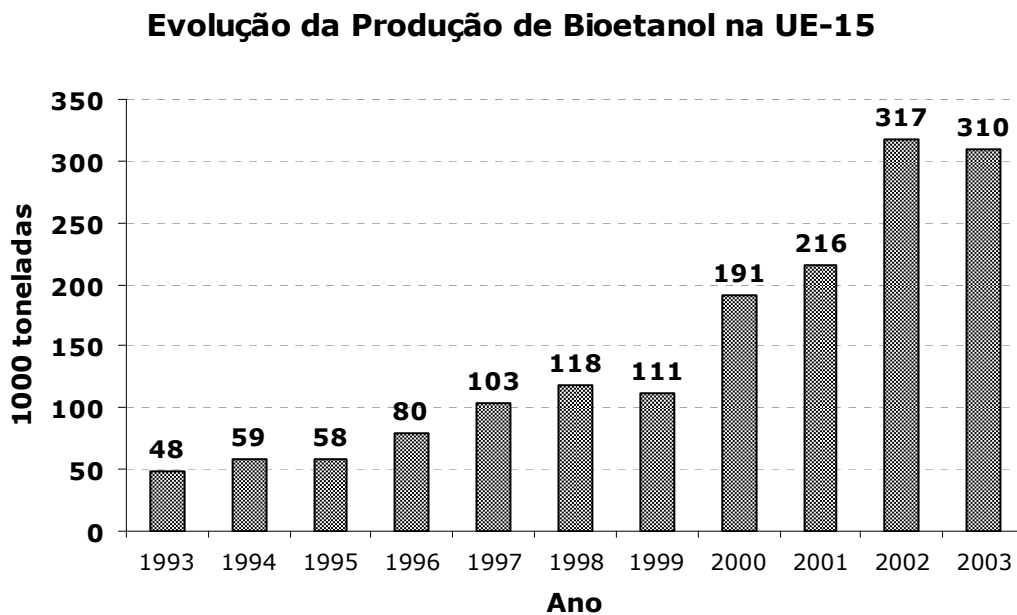


Figura 3 – Evolução da produção de bioetanol na UE-15 [8].

O bioetanol apresenta então várias propriedades como biocombustível (resumidas na Tabela 1):

- Conteúdo energético mais baixo do que a gasolina, o que significa que para um dado volume de combustível o rendimento do veículo é maior;
- O número de octanas é maior, o que aumenta a eficiência do combustível no motor;
- O elevado conteúdo em oxigénio resulta numa combustão mais limpa;
- A sua evaporação é lenta, logo a concentração no ar é baixa e portanto reduz o risco de explosão – parâmetro indicado pela Pressão de Vapor de Reid [8];

Tabela 1 – Propriedades da Gasolina em comparação com o Bioetanol (Adaptado de *European Biomass Industry Association*).

Propriedades	Gasolina	Bioetanol
Peso Molecular (kg/kmol)	111	46
Densidade (kg/L) a 15°C	0,75	0,80-0,82
Conteúdo em Oxigénio (wt-%)	-	34,8
Número de Octanas	97	109
Número de Cetanas	8	11
Ar/Combustível(kg ar/kg combustível)	14,7	9,0
Temperatura de Ebulição (°C)	30-190	78
Pressão de Vapor Reid (kPa) a 15°C	75	16,5

Para além das vantagens de utilização como biocombustível pode ser usado também na indústria de cosméticos, farmacêuticos e claro, na indústria alimentar. Aproximadamente 9% do etanol ainda é produzido sinteticamente, no entanto, os outros 91% já são produto de fermentações [7].

2.2 MICRORGANISMOS

2.2.1 Microbiologia do Género *Pichia*

A *Pichia stipitis* é conhecida pela sua capacidade de fermentar pentoses, nomeadamente xilose, mais do que qualquer outra levedura, em condições de microarejamento, pois a sua actividade fermentativa é induzida em resposta à limitação de oxigénio [9]. É assim uma espécie anaeróbia facultativa que aumenta o seu metabolismo de produção de etanol na presença de condições microaerofílicas [10,11].

A sua reprodução é assexuada normalmente por gemulação lateral (Figura 4a). Quanto à morfologia, as células são esféricas, elípticas ou alongadas com cerca de 2,2 a 6µm (Figura 4b). O seu crescimento em meio sólido ocorre em apenas 3 dias a 25-28°C, aos pares ou individualmente, apresentando uma cor bege suave e um aspecto cremoso [12].

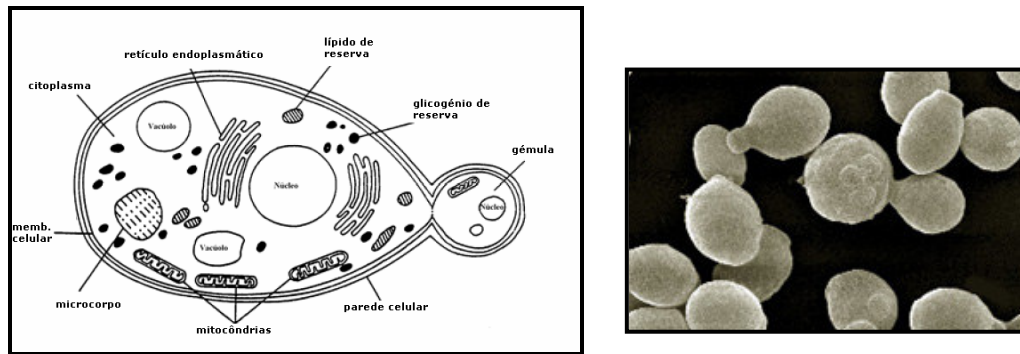


Figura 4 – Célula típica de levedura: a) esquema representativo b) fotografia ao microscópio electrónico (Adaptado de Rocha, C.M.R, 1996).

2.2.2 Leveduras Desacidificantes

As leveduras capazes de sobreviver em ambientes ácidos na presença de ácidos orgânicos fracos estão normalmente associadas a problemas de contaminação alimentar, uma vez que estes compostos são frequentemente utilizados como conservantes químicos na indústria alimentar [13].

Este tipo de leveduras são encontradas principalmente em fermentações malolácticas estando presentes por exemplo nos mostos de vinhos, convertendo o ácido málico a láctico, e assim reduzindo a acidez do vinho [14].

As espécies gentilmente cedidas pela Portuguese Yeast Culture Collection foram: *Candida tropicalis* PYCC 3097, *Candida utilis* PYCC 2541, *Kluyveromyces marxianus* PYCC 3886^T, *Zygosaccharomyces baillii* PYCC 5167^T, *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072 e *Pichia anomala* PYCC 4121^T.

Para escolha das leveduras desacidificantes são feitos meios de cultura selectivos planeados de acordo com a diferente capacidade de crescimento que as diferentes espécies apresentam em meio mineral com substrato simples (ácido carboxílico fraco) ou com substratos misto (açúcar e ácido carboxílico fraco) como únicas fontes de carbono e energia [13]. A concentração bem como a manipulação do pH do meio, associada à incorporação de um indicador ácido-base, permite seleccionar condições para aplicação destas espécies nas diferentes situações práticas.

2.3 PROCESSO FERMENTATIVO

2.3.1 Bioquímica da Fermentação Etanólica

As fermentações mediadas por leveduras ou bactérias como microrganismos fermentativos usam normalmente cinco monossacarídeos dos mais abundantes: glucose, xilose, manose, galactose e arabinose, convertendo-os directa ou indirectamente a etanol [7].

Este processo com aplicações industriais envolve sempre: a) obtenção de açúcares fermentáveis, b) fermentação desses açúcares a bioetanol e c) separação e purificação do etanol, normalmente por destilação [15].

É sabido que as hexoses são os monossacarídeos mais facilmente fermentáveis, no entanto, há estirpes específicas para a fermentação de pentoses, como é o caso da *Pichia stipitis*, da *Pachysolen tannophilus*, da *Candida shehatea* ou das bactérias *Zymomonas mobilis*. Sob condições de microarejamento a *C. shehatea* e a *Pichia stipitis* são as mais rápidas no consumo da xilose e as que levam a maiores conversões em etanol [16]. A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria que tem sido descrita como alternativa à utilização de leveduras, apresentando como vantagens principais uma taxa específica de consumo de açúcares muito elevada, baixa produção de biomassa, tolerância a elevadas concentrações de etanol [17,18] e não necessita de controlo de oxigénio para manutenção da viabilidade celular [19].

Há ainda referência a fungos como o *Rhizopus oryzae* que além de crescerem em meios como o licor ao sulfito ácido, assimilam a glucose, a manose, a xilose e o ácido acético para produção de etanol. No entanto, além de ser necessário um bom suplemento do meio com vários sais de amónia, cálcio e magnésio, quando as fontes de carbono se esgotam do meio, o fungo assimila todos os metabolitos produzidos como o etanol, o glicerol ou o ácido láctico [20].

De um modo geral, a fermentação é um processo de obtenção de energia que a célula procariótica realiza em ambiente anaeróbico. No caso das leveduras, o processo de conversão de glucose a piruvato dá-se via glicolítica, que mais tarde é então convertido a etanol por redução do acetaldeído (Figura 5). Esta combinação de glicólise e produção de etanol é então chamada de fermentação etanólica e tem um rendimento energético final de 2 ATP [21].

De um modo geral a fermentação da glucose traduz-se em [7]:



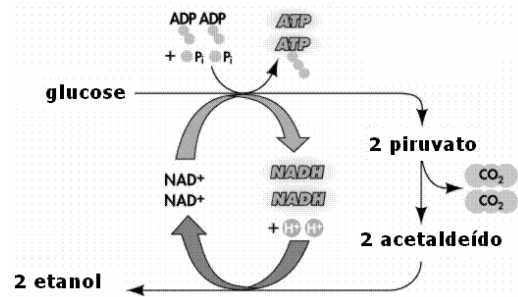


Figura 5 – Esquema representativo do processo de fermentação etanólica a partir de glucose

Mas a utilização de pentoses é de facto a mais valia deste tipo de leveduras, o que vai ao encontro da composição do meio a fermentar.

A assimilação de pentoses foi referida pela primeira vez em 1959 por Karczewska, mas o metabolismo de conversão de xilose a xilulose apenas foi comprovado em 1960 por Chiang and Knhigt e por sua vez, a fermentação a etanol apenas nos anos 80 por vários autores [11].

A xilose é inicialmente transportada através da membrana plasmática onde aí é transformada em xilulose 5-P. Vários sistemas de transporte deste monossacarídeo têm sido propostos, mas a *Pichia stipitis* assimila-a por simporte de protões, ou seja, um mecanismo altamente dependente do pH e que pode ser inibido pela assimilação de outros açúcares, precisamente pela competição por protões [22].

As duas vias pelas quais a xilose é convertida em xilulose estão esquematizadas na figura 6:

Para a conversão de xilose a xilulose as leveduras usam dois passos que envolvem reacções de oxidação-redução. A primeira enzima a interferir é a xilose reductase que converte a xilose a xilitol. Este pode ser excretado da célula ou ainda oxidado a xilulose pela xilulose desidrogenase. Na *Pichia stipitis*, sob condições anaeróbicas, a primeira reacção pode ocorrer quer na presença de NADPH ou NADH [23]. Assim, o NAD⁺ é regenerado e a acumulação de xilitol é muito baixa, seguindo-se a conversão para etanol.

A via que segue por acção da xilose isomerase é mais utilizada no caso das bactérias e necessita da presença de Mn²⁺, Co²⁺ ou Mg²⁺.

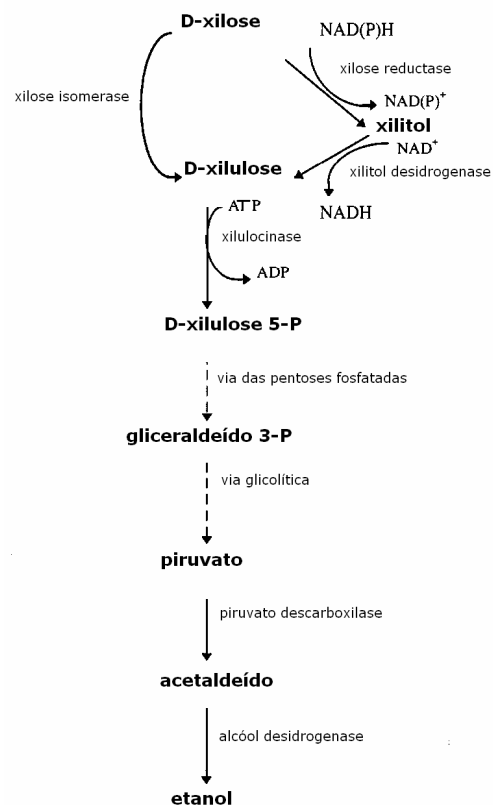
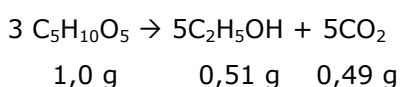


Figura 6 - Vias metabólicas de conversão de xilose a xilulose e consequente conversão de xilulose a etanol

Uma vez convertida em xilulose, o metabolismo continua com uma reacção de fosforilação. A reacção é catalisada por uma xilulocinase que converte a xilulose a xilulose 5-P. O pH óptimo desta enzima na *P. stipitis* é referido como 7,0 e geralmente requer Mn^{2+} . A xilulose 5-P é depois metabolizada a intermediários glicolíticos como o gliceraldeído 3-P e a frutose 6-P pela via das pentoses fosfatadas. Estes intermediários são então convertidos a piruvato pela via Embden Meyerhof Parnas (EMP) ou Entner Doudoroff (ED), que por sua vez sofre a acção da piruvato descarboxilase e é convertido a acetaldeído e posteriormente reduzido a etanol.

Em resumo, e com base no esquema explicado acima vem a equação geral:



Esta equação assume que a xilose é convertida em xilulose, sem acumulação de xilitol, que a xilulose 5-P é convertida a frutose 6-P e gliceraldeído 3-P sem reciclagem oxidativa ou desequilíbrios de cofactores, que a glucose 6-P e o gliceraldeído 3-P são convertidos a etanol via EMP, sem perda de acetato para o ciclo de Krebs e ainda que a biossíntese é negligível. O rendimento teórico é então de 1,67 mol de etanol por mol de xilose, ou em termos de massa 0,51 g de etanol/g xilose [11].

De modo a otimizar este rendimento em etanol, vários microrganismos têm sido geneticamente manipulados e seleccionados ao longo das duas últimas décadas. Os maiores sucessos em bactérias têm-se verificado em *E.coli*, *K. oxytoca* e *Z. mobilis* [24, 25] e em leveduras em *S. cerevisiae*, que naturalmente fermenta apenas hexoses e em *C. utilis* [26]. No entanto, a nível industrial este é um processo pouco viável, uma vez que as alterações genéticas introduzidas se vão perdendo ao longo das gerações, o que interrompe processos contínuos não sendo de todo aconselhável.

O desempenho das leveduras quanto ao maior ou menor rendimento de etanol está dependente de um determinado número de factores incluindo o arejamento. No caso da *Pichia stipitis* a produção de etanol ocorre apenas sob condições microaerofílicas [27]. Segundo Skoog and Hanh-Hägerdal, 1990 a produtividade específica de etanol máxima nestas condições é 0,20 g de etanol por g de peso seco e por hora e o rendimento 0,48 g etanol/g açúcar fermentável a uma taxa de transferência de oxigénio de 1 mmol/L. h. Com a diminuição do oxigénio do meio verificou a acumulação de vários intermediários como a glucose 6-P, com a conseqüente redução da concentração de piruvato assim como a redução da velocidade de consumo da xilose. Com excessivo arejamento há oxidação do etanol e das células microbianas [28].

Outros factores que influenciam a produção de etanol pela *Pichia stipitis* são a composição do meio, o pH e a temperatura. O meio deve ser muito bem formulado e suplementado com minerais e fontes de azoto [29]. O pH deve ser moderado (6,5-7,0) assim como a temperatura para permitir a acumulação de etanol [28]. Quanto ao crescimento, sabe-se que a *Pichia* cresce em apenas 3 dias em meio sólido e que a sua fase exponencial em meio líquido tem cerca de 20h. No entanto, as referências a meios de fermentação com este licor de cozimento ao sulfito ácido ou outro tipo de hidrolisados de origem lenhocelulósica indicam a presença de inibidores e até a acumulação de metabolitos que possam diminuir a sua taxa específica de crescimento [30-35].

A inibição do crescimento celular pela produção de etanol varia com a sua concentração e com a temperatura. A *P. stipitis* sabe-se que é inibida a concentrações relativamente baixas (34 g/L) quando comparada com a sua produção máxima (45-48 g/L). Uma descida de temperatura pode levar a um aumento de tolerância de etanol. O máximo já obtido para esta espécie antes da sua completa inibição foram 65 g/L a 25°C.

As razões para a inibição por etanol prendem-se essencialmente com a acumulação de acetaldeído e acetato por oxidação do etanol e com alterações nas membranas celulares que podem ser minimizadas com a adição de Tween 80, ergosterol ou ácido linoléico para aumentar a sua fluidez.

2.3.2 Cinética de Fermentação

O objectivo de qualquer processo biotecnológico é usar sistemas biológicos que maximizem a eficiência da utilização de substrato, aumentando os lucros da indústria onde está implementado. Assim, o processo fermentativo deve procurar um compromisso entre a produtividade volumétrica e a concentração final de produto, mantendo o rendimento de conversão de substrato em níveis aceitáveis.

Para atingir estes objectivos, os sistemas de culturas celulares devem ser descritos quantitativamente, ou seja, a cinética do processo deve ser conhecida. Só assim, se podem prever o rendimento e o tempo de fermentação, assim como a dimensão correcta do processo a nível industrial. Na prática, todos estes estudos são

primeiro efectuados em reactores de pequena escala passando depois para escala piloto e, se realmente promissor, para um "scale-up" industrial.

Para determinar a evolução ao longo do tempo da concentração de um componente celular, da concentração de células ou da biomassa em suspensão em meio de crescimento líquido, é necessário obter a curva experimental de crescimento da população microbiana e calcular a taxa específica de crescimento do microrganismo em questão nas condições de crescimento testadas num processo descontínuo.

Na Figura 7 podem distinguir-se 4 fases do crescimento microbiano, que se aplicam ao crescimento de leveduras.

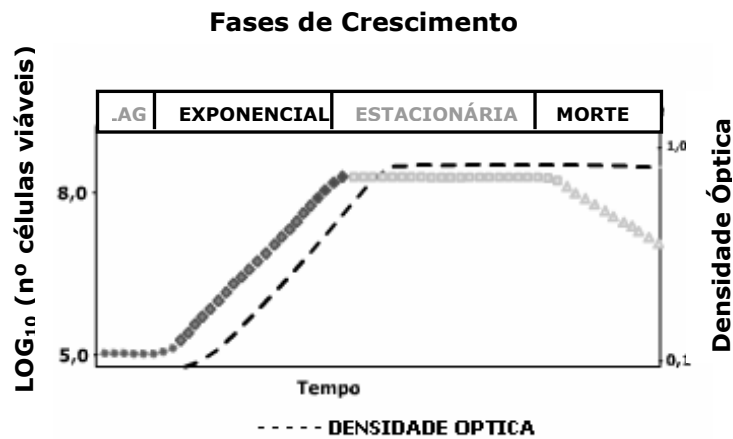


Figura 7 – Curva de crescimento microbiano.

A fase lag ou de latência ocorre logo a seguir à inoculação do meio de cultura, onde as células do microrganismo têm normalmente que se adaptar ao novo meio. Durante este período inicial, pode não ocorrer multiplicação celular, no entanto verifica-se, por exemplo, a síntese de novas enzimas. Estas podem ser necessárias à síntese de compostos essenciais ao crescimento ou à hidrólise ou à metabolização dos compostos presentes como fontes de carbono, azoto, etc. Esta fase dita de latência pode ter uma duração mais ou menos extensa consoante o estado fisiológico da cultura usada como inóculo e as condições de crescimento. Por exemplo, a presença de uma percentagem elevada de células não-viáveis no inóculo, um meio de cultura contendo um nutriente essencial difícil de metabolizar ou a incubação em condições ambientais de stress a que o organismo não se encontra adaptado, conduzem normalmente a fases de latência extensas.

A fase exponencial é a fase que se segue e onde após um período de aceleração, a taxa de crescimento da população microbiana se torna constante, isto é, as células

sofrem divisão e o seu número duplica após um determinado intervalo de tempo. Durante esta fase, em que todos os nutrientes estão presentes em excesso, os microrganismos dividem-se e a população cresce com uma taxa específica de crescimento máxima (μ_0) que depende do potencial genético do microrganismo, da composição do meio de cultura e das condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc.). No período de desaceleração ocorre um declínio da taxa específica máxima de crescimento, em resultado da diminuição para valores limitantes do crescimento da concentração de um (ou mais) nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou do aumento da concentração de produtos do metabolismo tóxicos para as células.

Na fase estacionária o esgotamento de um nutriente e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo leva a que a divisão da população pare. No entanto, em carência de nutrientes, as células podem manter-se viáveis durante períodos de tempo mais ou menos longos, à custa das reservas endógenas, que usam em processos de manutenção. Contudo, mais cedo ou mais tarde, verifica-se um declínio da concentração de células viáveis durante a fase de morte celular.

Por fim, há a fase de morte onde ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular, o que origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana ao longo do tempo [36].

O acompanhamento deste crescimento é feito pela avaliação quantitativa da evolução da concentração celular ao longo do tempo, por meios mais ou menos directos. É um método bastante eficaz no que diz respeito à fase exponencial onde é calculada a taxa específica de crescimento de acordo com: $\frac{dX}{dt} = \mu X$.

Estas medições pressupõem um processo descontínuo, em que o inóculo é adicionado ao processo e só no fim é recuperado o produto. O reactor, depois de esterilizado, fica pronto para nova utilização.

Assim, a cinética de fermentação é essencialmente determinada pela disponibilidade de nutrientes, ou seja de substrato essencial ao metabolismo. No entanto o pH do meio e presença/ ausência de oxigénio são outros factores fundamentais. No caso da *Pichia stipitis* o pH ideal é 6,0-7,0 e o meio deve ser apenas microarejado.

2.4 FORMAÇÃO E ORIGEM DOS LENHOSULFONATOS

2.4.1 Composição Química da Madeira

A madeira é constituída principalmente por celulose, hemiceluloses, lenhina, extractáveis e cinzas. A celulose forma o esqueleto principal das células, rodeado por outras matrizes (as hemiceluloses) e material aglutinante (a lenhina).

Apesar da composição química da celulose ser conhecida em pormenor, a sua organização estrutural não está ainda bem esclarecida. Sabe-se que é um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, possuindo uma estrutura amorfo-cristalina. Grupos destas moléculas agregam-se uns aos outros e formam microfibrilas (10 a 20nm) constituídas por regiões cristalinas altamente organizadas, alternadas de regiões mais amorfas desordenadas. As microfibrilas, por sua vez, organizam-se em fibrilas que se juntam em camadas uniformes (lamelas), as quais constituem os elementos morfológicos básicos da parede celular (Figura 8). Globalmente, a proporção de celulose cristalina nas paredes celulares das fibras na madeira situa-se entre 60-70%.

Este é o maior constituinte da madeira, sendo cerca de 40 a 50% da sua matéria seca [37].

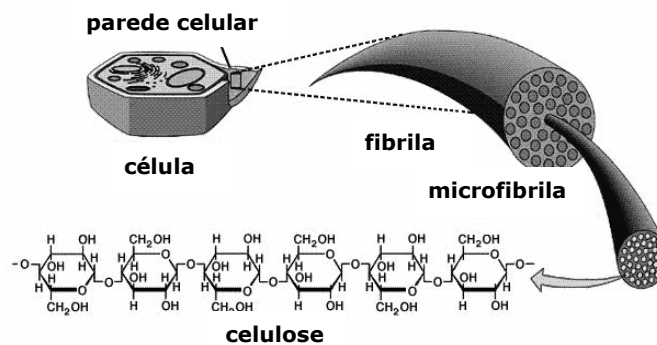


Figura 8 – Esquema da estrutura da celulose (Adaptado de Moore et al, 1998)

As hemiceluloses pertencem a um grupo de polímeros heterogêneos com funções de suporte nas paredes celulares possuindo estrutura geralmente ramificada e amorfa. Os seus monómeros são essencialmente D-glucose, D-manose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose e pequenas quantidades de L-ramnose, ácido D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico (Figura 9). A quantidade de

hemiceluloses ronda os 20 a 35% do peso seco da madeira e a sua composição e organização difere com o tipo de madeira.

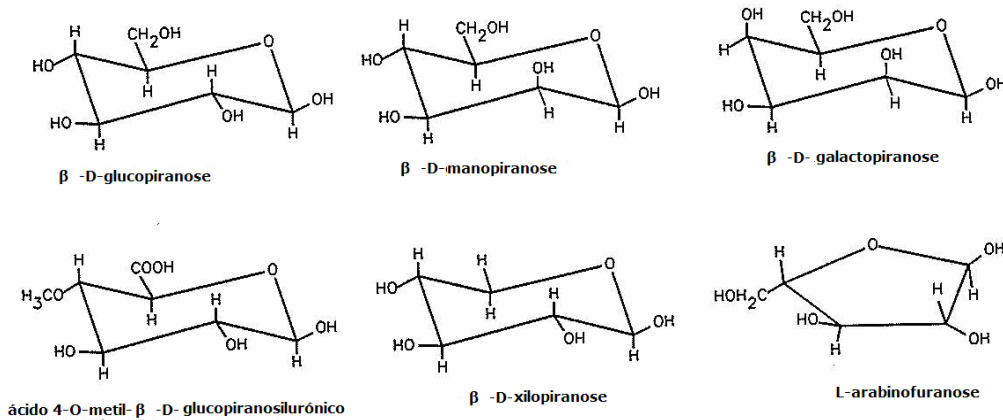
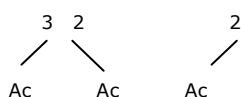
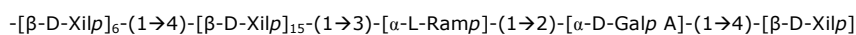
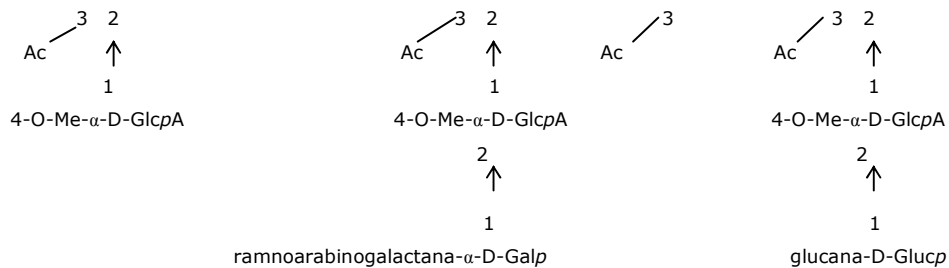
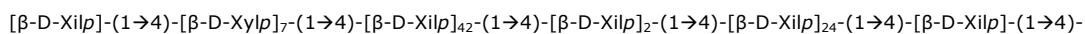


Figura 9 – Monossacarídeos principais das hemiceluloses.

A composição química da madeira das folhosas, a chamada madeira dura é diferente da madeira das resinosas, madeira mole. No caso de folhosas como o *Eucalyptus globulus* as hemiceluloses dividem-se essencialmente em:

- glucuronoxilanas (15-25%): cujo componente principal é a O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilana também chamada de glucuronoxilana ou apenas xilanas se o constituinte principal for a xilose. A sua estrutura principal consiste então em unidades de β -D-xilopiranooses ligadas em (1 \rightarrow 4). Estas unidades podem conter grupos O-acetil em C2 e C3 e resíduos de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico, MeGlc_pA ligados em O-2. No *E. globulus*, cerca de 1/3 das unidades deste ácido são substituídas em O-2 (\rightarrow 2)-MeGlc_pA-(1 \rightarrow 2)-Xyl_p). A galactose (Gal) aparece apenas na forma de unidades terminais [Gal_p-(1 \rightarrow)].

O-acetil-(4-O-metil- α -D-glucurono)-D-xilana:



Os extractáveis são compostos de diversa natureza com peso molecular relativamente baixo que, por definição, são solúveis em solventes orgânicos ou água.

Destes compostos podem fazer parte terpenos (em pequena quantidade em folhosas), terpenóides, ácidos gordos, triglicéridos e compostos fenólicos [38].

As cinzas consistem em sais de sódio, potássio, cálcio com os correspondentes aniões de carbonato, fosfato, silicato, sulfato, cloreto, etc. que permanecem após a combustão da madeira [38].

Na Tabela 2 podem comparar-se as composições relativas dos diferentes tipos de constituintes nas resinosas e folhosas.

Tabela 2 – Composição química da madeira (compostos principais).

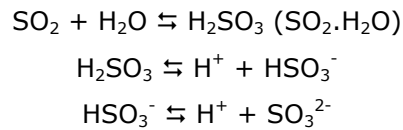
Componente	Resinosas (%)	Folhosas (%)
Celulose	35-45	40-50
Hemicelulose (Galacto)glucomanana	20-25	2-5
Xilanas	5-10	15-30
Lenhina	25-35	18-25
Extractáveis	3-8	1-5
Cinzas	0,2-0,5	0,3-0,6

2.4.2 Processo de Cozimento ao Sulfito Ácido (Sulfite Pulping)

O objectivo principal do processo de cozimento é libertar as fibras da madeira por deslenhificação com tratamentos físicos e/ou químicos. Neste processo, a lenhina é removida, de modo a que as fibras de celulose sejam facilmente separadas com tratamentos mecânicos suaves. Hoje em dia, estes tratamentos químicos mais usuais dividem-se em 2 tipos principais: sulfato (ou Kraft) e sulfito [39].

No processo ao sulfato a madeira é deslenhificada com hidróxido de sódio e sulfureto de sódio preservando a resistência das fibras e originando pastas fortes [40].

No processo sulfito (esquematizado na Figura 11) o cozimento da madeira faz-se usando uma mistura de ácido sulfuroso (H_2SO_3) e ião bissulfito (HSO_3^-) na forma de amónia, magnésio, cálcio ou sódio com os seguintes equilíbrios químicos:



Este cozimento dissolve a maioria da lenhina e algumas hemiceluloses mas deixando as fibras de celulose ainda unidas. Como o pH do processo é bastante baixo (pH=1,5-2), as reacções levam à condensação da lenhina e à decomposição do ácido do cozimento, resultando num licor com cores extremamente escuras, onde predomina também o SO_2 em solução [41].

Simultaneamente com a dissolução da lenhina, durante o processo são removidos da madeira alguns polissacarídeos. A selectividade da deslenhificação traduz precisamente a razão entre a lenhina e os polissacarídeos removidos. Uma selectividade elevada implica a perda de poucos hidratos de carbono. No início do cozimento tem-se uma perda elevada mas depois, com a contínua deslenhificação, ocorre uma abrupta subida na selectividade.

Basicamente, as reacções responsáveis pelo processo de deslenhificação são as de sulfonação (que originam grupos hidrofílicos sulfónicos na cadeia hidrofóbica da lenhina) e as de hidrólise (que quebram as ligações entre as unidades de fenilpropano, criando grupos hidroxifenólicos livres).

Os lenhosulfonatos são os produtos resultantes das quebras das ligações α -O-4 da estrutura de lenhina e posterior sulfonação das posições α e/ou γ das cadeias laterais das unidades C9. A molécula de lenhosulfonato forma um polielectrólito altamente e aleatoriamente ramificado. Em solução a molécula tem tendência a enrolar e ganhar forma redonda com os grupos sulfónicos à superfície [42].

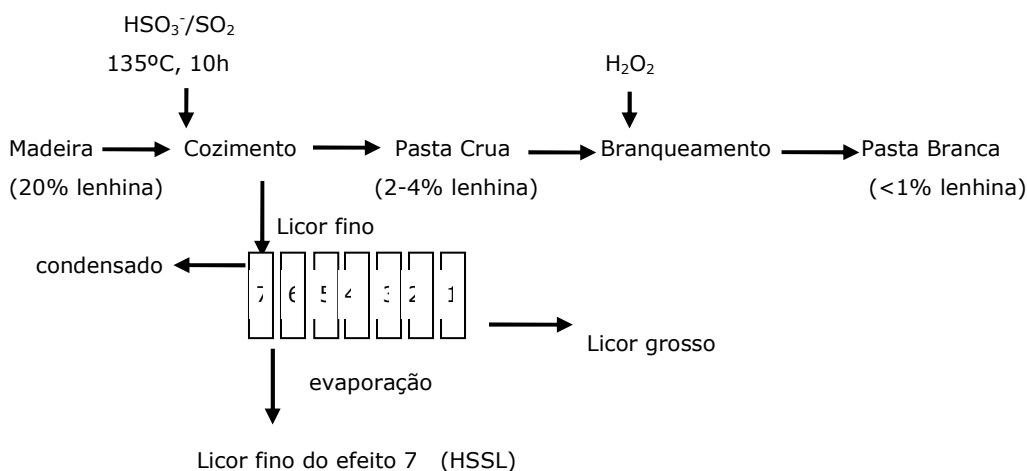


Figura 11 – Esquema de Produção da pasta de papel e formação do HSSL.

2.4.3 Degradação do Material Lenhocelulósico

O tipo de compostos tóxicos e a sua concentração no licor resultante do processo de cozimento pode influenciar as variáveis da fermentação, nomeadamente a eficiência da utilização dos açúcares fermentáveis por parte do microrganismo e levar à diminuição de produto formado.

De acordo com alguns estudos os efeitos tóxicos podem ser divididos em 4 grupos principais [30]:

- Produtos da Degradação de Açúcares (Figura 12):

Durante a hidrólise, as pentoses presentes na madeira podem degradar-se a furfural – um composto tóxico que dependendo da sua concentração no meio de fermentação, pode levar à inibição do crescimento celular e afectar a taxa específica de crescimento do microrganismo [30]. Em estudos relacionados com a produção de etanol com *Pichia stipitis*, concentrações de furfural de 0,5 1,0 e 2,0g/L reduziram o crescimento celular em 25%, 47% e 99% respectivamente. O rendimento e a produtividade decresceram também 90% e 85% [28].

Ainda da degradação das hexoses, se bem que em menor quantidade, pode formar-se hidroximetilfurfural (HMF), um composto tóxico que leva ao aumento da fase lag durante o crescimento microbiano. O crescimento da *Pichia stipitis* foi também reduzido quando estudado na presença de 0.5, 0.75 e 1.5g/L de HMF para 43, 70 e 100% respectivamente [30].

Há ainda a salientar o efeito sinérgico destes dois compostos quando combinados com outros, nomeadamente com compostos fenólicos e aromáticos derivados da degradação da lenhina e vários ácidos (acético, fórmico e levulínico). Também este efeito já foi relatado para a *P. stipitis*, e o furfural com o HMF inibem o seu crescimento celular, bem como a fermentação da xilose [30].

Pensa-se que a pH baixos, os ácidos fracos como o ácido acético são lipossolúveis e portanto, permeáveis à membrana plasmática. Aquando da sua entrada para o citosol este dissocia-se devido ao pH neutro intracelular, diminuindo assim o pH citosólico. A manutenção de um pH neutro no interior da célula é fundamental para a manutenção da viabilidade. Está demonstrado que a actividade replicativa da célula decresce linearmente com a diminuição do pH intracelular [43].

Ainda da degradação do material lenhocelulósico pode resultar outro tipo de compostos como o ácido levulínico e o ácido fórmico. A sua diferente toxicidade em relação ao ácido acético, deve-se essencialmente à diferença na permeabilidade das membranas e diferente forma aniónica que formam no interior da célula, no entanto, são também considerados como potenciais inibidores microbianos [44].

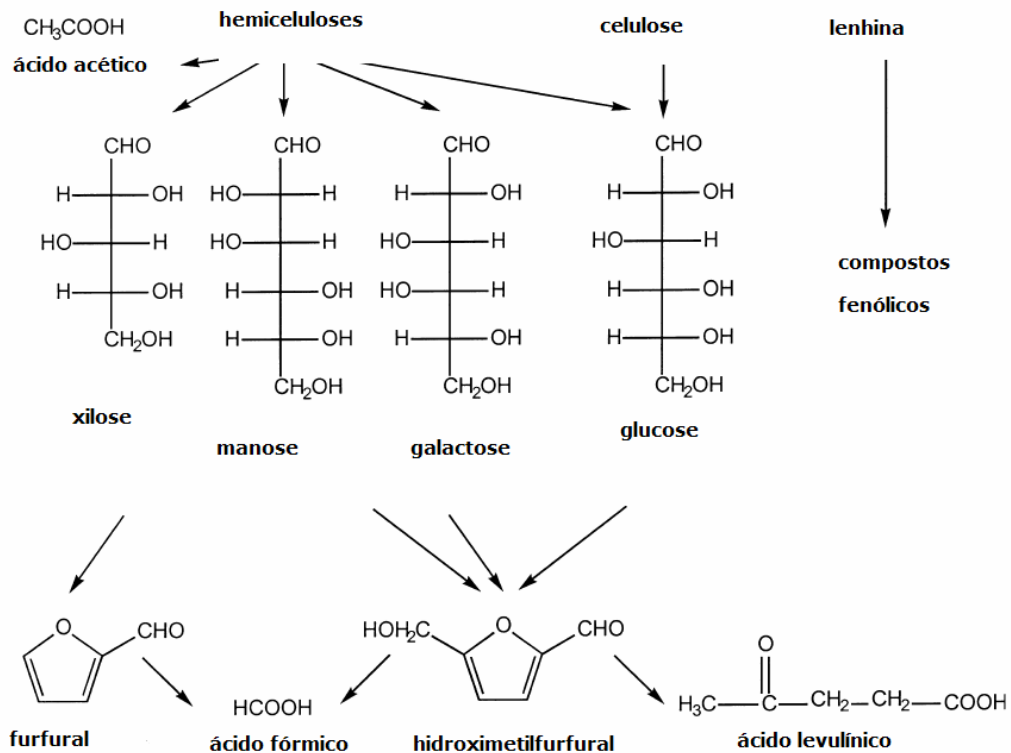


Figura 12 – Esquema da decomposição da madeira originando compostos inibidores (Adaptado de [30])

Durante a fermentação a redução do furfural a álcool furfurílico ocorre com elevada probabilidade; produto este que já foi relatado como inibidor do crescimento aeróbico da *P. stipitis* por provocar a morte celular.

- Produtos da Degradação da Lenhina:

Durante a hidrólise da lenhina são formados vários compostos aromáticos, poliaromáticos, fenólicos e aldeídicos. Os fenólicos de baixo peso molecular são os mais tóxicos uma vez que causam a perda da integridade das membranas biológicas, afectando assim a sua capacidade de servirem de barreiras e de matrizes enzimáticas. Em consequência, tanto o crescimento celular como a assimilação de açúcares são reduzidos [30] Parajó *et al* (1998) relatou ainda que, este tipo de produtos pode ser mais tóxico que o furfural ou o HMF mesmo a baixas concentrações [45]. Associado ao licor ao sulfito ácido de *Eucalyptus globulus* estão presentes 4 fenólicos principais: o ácido gálico, o pirogalol, o ácido sirínico e o ácido vanílico (representados na Figura 13). De todos, o ácido gálico é de longe o mais abundante, cerca de 68mg/ 100g matéria seca [46]. Os lenhosulfonatos são outros dos compostos produzidos durante a

deslenhificação da madeira no processo sulfito e que pensa-se estarem mesmo associados a um efeito inibitório do crescimento microbiano [47].

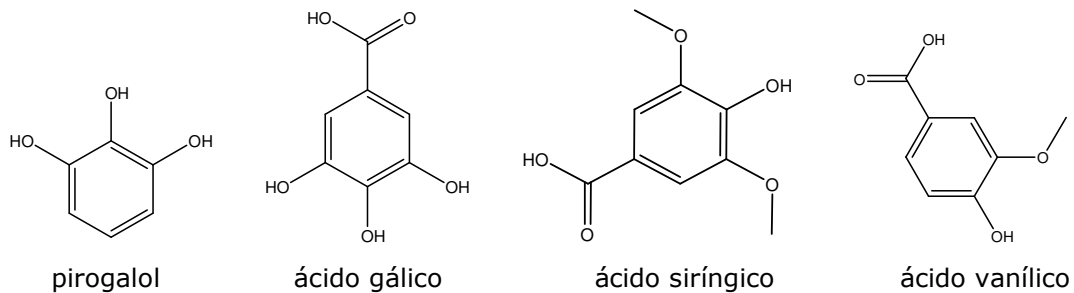
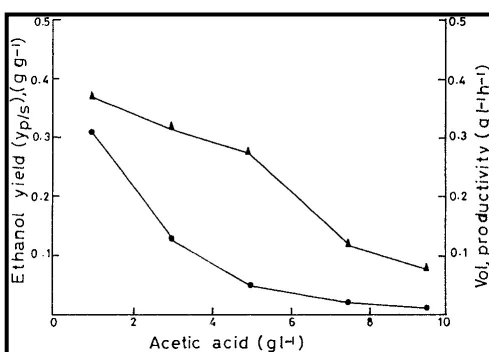


Figura 13 – Exemplos de alguns compostos fenólicos existentes no HSSL.

- Compostos Derivados da Estrutura Lenhocelulósica

Dentro da estrutura lenhocelulósica há ainda os compostos extractáveis (resinas acídicas, os terpenóides e os taninos) e o ácido acético derivado dos grupos acetil presentes nas hemiceluloses e que saem durante o processo hidrolítico.

Quando o pH do meio fermentativo é baixo, o ácido acético existe sob a forma não dissociada (porque o seu pKa é 4,75), ou seja, é lipossolúvel, e por isso difunde-se pelas membranas plasmáticas. Já no interior da célula, onde o pH é aproximadamente 7, o ácido dissocia-se e vai acumulando prótons no citoplasma. Como consequência, o pH interno das células começa a descer, inibindo a actividade celular e causando até a morte [30].



Para a *P. stipitis*, o efeito do ácido acético é dos factores mais importantes a controlar, pois para concentrações superiores a 2g/L de ácido acético, a produtividade e o rendimento começam a diminuir drasticamente, sendo que concentrações acima dos 8g/L já apresentam valores quase nulos destes parâmetros (Figura 14) [28].

Figura 14 – Influência da concentração de ácido acético na produtividade e rendimento de etanol pela *P. stipitis* [28].

- Iões de Metais Pesados:

Os iões dos metais pesados (ferro, crómio, níquel e cobre) podem ser originados por corrosão do equipamento e a sua toxicidade está associada à inibição enzimática das vias metabólicas de degradação dos açúcares por parte dos microrganismos [30].

A concentração máxima de cada inibidor que cada microrganismo pode suportar é relativa, pois tudo depende do tipo de microrganismo e seu metabolismo, a sua adaptação ao meio, o tipo de processo fermentativo, o tipo de inibidores presente, o seu efeito conjunto, etc.

1.5 REMOÇÃO DE INIBIDORES

Diversos métodos biológicos, físicos e químicos têm sido utilizados numa fase anterior ao processo fermentativo para remoção específica de inibidores fazendo parte do pré-tratamento essencial à viabilidade celular com elevados rendimento etanólicos [48].

1.5.1 Métodos Físico-Químicos

Os métodos químicos incluem tratamentos alcalinos, com aumento de pH para 9-10 com Ca(OH)_2 seguido de um reajustamento para pH 5,5 com H_2SO_4 (overliming). Este método permite a precipitação de compostos tóxicos e o aumento do pH aumenta a instabilidade dos mesmos em solução. A utilização de sulfito de sódio em conjunto com este tratamento tem sido também referida como uma vantagem na fermentação alcoólica deste tipo de substrato, aumentando a produtividade [49].

Os compostos tóxicos podem também ser adsorvidos em carvão activado [50], uma vez que é um material de baixo custo, ou em resinas de troca iónica [51]. No entanto, estes processos têm que ser economicamente viáveis no custo final do produto.

Os métodos físicos incluem essencialmente evaporação dos compostos voláteis, nomeadamente ácido acético e furfural, mas também aumentam consideravelmente a

concentração de compostos tóxicos não voláteis como os extractáveis ou os derivados da lenhina [33].

1.5.2 Métodos Biológicos

A nível biológico têm-se usado enzimas como a lacase e a peroxidase que levam a uma remoção selectiva de compostos fenólicos monoméricos por polimerização oxidativa destes compostos de baixo peso molecular [33]. Para remoção do ácido acético, ácido benzóico ou furfural de hidrolisados de hemiceluloses tem-se usado o fungo *Trichoderma reesei* [33] ou ainda outros microrganismos como é o caso de espécies geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* [30,36]. A degradação de diferentes tipos de lenhosulfonatos considerados inibidores também já foi citada para o fungo *Streptomyces viridosporus*, com remoção da ordem dos 35% [47].

A adaptação do microrganismo fermentativo ao meio é outra estratégia de fermentação importante do ponto de vista biológico, baseando-se em sucessivas fermentações que utilizam o microrganismo de cada experiência como inóculo à fermentação seguinte [30].

2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

2.1 MICRORGANISMOS – manuseamento e manutenção

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram apenas leveduras.

Para o processo fermentativo – a *Pichia stipitis* NRRLY 7124 foi fornecida pelo Laboratório NRRL liofilizada em porta-amostras. Foi transferida para um meio líquido inicial (*Yeast Medium*) apenas para ser mais facilmente homogeneizada e depois transferida para placas de Petri com meio YM sólido com agar onde ficou a crescer 3 dias a 28°C. Estas placas foram guardadas a 4°C (em frigorífico) e assim foi conservada durante todo o trabalho experimental com repicagens de 5 em 5 semanas para renovação celular.

Para o processo de desacidificação biológica foram solicitadas as seguintes leveduras à PYCC (*Portuguese Yeast Culture Collection*):

- *Candida tropicalis* PYCC 3097
- *Candida utilis* PYCC 2541
- *Kluyveromyces marxianus* PYCC 3886^T
- *Zygosaccharomyces baillii* PYCC 5167^T
- *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072
- *Pichia anomala* PYCC 4121^T

As diferentes espécies chegaram em tubos com cunhas de agar, as quais foram depois transferidas para placas de Petri, mantendo-se o mesmo método de conservação acima referido.

2.2 MEIOS DE CULTURA

2.2.1 Meios de Cultura Gerais

Para além do próprio licor, foram usados dois meios de fermentação no processo geral de manutenção e fermentação com as leveduras já mencionadas:

Yeast Medium [1]

Meio preparado em água destilada levada a quente e esterilizado em frascos SCHOTT® em autoclave a 120°C durante 22 minutos.

Tabela 3 – Composição do meio YM.

Componente	Quantidade (gL ⁻¹)
Agar (para meio sólido)	20,0
Glucose	10,0
Extracto de levedura	3,0
Extracto de malte	3,0

Meio Suplementar Líquido (MS)

Meio esterilizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL preparados com água destilada. Os sais de amónia são separados dos restantes componentes antes da esterilização a fim de evitar a precipitação dos sais. Assim, o meio é dividido em duas partes.

Tabela 4 – Composição do meio MS.

Componente	Quantidade (gL ⁻¹)
Extracto de levedura	2,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5

2.2.2 Meios de Cultura Selectivos

Uma vez que as fermentações em meio líquido são processos demorados e trabalhosos, optou-se por um método de selecção para as leveduras desacidificantes mais eficaz, em meio sólido, com indicadores incorporados. Assim, ao ser consumido o ácido acético, o pH do meio aumentava e mudava de cor. O crescimento e respectiva mudança ou ausência de mudança de cor nas placas foram monitorizados todos os dias, por fotografias e registados os resultados. Só as leveduras que realmente provocaram

mudança de cor no meio sólido, foram posteriormente usadas em fermentações líquidas com licor incorporado.

O meio de cultura utilizado para crescimento em meio sólido, foi o meio mineral com vitaminas e oligoelementos A e B (van Uden, 1967) ao qual se adicionou um indicador ácido-base e a fonte de carbono e energia, de acordo com o pH pretendido, conforme descrito na tabela 5.

Na preparação do meio escolhido a pH inicial de 4,0 ou 4,5 utilizou-se o verde de bromocresol como indicador e no caso do meio a pH inicial de 5,5 ou 6,0, o púrpura de bromocresol.

Para a preparação de meios sólidos adicionou-se agar na concentração de 2,0 % (p/v). Procedeu-se à esterilização no autoclave durante 20 minutos, a 120°C.

Os compostos utilizados como fonte de carbono e energia (glucose, xilose e ácido acético) foram preparados separadamente, na concentração adequada, ajustados ao pH desejado e esterilizados por filtração em membrana (filtros de 0,20 µm). O mesmo foi feito para as soluções de oligoelementos A e B e para a solução de vitaminas.

A mistura de todos os componentes foi feita a 50-60°C e após ajuste do pH com NaOH (10 M) ou HCl (1 M) ao valor desejado, foram adicionados os indicadores [13].

Tabela 5 – Composição das soluções base que permitiram preparar os diferentes meios de cultura selectivos sólidos.

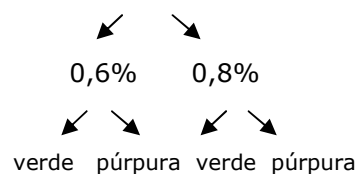
Meio base	Composição (%p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,013
Solução de vitaminas	Composição (%p/v)
Biotina	0,001
Pantotenato de cálcio	0,08
Mio-inositol	4,0
Niacina	0,16
Hidrocloreto de piridoxina	0,16
Hidrocloreto de tiamina	0,16

Soluções de oligoelementos	Composição (%p/v)
H_3BO_3 KI $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1,0 0,2 0,4
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $HCl (10^{-3}N)$	0,08 0,4 0,8 0,8 0,8 (v/v)
Indicadores	Composição (%p/v)
Verde de bromocresol (pK=4,7) ou Púrpura de bromocresol (pk=6,3)	0,005 0,005
Fontes de Carbono e Energia	Composição (%p/v)
Ácido acético Glucose Xilose	0,6 ou 0,8 0,15 ou 0,0 2,0 ou 0,0

Os meios de cultura foram preparados 2 a 4 dias antes da sua utilização. Durante este período, os meios sólidos foram conservados a 4°C já espalhados em placas de Petri estéreis.

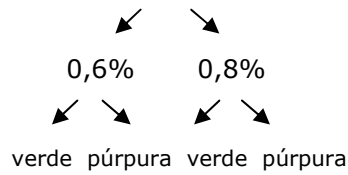
Esquemáticamente preparam-se então os seguintes meios:

Meios com Açúcares e Ácido acético



e

Meios sem Açúcar e Com Ácido Acético



2.3 ASSÉPSIA E AMOSTRAGEM

2.3.1 Assépsia

Todos os meios de fermentação são esterilizados em autoclave a 120°C durante 22 minutos, assim como todo o material a usar.

A manipulação do microrganismo é feita em câmara de fluxo laminar com ligação prévia de radiação ultravioleta, à chama e com todos os cuidados de assepsia necessários.

2.3.2 Amostragem

O licor foi recolhido directamente na indústria (Caima) do evaporador nº7, em frascos de 10L previamente esterilizados e rolhados com filtro de ar e tubagens para saída do vapor. Depois de chegados ao laboratório foram mantidos em câmara fria a 4°C e sempre que necessário para as fermentações fez-se uma transferência com bomba peristáltica *B. Braun FE 411*.

Nas fermentações as amostras foram recolhidas assepticamente com seringas estéreis na câmara de fluxo laminar. Estas amostras são para: determinação de biomassa por medição de absorvância e análise de substratos e produtos por HPLC, sendo necessária a remoção de biomassa, a fim de evitar danos no enchimento da coluna cromatográfica. Assim, foram recolhidos cerca de 1,50mL para um *eppendorff* e centrifugados a 5000 rpm durante 5 minutos em centrífuga *Eppendorf MiniSpin*. O sobrenadante foi então retirado e ainda filtrado por um sistema discal com filtros de acetato de celulose de 0,2 µm para depois ser devidamente injectado.

2.4 CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO E CRESCIMENTO

2.4.1 Pré -Tratamento do Licor

Ao iniciar a primeira fermentação directamente no licor verificou-se que a *Pichia stipitis* não cresceu, pois a turbidez do meio manteve-se constante durante as primeiras horas de fermentação. Assim, foi feito um pré-tratamento para diminuição ou remoção de compostos que estavam de facto a limitar a viabilidade celular da cultura, assim como para acertar o pH, para valores mais adequados ao crescimento da levedura.

Este pré-tratamento foi feito por precipitação seguida de oxidação. Usaram-se então hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e hidróxido de amónia (NH_4OH) para comparar qual o mais eficiente e foi borbulhado oxigénio para ambas as misturas (licor + Ca(OH)_2 e licor + NH_4OH). O uso de hidróxido de amónia revelou-se mais eficaz, uma vez que permitiu o crescimento celular e a produção de etanol, contrariamente ao que se passou quando se usou o hidróxido de cálcio. O facto de estar presente o ião NH_4^+ deve ter contribuído como fonte de azoto para a nutrição da levedura. O Ca(OH)_2 para além de não ter permitido o crescimento certamente iria causar problemas nas tubagens e fermentadores industriais por acumulação de depósitos indesejáveis.

O passo de adição de um hidróxido foi essencial para aumentar o pH do licor para valores entre 6,0-7,0 e para obter resultados mais eficientes. Esta precipitação decorreu durante 15h a 4°C. O arejamento foi feito depois de filtrado o licor, com borbulhamento de O_2 durante cerca de 45 minutos (por cada litro de licor).

Estes dois passos de precipitação e oxidação foram feitos para todas as tomas de licor usado em todas as fermentações.

2.4.2 Condições de Fermentação Líquida

Para as fermentações líquidas seguiu-se sempre o seguinte esquema de composição:

- 20% de inóculo;
- 10% de suplemento de açúcares (para manter sempre a mesma concentração independente da quantidade de licor adicionada);
- 0% a 60% de HSSL;
- 10% a 70% de Meio Suplementar;

Para os casos em que o volume de licor aumentava, o volume de MS diminuía na mesma proporção:

Tabela 6 – Esquema das composições das fermentações em % (v/v).

Batch I	Batch II	Batch III	Batch IV
20% inóculo	20% inóculo	20% inóculo	20% inóculo
10% açúcares	10% açúcares	10% açúcares	10% açúcares
0% de licor	20% de licor	40% de licor	60% de licor
70% MS	50% MS	30% MS	10% MS

Os inóculos foram preparados em Meio Suplementar com 10 gL⁻¹ de glucose que ficavam a crescer a 28°C e 180rpm durante 15h.

Para cada ensaio foram feitas duas fermentações, das quais foram recolhidas amostras periódicas para medição de pH, biomassa e análise de substrato e produto obtido, tudo em duplicado, para obter valores médios das medições.

A meio das fermentações eram feitas placas de Petri e observações ao microscópio para verificar se haviam contaminações.

2.4.2.1 Fermentações em Erlenmeyer

As fermentações líquidas foram inicialmente conduzidas em Erlenmeyers de 250mL sem controlo de pH nem de oxigénio, apenas com agitação controlada de 180rpm e temperatura constante de 28°C em incubadora orbital B. Braun Certomat S.

2.4.2.2 Fermentações em Biorreactor

Após os ensaios preliminares em Erlenmeyers passou-se ao sistema de biorreactor equipado com controlo de temperatura, agitação e de pH com bombas peristálticas para adição automática de ácido fosfórico e hidróxido de sódio, com um volume útil de 500 mL, a operar em descontínuo. O reactor possui ainda dois filtros de ar estéreis para o exterior. O aquecimento é feito por um banho de água quente que atravessa toda a camisa do reactor, logo é um aquecimento por contacto. Ainda assim, tem a desvantagem de ter mais volume de fermentação e ter uma preparação e

montagem algo complexas, o que torna difícil a possibilidade de fazer réplicas, uma vez que só há um biorreactor disponível.

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Análise do Licor (Hardwood Spent Sulfite Liquor)

Foi feita uma análise prévia do licor para determinação de alguns parâmetros químicos importantes a ter em conta para o processo de fermentação de acordo com o metabolismo da levedura.

2.5.1.1 – Teor de lenhosulfonatos

O teor de lenhosulfonatos foi calculado por espectrofotometria (UV) a 273nm para uma amostra diluída 750 vezes:

$$A = \epsilon_{273} \times C \times l$$

$$\text{Com } l = 1\text{cm}$$

$$C (\text{gL}^{-1}) = \frac{A}{\epsilon_{273}} \Leftrightarrow \epsilon_{273} = 5,4 \frac{\text{L}}{\text{g.cm}}$$

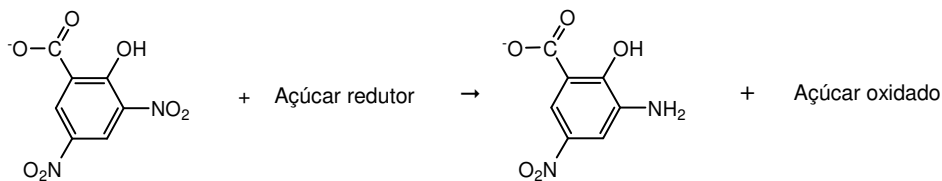
2.5.1.2 – Teor de Cinzas e pH

As cinzas correspondem a toda a matéria de origem mineral existente na amostra, eliminando toda a matéria orgânica. Foram determinadas por calcinação de amostras de 20,0 mL na mufla a 750°C durante 6h.

O pH foi determinado directamente nas amostras chegadas da indústria, homogeneizadas e a temperatura ambiente, usando um eléctrodo com sonda de temperatura e calibrado com soluções tampão a pH 4,0 e 7,0.

2.5.1.3 – Teor de Açúcares Redutores por oxidação do ácido 3,5-dinitrosalicílico (método de DNS)

Os açúcares redutores foram determinados por reacção redox com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que é reduzido e passa de amarelo a cor de tijolo:



ácido 3,5 – dinitrosalicílico (amarelo)

3-amino-5-nitrosalicilato (laranja escuro)

- a cada 1,0 mL de amostra adiciona-se 1,0 mL de DNS seguido de agitação;
- coloca-se em banho fervente 5 minutos e de em gelo para parar a reacção;
- adiciona-se 10,0mL de água destilada , agita-se e mede-se a absorvância a 540nm;

Recta de Calibração

O teor de açúcares redutores é calculado a partir de uma recta de calibração feita com padrões de glucose de concentração rigorosa. O procedimento é o mesmo quer para as amostras quer para os padrões.

Quantificação de Açúcares na amostra

Quanto às amostras foram diluídas 100 vezes para a absorvância ficar entre os valores obtidos para a recta padrão.

2.5.1.4. – Análise de Monossacarídeos

A quantificação dos monossacarídeos presentes no licor foi feita por GC – FID de acordo com a seguinte sequência de procedimentos [53]:

Hidrólise:

- adicionaram-se 1500µL de água destilada a 250 µL de licor fino;
- colocou-se num tubo de soviril e adicionaram-se 190µL de H₂SO₄ 72%;
- incubou-se a 100°C durante 2h e arrefeceu em gelo;

Redução:

- adicionaram-se 100 μ L de 2-desoxiglucose como padrão interno com concentração 15,90mg/mL);
- a 1,0 mL de hidrolisado adicionou-se:
 - 0,2mL de NH₃ 25%
 - 0,1mL de NH₃ 3M com 150mg/mL de NaBH₄
- incubou-se uma hora a 30°C e arrefecer de seguida em gelo;
- adicionou-se 2 vezes 50 μ L de ácido acético glacial e arrefeceu em gelo;
- a 0,3mL de solução adicionou-se:
 - 0,45mL de 1-metilimidazole
 - 3,0mL de anidrido acético
- foi misturado e incubado a 30°C durante 30 minutos;
- arrefeceu-se em gelo e adicionaram-se 3,75mL de água destilada e 2,50mL de diclorometano;
- agitou-se no vórtex e centrifugou-se a baixa rotação durante 30 segundos;
- retirou-se a fase aquosa;
- adicionaram-se 3,0mL de água destilada e 2,0mL de diclorometano;
- voltou a agitar-se e centrifugar e aspirar a fase aquosa;
- adicionaram-se 3,0mL de água destilada, agitou-se no vórtex, centrifugou-se e a fase aquosa foi aspirada;
- repetiu-se a última operação mais duas vezes;
- evaporou-se o diclorometano em corrente de azoto;
- adicionou-se 1,0mL de acetona e voltou a evaporar-se;
- repetiu-se a adição de acetona e a evaporação;

Injecção:

- cromatógrafo Varian 3600
- coluna DB 225 (J&W, 30mx0,25mm d. i. e 0,15 μ m de espessura)
- temperatura do detector: 250°C
- temperatura do injector: 225°C
- temperatura da coluna: 220°C

Recta de Calibração

Para a recta de calibração (Anexo 2) foram feitos 5 padrões em balões de 10,0mL:

- o padrão I com 10,0mg de manose, ramnose e fucose e 20,0mg de xilose, glucose, galactose e arabinose;
- o padrão II com 1,0mL do padrão I e 9,0mL de água destilada;
- o padrão III com 2,0mL do padrão I e 8,0mL de água destilada;
- o padrão IV com 3,0mL do padrão I e 7,0mL de água destilada;
- o padrão V com 5,0mL do padrão I e 5,0mL de água destilada;

Os padrões não precisam de sofrer hidrólise por já serem monossacarídeos, daí o procedimento para a sua quantificação começar só a partir da adição de 0,1mL de NH_3 3M com 150mg/mL de NaBH_4 a 1,94mL de padrão.

Quantificação de Açúcares nas Amostras

Foram analisadas amostras do licor do evaporador 7 tal como chegou da indústria e depois de precipitado com NH_4OH e arejado (pré-tratamento feito ao licor em todas as fermentações, essencialmente para acerto de pH). Das amostras foram feitas duas réplicas, cada uma injectada duas vezes.

2.5.2 Determinação de Biomassa

2.5.2.1 Método Gravimétrico

A determinação da concentração celular da biomassa presente no meio de fermentação fez-se por filtração de um determinado volume de cada amostra por um filtro de acetato de celulose de 0,20 μm de poro. Este papel foi seco na estufa a 105°C durante 72h a 105°C para eliminar toda a humidade. O peso seco foi então determinado após o arrefecimento em exsiccador até estabilização da massa, por subtracção do peso da membrana vazia seca ao peso do conjunto obtido. Este valor permite assim calcular facilmente a concentração celular a partir do volume rigoroso de amostra filtrada.

Este é um método preciso, mas que necessita de consideráveis volumes de amostra quando a concentração celular é baixa. Além disso, também não é imediato após a recolha de amostras.

2.5.2.2 Método Turbidimétrico

A determinação de concentração celular das fermentações em Erlenmeyer e em biorreactor fez-se por turbidimetria, uma vez que para monitorizar o crescimento ao longo de toda a fermentação tinham que ser retiradas amostras de pequenos volumes. Este método permite obter uma relação entre a concentração celular obtida por gravimetria e a densidade óptica a 650nm, obtendo-se uma curva de calibração. Através da relação linear estabelecida (Figura 15), calcularam-se as concentrações celulares a partir da densidade óptica das amostras. Usou-se um espectrofotómetro de duplo feixe Shimadzu UVmini-1240.

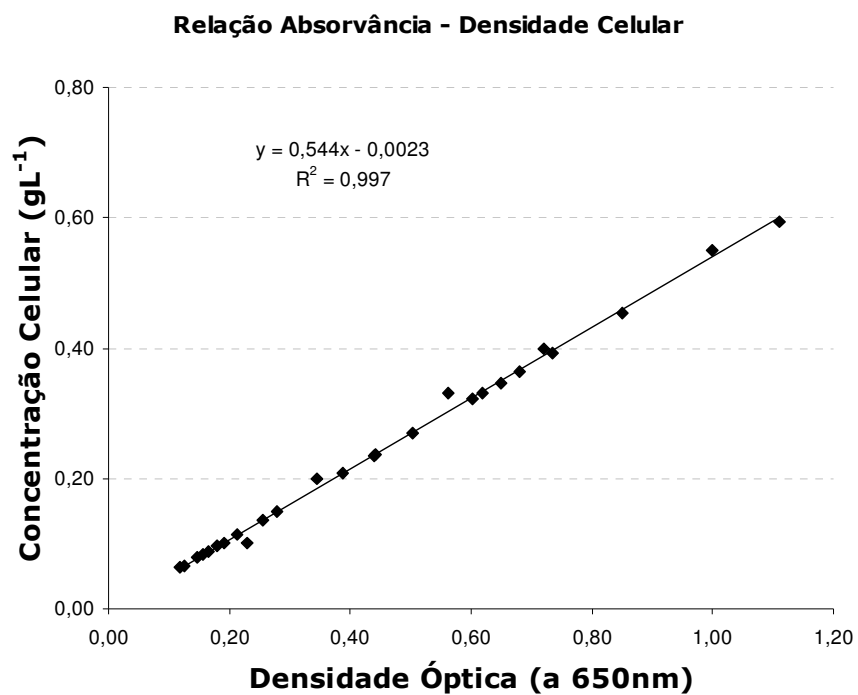


Figura 15 – Curva de calibração obtida entre o peso seco e a densidade óptica a 650nm de *Pichia stipitis*.

2.5.3 Análise por HPLC (Consumos e Produção)

As amostras recolhidas e filtradas são injectadas num sistema de cromatografia líquida equipada com uma coluna de troca iónica com enchimento Eurokat[®] de 10µm, bomba Gilson 307, detector de índice de refração Gilson modelo 131 e integrador

Spectra-Physics 4290. O eluente usado foi uma solução de 0,01N de H₂SO₄ que passa na coluna com um fluxo de 0,4mL/min. à temperatura ambiente.

As rectas de calibração para os quatro compostos analisados (glucose, xilose, ácido acético e etanol) encontram-se no Anexo 1.

2.5.4 Espectroscopia de FT-IR

A análise de infravermelho com transformada de Fourier fez-se num aparelho *MATTSON 7000* e realizou-se apenas uma vez, para perceber a formação de um depósito que ocorreu numa das fermentações. O espectro foi então obtido a partir de 2mg deste depósito previamente liofilizado em 200mg de KBr. Foram acumulados 64 scans com uma resolução de 4cm⁻¹. A espectroscopia de infravermelho utilizada foi na região do infravermelho médio de 4000-400cm⁻¹.

2.5.4 Análise Elementar

A percentagem relativa de C, N, H e S foi analisada através de um analisador elementar *Leco CHNS-932*. Uma amostra sólida de 2mg do sólido liofilizado que se formou na fermentação abiótica em biorreactor foi encapsulada e levada à combustão. Os ajustes para o branco e calibração são aplicados ao sinal integrado final e as respostas são obtidas como percentagem de peso de carbono, azoto, hidrogénio e enxofre.

2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

De modo a otimizar o meio de fermentação, nomeadamente no que se refere à quantidade de açúcares fermentáveis, foram feitos 3 ensaios com enzimas comerciais do produto *ECONASE® Wheat P Plus* com vista à degradação dos açúcares poliméricos existentes, nomeadamente xilanas e glucanas.

Neste tipo de hidrólises é preciso ter em conta a inibição pelo substrato, pois se houver muita acumulação de monossacarídeos, é necessário recorrer à reposição das enzimas durante o processo [54].

Características da Enzima comercial:

Actividade de xilanase: 800 000 BXU/g (Birch Xilane Unit) } actividade
 Actividade de β -glucanase: 200 000 BU/g } mínima
 pH: 5,0 – 5,8 } declarada
 Densidade: 0,8 Kg/dm³
 Matéria Seca = mínimo de 90%

Unidades de actividade:

- uma unidade de xilanase (BXU) é definida como a quantidade de enzima que produz uma quantidade de açúcares redutores correspondente a 1 μ mol de xilose de uma xilana por minuto a pH 5,3 e 50°C [55,56].

- uma unidade de β -glucanase (BU) é definida como a quantidade de enzima que produz uma quantidade de açúcares redutores correspondente a 1 μ mol de glucose de uma glucana por minuto a pH 5,5 e 50°C.

Para estudar o tempo de hidrólise enzimática assim como a quantidade de enzima a usar foram feitos vários ensaios com 50,0mL de licor precipitado com NH₄OH até pH 5,5-5,6 e oxigenado, a 50°C com 180rpm:

Tabela 7 – Tabela resumo dos ensaios feitos para a hidrólise enzimática.

Ensaio	Massa de Enzima (mg)	Glucose Inicial (gL⁻¹)	Xilose Inicial (gL⁻¹)
1	500	1,5	17,8
2	1000	1,5	17,1
3	3000	1,5	17,1

2.7 REMOÇÃO DE INIBIDORES

Um dos principais inibidores de crescimento e metabolismo da levedura associado ao licor é sem dúvida o ácido acético. Na tentativa de remoção deste composto, foram

tidas em conta duas abordagens: uma biológica com leveduras desacidificantes, outra física com evaporação.

2.7.1 Desacidificação Biológica

2.7.1.1 Meio Sólido

A desacidificação em meio sólido foi iniciada com seis leveduras gentilmente cedidas pela PYCC (Portuguese Yeast Culture Collection):

- Candida tropicalis*
- Candida utilis*
- Kluyveromyces marxianus*
- Zygosaccharomyces baillii*
- Saccharomyces cerevisiae*
- Pichia anomala*

Foram inoculadas em placas de Petri com o meio selectivo anteriormente descrito (Tabela 5) e o seu crescimento e consequente mudança ou não da cor do indicador presente no meio, foram monitorizados todos os dias ao longo de 8 dias com uma câmara digital Olympus 4MP, modelo C4040ZOOM. O ensaio foi feito a 28°C em incubadora Braun.

Para cada espécie foram estudados dois parâmetros: a variação de pH (de 4,0 a 6,5) e a variação da concentração de fontes de carbono (ácido acético e açúcares).

A partir das placas de Petri com melhores resultados (bom crescimento e aumento de pH por consumo de ácido acético) passou-se então à aplicação directa destes microrganismos nos meios fermentativos com licor.

2.7.1.2 Meio Líquido

A aplicação das leveduras desacidificantes nos meios de fermentação foi feita apenas com quatro espécies por eliminação prévia de outras duas consoante os resultados obtidos. Assim, foram feitos ensaios em duplicado, com: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Pichia anomala* e *Candida utilis* com 60% (v/v) de licor. As condições de fermentação são as mesmas já descritas.

Após analisados os resultados obtidos no meio fermentativo em termos de concentração de ácido acético, escolheu-se a melhor levedura para co-inocular com a *Pichia stipitis*

2.7.2 Desacidificação por Evaporação

A tentativa de remoção do ácido acético foi ainda feita por destilação por arrastamento de vapor.

No balão de destilação foi colocado o licor tal como recolhido na fábrica. O balão com água destilada e reguladores de ebulição serviu de gerador de vapor e a sua pressão foi controlada com um tubo de vidro comprido colocado no topo (manómetro). No Erlenmeyer foi recolhido o destilado constituído essencialmente por água, SO₂, ácido acético e outros compostos voláteis em menor quantidade.

Colocaram-se 500mL de licor no balão de fundo redondo e certificou-se que o pH era cerca de 4,0 (inferior ao pKa_{ácido acético}=4,75) para este poder ser arrastado na forma dissociada. Foram feitos dois ensaios, com 90 e 180 minutos de aquecimento.

No fim do tratamento, verificou-se o volume final do licor e, de seguida procedeu-se do mesmo modo que nos anteriores tratamentos. Fez-se precipitação com NH₄OH até pH 5,5 – 6,0 seguida de arejamento e filtração. O licor obtido foi mais uma vez testado em fermentações com 60% de licor nas mesmas condições de fermentação já descritas.

2.7.3 Remoção de Lenhosulfonatos

Como os resultados obtidos com a remoção de ácido acético não foram os esperados, escolheram-se resinas de troca iónica para remoção de outros compostos que estivessem a limitar o metabolismo da levedura, nomeadamente os lenhosulfonatos.

A permuta iónica consiste numa troca estequiométrica de um ião por outro, obedecendo a uma relação de equilíbrio. Estas reacções ocorrem nas Resinas de Permuta Iónica, cujo principal componente é o poliestireno. Esta substância forma uma estrutura reticulada com o divinilbenzeno (DVB), tornando as resinas insolúveis. Esta matriz polimérica permite também a fixação dos grupos funcionais ácido ou base, fortes ou fracos, que conferem à resina o seu carácter de permutadora de iões.

As resinas usadas neste trabalho foram seleccionadas com base em patentes industriais (European Patent EP1354068 e US Patent 5637225 3 5730877): Dowex 50W x 2, mesh 100-200, forma Na⁺ (resina catiónica); Amberlite IRA – 93, mesh 20 – 50, base livre (resina aniónica). As colunas têm aproximadamente 3,5cm de diâmetro interno e 50cm de altura.

Fizeram-se passar pela resina de permuta catiónica 100 mL de licor previamente filtrado com filtros de microfibras de vidro e diâmetro de poro de 1 µm. Recolheram-se 200 ml (um volume superior ao inicial devido à diluição do licor com a água de hidratação presente na resina) a pH ~ 1, prova de que a permuta iónica foi completa. Os 200 mL recolhidos anteriormente passaram de seguida para a resina de permuta aniónica e a solução recolhida (300 – 400 mL divididos em fracções de 100 mL) que apresenta pH neutro, foi posteriormente analisada em HPLC para determinar a concentração de açúcares presentes.

O processo de lavagem e regeneração das resinas é feito com NaOH 1M e HCl 1M intercalado com a neutralização com água destilada. Ambos os processos são controlados a nível de pH com o papel indicador.

A solução recolhida foi ainda concentrada cerca de cinco vezes em evaporador rotativo a 60°C para simular a quantidade de açúcares presente no licor e posteriormente usada para duas fermentações: a pH 5,8 e pH 7,0 nas seguintes proporções:

Tabela 8 – Tabela resumo dos ensaios feitos com a solução de açúcares recolhida das colunas de permuta iónica.

Componente	Concentração (%v/v)
Inóculo	10
Meio Suplementar	15
Fracção de Licor recolhida	75

Em resumo, o desenvolvimento do trabalho apresentado nesta tese pode ser esquematizado da seguinte forma:

Hardwood Spent Sulfite Liquor



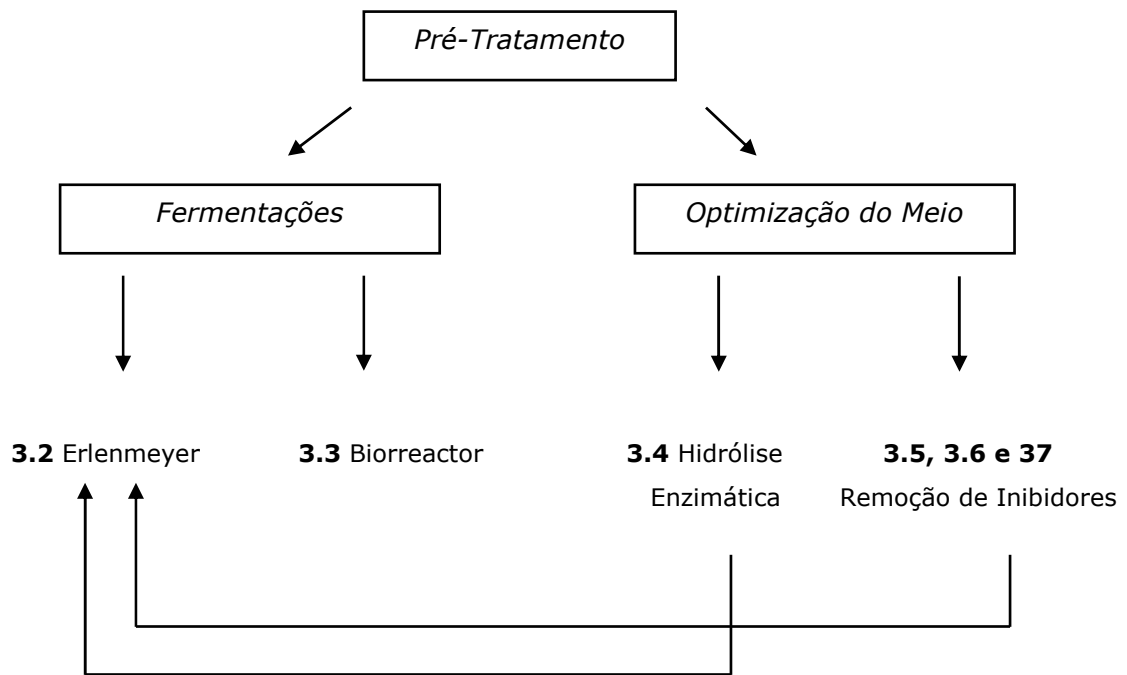


Figura 16 – Esquema ilustrativo do trabalho desenvolvido na tese.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.COMPOSIÇÃO DO LICOR

Foi feita uma análise prévia do licor para determinação de alguns parâmetros importantes a ter em conta para o processo de fermentação de acordo com o metabolismo da levedura. A sua composição encontra-se na Tabela 9.

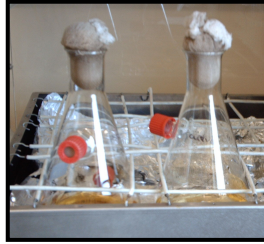
Tabela 9 – Composição do Hardwood Spent Sulfite Liquor (HSSL) de *Eucalyptus globulus* ao sulfito ácido.

Componente	Concentração (gL ⁻¹)
Lenhosulfonatos	78,2 ± 0,6
Ácido acético	8,2 ± 0,3
Furfural	Vestígios
Cinzas	15,1 ± 0,2
pH	3,40 ± 0,05
Açúcares Redutores	42,8 ± 0,4
D-xilose	24,6 ± 0,5
D-manose	8,5 ± 0,9
L-arabinose	7,8 ± 0,3
D-galactose	4,5 ± 0,1
D-glucose	2,3 ± 0,1
L-ramnose	1,6 ± 0,3
L-fucose	0,4 ± 0,3

Estes parâmetros são importantes a ter em conta para o processo de fermentação de acordo com o metabolismo da levedura.

De notar que os monossacarídeos foram determinados por GC-FID sofrendo uma hidrólise ácida prévia, o que significa que nos gráficos das fermentações que monitorizam o consumo de substrato só sejam identificados os que existem em maiores quantidades na forma monomérica – a xilose e a glucose, quantificados por HPLC.

3.2 FERMENTAÇÕES EM ERLLENMEYER



3.2.1 Meios Sintéticos

As fermentações em meios sintéticos tiveram como objectivo principal testar a *Pichia stipitis* quanto à sua viabilidade celular e quanto à produção de etanol relativamente à conversão dos monossacarídeos existentes no licor.

O meio sintético foi formulado juntando ao Meio Suplementar (MS) os monossacarídeos existentes no licor e ainda testada a presença de ácido acético.

Foram então feitos dois ensaios: um na presença e outro na ausência de ácido acético, uma vez que este será um dos factores limitantes do metabolismo, por ser considerado inibidor.

Tabela 10 – Composição dos meios de fermentação sintéticos (concentrações em gL^{-1}).

Composto	Meio <u>com</u> ácido acético (gL^{-1})	Meio <u>sem</u> ácido acético (gL^{-1})
Glucose	5,0	5,0
Xilose	27,0	27,0
Manose	5,0	5,0
Arabinose	6,0	6,0
Ácido acético	9,5	0,0
Meio Suplementar	40% (v/v)	40% (v/v)

As curvas de crescimento apresentam taxas específicas de crescimento bastante diferentes: enquanto que no meio com ácido é apenas de $0,20\text{h}^{-1}$, no meio sem ácido o crescimento ocorreu com uma taxa de $0,51\text{h}^{-1}$.

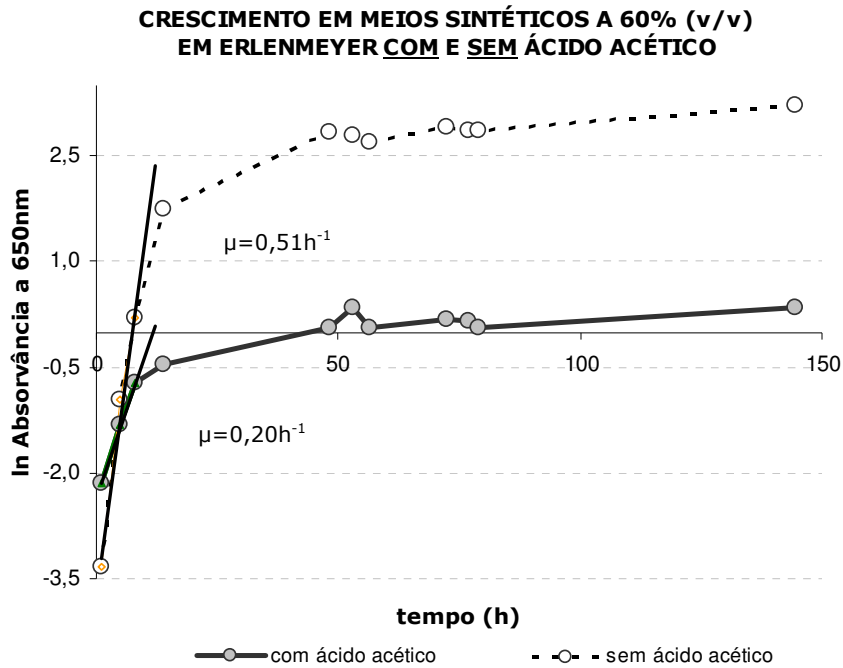


Figura 17 – Curvas de crescimento nos meios sintéticos em Erlenmeyer.

Pela Figura 17 verifica-se que o crescimento microbiano é muito maior na fermentação sem ácido acético. No entanto, no meio com ácido é de notar que a taxa específica de crescimento é significativa, o que se deve essencialmente à glucose presente no inóculo inicial e que permitiu um arranque no meio fermentativo com ácido, uma vez que os açúcares não são consumidos (Figura 18).

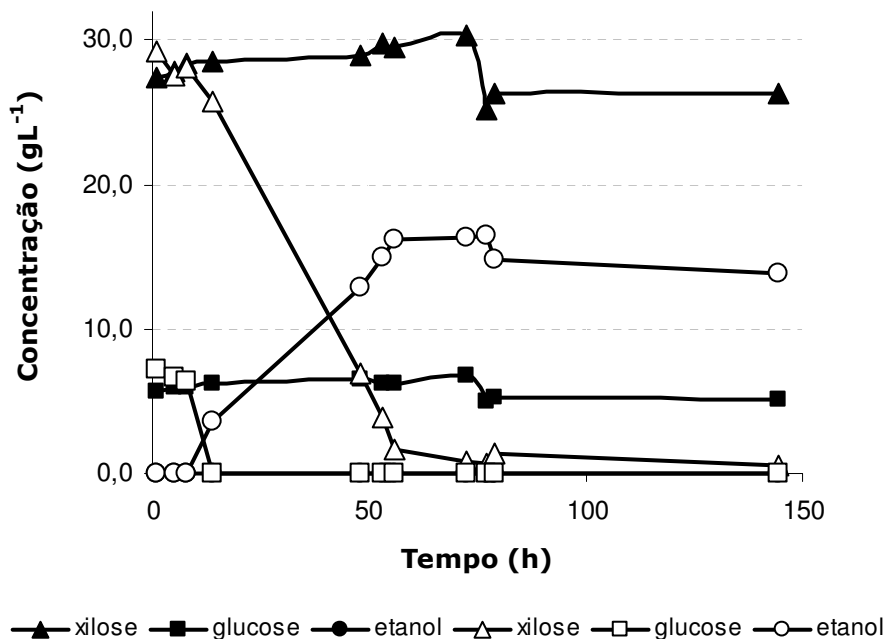


Figura 18 – Curvas de consumo de açúcares e produção de etanol em meios sintéticos (símbolos a cheio correspondem ao meio com ácido acético e símbolos a vazio ao meio sem ácido).

Por análise das amostras retiradas dos meios de fermentação verificou-se que para a fermentação sem ácido acético há consumo rápido de todos os açúcares (cerca de 80h) com um rendimento em etanol ($Y_{p/s}$) de 0,40 g etanol/g açúcar consumido (glucose+xilose), sendo o rendimento máximo de 0,51 como já foi referido por Hägerdal et al., 1996. Assim obteve-se uma concentração máxima de 15,0 g/L de etanol a partir das 40 g/L de açúcares iniciais.

3.2.2 Fermentações Sequenciais com Licor Industrial

As fermentações feitas em Erlenmeyer tiveram todas a mesma composição em termos de açúcares, sais e inóculo, no entanto, ao fazer-se variar a concentração de licor no meio de fermentação, teve que se adaptar as concentrações dos açúcares e sais adicionados. Assim, a composição fixa foi sempre planeada como apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição das fermentações em Erlenmeyer em termos de concentração (g L^{-1}).

		Componente	Concentração (g L^{-1})
Açúcares	{	glucose	2,0
		xilose	20,0
MS	{	extracto de levedura	2,5
		$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,	2,0
		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
		inóculo	---

Assim, concluídas as fermentações pode analisar-se apenas o efeito da adição de licor no comportamento da levedura.

Na Tabela 12 encontra-se a composição do meio inicial quanto à concentração de glucose, xilose, ácido acético e pH, assim como o resumo das curvas de crescimento em termos de tempo de fase exponencial e taxa específica de crescimento (μ_0).

Os gráficos correspondentes a cada batch encontram-se no Anexo 3

Tabela 12 – Composição inicial das fermentações e dados das curvas de crescimento.

Batch	pH	Açúcares fermentáveis (gL ⁻¹)		Ácido acético (gL ⁻¹)	Tempo de fase Exponencial (h)	Taxa Específica de Crescimento (h ⁻¹)
		Glucose inicial	Xilose inicial			
I (0% HSSL)	6,2	2,1	16,2	0,0	10	0,37
II (20% HSSL)	6,2	2,1	21,0	2,6	10	0,32
III (40% HSSL)	5,9	3,0	22,3	4,6	7	0,12
IV (60% HSSL)	5,9	3,1	23,0	6,6	-	0,0

Como se pode verificar, à medida que o volume de licor aumenta na fermentação, a taxa específica de crescimento diminui, o que significa que além da biomassa diminuir, o arranque do crescimento vai sendo mais fraco.

Tabela 13 – Tabela resumo dos resultados de consumos e produção das fermentações em Erlenmeyers.

Batch	Tempo de fermentação (h)	Açúcares residuais (g/L)		Etanol	
		Glucose	Xilose	Y _{P/S} * (g.g ⁻¹)	Concent. máx. (g/L)
I (0% HSSL)	50	0,0	0,7	0,37	4,1
II (20% HSSL)	50	0,0	1,3	0,30	5,5
III (40% HSSL)	100	0,0	3,0	0,23	6,5
IV (60% HSSL)	100	2,6	22,5	0,00	0,0

*considerando rendimento máximo 0,51g de etanol/g de açúcar consumido (glucose+xilose).

Na Tabela 13 verifica-se que à medida que o volume de licor aumenta na fermentação há uma diminuição directa no consumo de açúcares e consequentemente, na conversão para etanol. Pelos valores de Y_{P/S} pode afirmar-se que o licor é de algum modo inibidor quer do crescimento, quer do metabolismo de produção de etanol, uma vez que para os 60% (v/v) os açúcares nem chegam a ser assimilados.

Em termos de produtividade volumétrica a mesma diminuição é observada para cada fermentação (Figura 19):

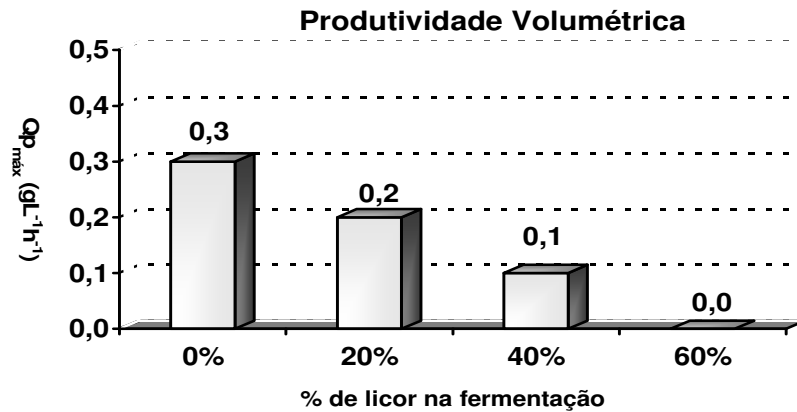
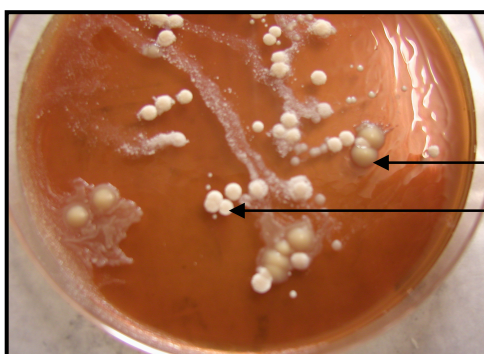


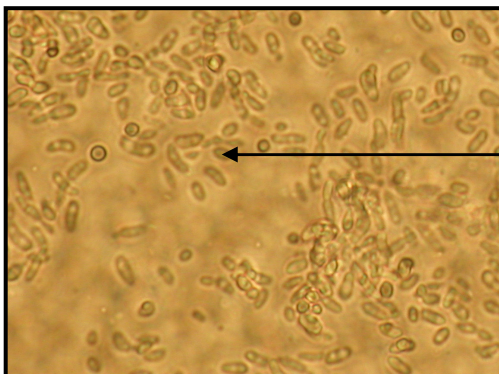
Figura 19 – Gráfico de barras representativo da produtividade volumétrica das fermentações em Erlenmeyer

É de salientar ainda que todas as fermentações foram seguidas ao microscópio e com placas de Petri (com meio YM sólido) a meio do tempo total de fermentação para detectar contaminações possíveis. Foram encontradas várias destas contaminações por exemplo com *Propioniumbacterium*, uma vez que foi detectado ácido propiónico nas análises por cromatografia, assim como foram observados diferentes microrganismos nas placas e no microscópio:



Pichia stipitis
(amarelada e de aspecto leitoso)
Propioniumbacterium
(branca e de aspecto esponjoso)

A) Placa de petri com espalhamento feito a meio de uma das fermentações.



observação ao microscópio óptico que confirmou a contaminação bacteriana (forma característica de bacilo das bactérias e a parede bacteriana) assim como tamanho muito menor

B) - Contaminação bacteriana observada ao microscópio (com ampliação de 500x)

Figura 20 – Exemplo de uma das contaminações obtidas para alguns ensaios em Erlenmeyer:
A) observação em placa de Petri ; B) observação ao microscópio.

3.3 FERMENTAÇÕES EM BIORREACTOR



Relativamente às fermentações em Erlenmeyer com agitação orbital e controlo de temperatura, o biorreactor tem a vantagem de se poder controlar o pH ao longo de todo o processo com a adição de hidróxido de sódio e de ácido fosfórico.

Inicialmente foi pensado o estudo comparativo com as fermentações sequenciais em Erlenmeyer, no entanto, decidiu-se começar apenas na fermentação com 40% de licor e deixar de lado as de 0% e 20%, uma vez que já seriam de esperar resultados positivos. O objectivo então, passou a ser apenas comparar pelo menos uma fermentação e decidir qual o reactor mais adequado para fermentações futuras, ou seja, se realmente o biorreactor compensaria relativamente ao Erlenmeyer.

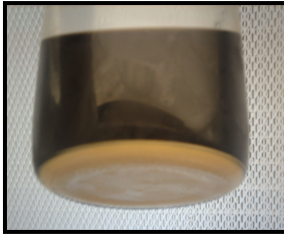
Tabela 14 – Tabela resumo da fermentação feita em biorreactor com 40% (v/v) de licor.

Batch	pH	Açúcares fermentáveis (gL ⁻¹)				Etanol max. (gL ⁻¹)
		Glucose		Xilose		
		inicial	final	Inicial	final	
V	6,0	2,8	0,0	18,9	15,0	0,4

Como se pode observar pela Tabela 14 e ainda pela Figura 36 do Anexo 3, o resultado não foi melhor do que o da fermentação em Erlenmeyer, pelo contrário, praticamente não houve consumo da xilose, e o etanol foi produzido apenas à custa da glucose.

Já no ensaio feito em Erlenmeyer com os mesmos 40% de licor (v/v) houve consumo de praticamente toda a xilose, para além da glucose e o rendimento foi de 0,23 g de etanol/ g açúcar consumido.

3.3.1 Ensaio Abiótico



Observou-se também, que com o decorrer das duas fermentações se formava um depósito amarelado (Figura 21) que não era apenas biomassa. Para confirmar que esse mesmo depósito não era formado por acção da levedura, mas sim por eventual precipitação do meio fermentativo, foi feito um ensaio abiótico (sem levedura) com 40% de licor.

Figura 21 – Fotografia do depósito observado no ensaio abiótico com 40% de licor.

Ao longo das 100h de ensaio foram retiradas amostras para quantificação dos açúcares e dos lenhosulfonatos e verificou-se que estes se mantiveram constantes o que não é conclusivo para indicar de facto a degradação destes compostos do licor como inicialmente se pensava. Posteriormente, este depósito foi liofilizado e efectuada uma análise elementar cujos resultados se encontram na Tabela 15 e uma análise de FT-IR (Anexo 4).

Tabela 15 – Resultados obtidos por análise elementar.

Carbono (%)	Azoto (%)	Hidrogénio (%)	Enxofre (%)
2,642±0,053	4,604±0,066	3,219±0,065	0,548±0,049

Até ao momento não foi possível descobrir a composição completa deste depósito. Sabe-se apenas que tem na sua maioria carbono, hidrogénio e azoto provavelmente dos sais. No entanto, a percentagem de enxofre dos grupos sulfónicos (0,5%) foi muito baixa, o que significa que realmente não houve degradação dos lenhosulfonatos como confirmado pela sua medição (por UV) ao longo do ensaio.

Pelo espectro de FT-IR consegue ver-se a banda dos grupos sulfónicos aos 3741 cm^{-1} , assim como a do enxofre livre aos 561 cm^{-1} . De resto, ficam ainda por identificar os grupos funcionais das bandas 1401 cm^{-1} e 1081 cm^{-1} .

Certamente, este precipitado foi provocado pela adição do ácido e da base durante a manutenção do pH com as bombas peristálticas, associado também ao tipo de agitação – ambos parâmetros que diferem dos Erlenmeyers.

Assim, a hipótese de continuar fermentações em biorreactor foi posta de parte, daí que todos os ensaios seguintes continuaram a ser em Erlenmeyer.

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O objectivo deste passo, incluído na optimização do meio de fermentação, foi aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis de modo a aumentar a produção de etanol.

Muitos são os artigos que citam a hidrólise enzimática de material lenhocelulósico [7, 11, 35, 37, 57-59], nomeadamente com endoglucanases, exoglucanases e celobiasas, muitas vezes produzidas *in situ* a partir de inúmeros microrganismos como fungos e bactérias. No entanto, aqui não se trata da biomassa lenhocelulósica propriamente dita, logo não seria necessário usar celulasas, uma vez que a celulose é retida ao máximo para a produção de pasta de papel.

Neste caso, como o objectivo é o aproveitamento do licor que resulta do cozimento ácido do eucalipto, há que seleccionar as enzimas mais adequadas aos açúcares polimerizados que fazem parte deste licor.

No caso de folhosas como o eucalipto, é de esperar que os monómeros mais abundantes sejam a xilose e a glucose derivadas precisamente das hemiceluloses mais abundantes – as glucanas e as glucoronoxilanas e ainda de oligómeros de celulose semi-degradada.

Assim, e como já foi referido na secção de Métodos Experimentais foram usadas três quantidades diferentes de uma enzima comercial Econase Wheat P Plus® com actividade de xilanase e glucanase. Os resultados da hidrólise foram analisados por HPLC em vários intervalos de tempo.

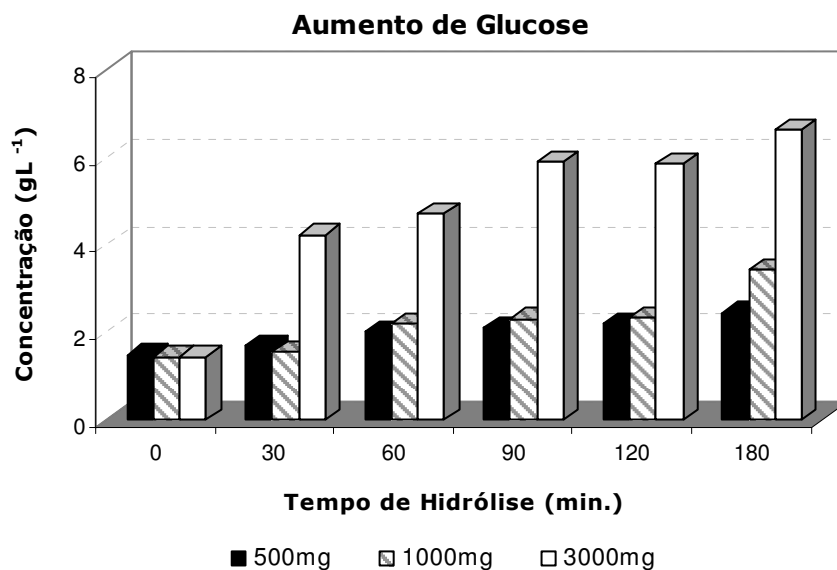


Figura 22 - Gráfico de barras representativo do aumento de glucose por hidrólises enzimática.

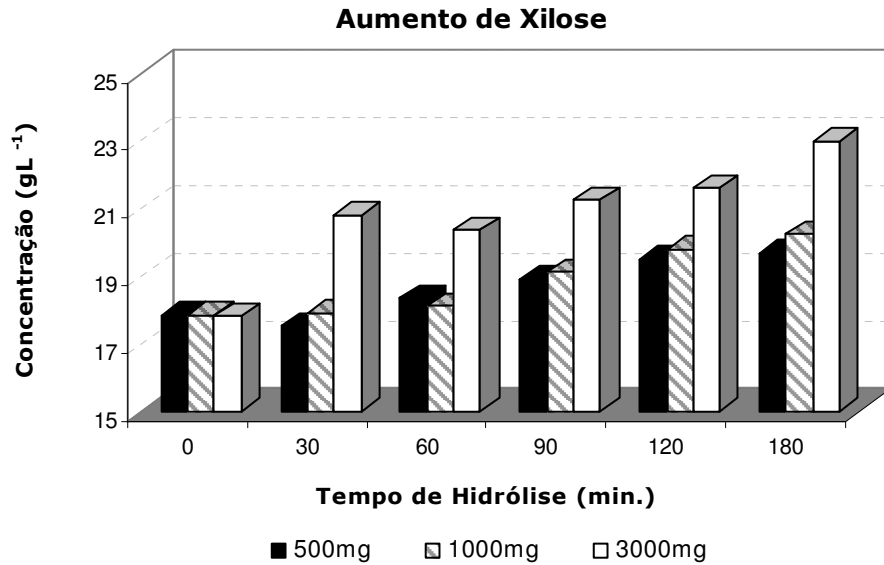


Figura 23 - Gráfico de barras representativo do aumento de xilose por hidrólises enzimática.

Como se pode observar nos gráficos de barras representados nas Figuras 22 e 23, a hidrólise quer de glucose quer de xilose foi mais eficiente no ensaio 3 com 3000mg de enzima, ou seja, 6,0% (m/v) do volume de licor. Neste ensaio, a concentração de glucose quase quadruplicou e a de xilose aumentou 30%. Já os outros dois ensaios (1 e 2) foram muito semelhantes, com aumentos de glucose na ordem dos 60-70% e de xilose na ordem dos 10-13%.

De notar que não se usaram concentrações maiores de enzima por limitações de manutenção de um meio de fermentação viável, uma vez que se começavam a formar depósitos que poderiam ser adversos à sobrevivência das leveduras.

Apesar de se revelar um processo eficaz em termos de aumento da fonte de carbono disponível, não foi possível converter estes açúcares em etanol, uma vez que a levedura não cresceu nas duas fermentações realizadas com 60% (v/v) de licor. O que significa que antes de qualquer hidrólise neste sentido, deverão ser removidos todos e quaisquer inibidores do licor. No entanto, será um processo de optimização do meio de fermentação a ter em conta para fermentações futuras.

3.5 DESACIDIFICAÇÃO POR ARRASTAMENTO DE VAPOR

A destilação por arrastamento de vapor teve como objectivo a remoção do ácido acético, por estar referido como um dos principais inibidores da fermentação etanólica [14, 43, 51, 52]. É ainda um método de fácil integração no processo de produção de pasta, com aproveitamento de vapor dos evaporadores onde o licor é queimado.

Foram feitos dois ensaios com 90 (I) e 180 (II) minutos de destilação e verificou-se que de facto foi removido cerca de 50% do ácido acético do licor quer por análise do destilado quer por análise ao licor final obtido.

Tabela 16 – Composição do licor no início e final da destilação por arrastamento de vapor.

Tratamento	Tempo (min.)	Glucose (gL ⁻¹)		Xilose (gL ⁻¹)		Ácido acético (gL ⁻¹)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
I	90	0,8	1,4	18,0	17,9	8,2	4,5
II	180	0,8	4,6	18,0	27,4	8,2	4,3

Quer para o licor resultante do tratamento I quer do tratamento II obteve-se um aumento da glucose monomérica e da xilose, cujos resultados foram determinados por HPLC. Assim, tentou fazer-se uma fermentação com 60% deste licor resultante em Erlenmeyer com 250mL de volume total.

Tanto para um tratamento como para outro, nas fermentações não houve produção de etanol e o crescimento foi muito baixo, pois para além da remoção do ácido não ter sido completa, o aquecimento excessivo poderá ter levado à formação de compostos de caramelização [60]. De qualquer modo, a extensão do tempo de destilação não se justifica na remoção de ácido, uma vez que a remoção foi muito idêntica dos 90 para os 180 minutos.

3.6 DESACIDIFICAÇÃO – ABORDAGEM BIOLÓGICA

Depois da tentativa de remoção de ácido acético por arrastamento de vapor não apresentar os melhores resultados, tentou fazer-se uma abordagem biológica da

desacidificação por serem várias as referências em artigos sobre desacidificação com leveduras, fungos ou mesmo bactérias geneticamente modificadas [14, 52, 61].

3.6.1 Escolha de Levedura desacidificante em meio sólido

Inicialmente foi estudado o comportamento de seis espécies diferentes de leveduras desacidificantes: *Z. bailli*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *P. anomala*, *S. cerevisiae* e *K. marxianus* em diferentes pH's e diferentes concentrações de açúcares, portanto em diferentes meios. Paralelamente foi feito sempre um ensaio com a *Pichia stipitis* para testar realmente a incapacidade de remoção de ácido acético.

A – Meios com Açúcares e Ácido acético

O meio com açúcares é o meio inicial representado na Tab. 5, ou seja, com:

- 0,15% de glucose
- 2,0% de xilose
- 0,6% e 0,8% de ácido acético

Para mudanças de pH entre 4,0 e 5,0 foi usado o verde de bromocresol que vira para azul, e para mudanças entre 5,5 e 6,5 foi usado o púrpura de bromocresol que vira para roxo. Esquemáticamente temos:

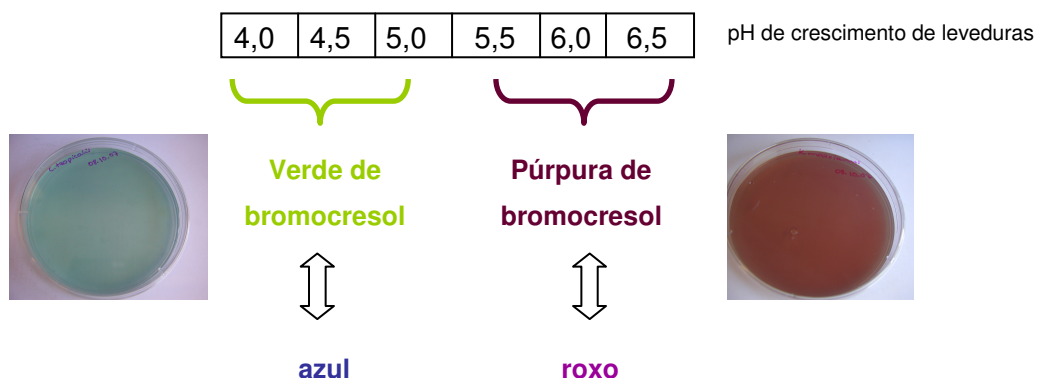


Figura 24 – Esquema do estudo de pH de acordo com as zonas de viragem dos indicadores.

Para cada zona de viragem de cada indicador foram então feitos dois meios: com 6,0g/L de ácido acético como estudado por Schüler D., 1998 [13] e 8,0g/L (como representação do licor).

i)- Meio com 0,6% (p/v) de ácido acético:

Os resultados são indicados em:

Mudança de cor (+ positiva ou - negativa) / Grau de crescimento (de 1 a 5 consoante a cobertura da placa e densidade de biomassa)

Tabela 17 – Resultados do crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo com açúcares e 6,0gL⁻¹ de ácido acético.

Levedura	Verde de bromocresol (pH 4,0-5,0)			Púrpura de bromocresol (pH 5,5-6,5)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
<i>P. anomala</i>	-/-	-/(+1)	-/(+1)	+(2)/(+4)	+(5)/(+5)	+(5)/(+5)
<i>K. marxianus</i>	-/-	-/-	-/(+1)	-/(+2)	+(4)/(+4)	+(4)/(+4)
<i>C. tropicalis</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/(+5)	-/(+5)
<i>C. utilis</i>	-/-	-/-	-/-	+(2)/(+4)	+(4)/(+4)	+(4)/(+4)
<i>P. stipitis</i>	-/-	-/(+1)	-/(+1)	-/(+1)	-/(+5)	-/(+5)
<i>S. cerevisiae</i>	-/-	-/(+2)	-/(+2)	-/(+1)	+(3)/(+4)	+(4)/(+4)
<i>Z. baillii</i>	-/-	-/(+2)	-/(+3)	-/-	-/(+1)	-/(+3)

Pelos resultados obtidos na Tabela 17 verifica-se que nas placas com o verde de bromocresol, ou seja, com o pH mais baixo, não houve mudança de cor, e portanto não houve consumo de ácido acético. O crescimento em geral, foi fraco. Quanto ao meio púrpura, verificou-se uma mudança de cor mais rápida para a *C. utilis* e para a *P. anomala*, confirmando o consumo de ácido com aumento de pH, assim como um crescimento elevado para as mesmas e ainda para a *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.

ii) - Meio com 0,8% (p/v) de ácido acético:

Tabela 18 – Resultados do crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo com açúcares e $8,0\text{gL}^{-1}$ de ácido acético.

Levedura	Verde de bromocresol (pH 4,0-5,0)			Púrpura de bromocresol (pH 5,5-6,5)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
<i>P. anomala</i>	-/-	-/-	-/-	+(2)/+(4)	+(4)/+(5)	+(4)/+(5)
<i>K. marxianus</i>	-/-	-/(+1)	-/(+1)	-/(+2)	+(2)/+(2)	+(4)/+(4)
<i>C. tropicalis</i>	-/-	-/-	-/-	-/(+3)	-/(+5)	-/(+5)
<i>C. utilis</i>	-/(+1)	-/(+1)	-/(+1)	+(2)/+(3)	+(4)/+(4)	+(5)/+(5)
<i>P. stipitis</i>	-/(+1)	-/(+1)	-/(+1)	-/(+1)	-/(+3)	-/(+4)
<i>S. cerevisiae</i>	-/(+1)	-/-	-/-	+(1)/+(1)	+(3)/+(3)	+(4)/+(3)
<i>Z. baillii</i>	-/-	-/-	-/(+2)	-/-	+(1)/+(1)	+(2)/+(2)

Com $8,0\text{gL}^{-1}$ de ácido acético os resultados foram muito semelhantes. Na tabela 18 pode verificar-se que para pH baixos a mudança de cor não ocorreu e que o crescimento apenas se evidenciou na *Z. baillii*. Quanto ao meio púrpura, mais uma vez a mudança de cor mais rápida foi nas leveduras *P. anomala* e *C. utilis* e o crescimento foi maior nas mesmas e na *K. marxianus* ao fim do 3º dia.

De referir ainda que foram sempre feitas placas sem inóculo, ensaios abióticos, para verificar se poderia eventualmente ocorrer mudança de cor ao longo do tempo apenas por factores externos às leveduras ou se poderia haver algum crescimento por contaminação. Nesses casos, essa mudança nunca se verificou.

B – Meios sem Açúcares com Ácido acético

Apesar dos resultados positivos de mudança de cor no meio púrpura, era necessário obter crescimento microbiano apenas à custa do ácido acético presente como fonte de carbono, de modo a deixar os açúcares livres para a fermentação etanólica. Assim, foi feito um segundo meio com ácido acético mas sem açúcares.

i) Meio com 0,6% (p/v) de ácido acético:

Tabela 19 – Resultados de crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo sem açúcares e 6,0gL⁻¹ de ácido acético.

Levedura	Verde de bromocresol (pH 4,0-5,0)			Púrpura de bromocresol (pH 5,5-6,5)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
<i>P. anomala</i>	-/-	-/-	-/-	+(1)/+(2)	+(4)/+(2)	+(5)/+(5)
<i>K. marxianus</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	+(1)/+(1)	+(3)/+(4)
<i>C. tropicalis</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	+(4)/+(3)	+(5)/+(5)
<i>C. utilis</i>	-/-	-/-	-/-	+(3)/+(3)	+(4)/+(3)	+(5)/+(5)
<i>P. stipitis</i>	-/-	-/-	-/-	+(2)/+(2)	+(1)/+(1)	+(4)/+(5)
<i>S. cerevisiae</i>	-/-	-/(+1)	+(1)/+(2)	+(1)/+(1)	+(2)/+(1)	+(5)/+(4)
<i>Z. baillii</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+(1)/+(1)

Nestes meios sem açúcares, os resultados foram ligeiramente diferentes, principalmente no meio de pH mais baixo. A única levedura que apresentou crescimento e mudança de cor foi a *S. cerevisiae*, chegando mesmo a cobrir a placa toda ao 8º dia de crescimento (Fig. 25b). Já nas placas de meio púrpura, com pH mais elevado, a *C. utilis* foi a que apresentou mudança de cor mais rápida, logo no 1º dia (Fig. 25a). O crescimento maior associado a mudança de cor por mudança de pH observou-se para *P. anomala*, *C. tropicalis* e *C. utilis*.

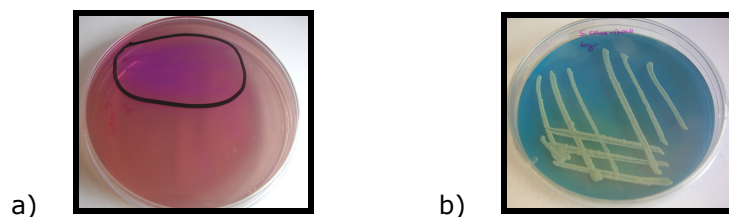


Figura 25 - Exemplos das fotografias tiradas às placas de meio sólido diferencial: a) mudança de cor no meio púrpura por *C. utilis*, b) crescimento em meio verde por *S. cerevisiae*.

ii) Meio com 0,8% (p/v) de ácido acético:

Este meio foi talvez o mais importante a nível de selecção de leveduras desacidificantes, pois além de ter uma concentração de ácido acético semelhante à do licor, não possui açúcares e portanto as leveduras irão usar o ácido como fonte de carbono.

Tabela 20 – Resultados de crescimento e mudança de cor no meio sólido selectivo sem açúcares e 8,0g/L de ácido acético.

Levedura	Verde de bromocresol (pH 4,0-5,0)			Púrpura de bromocresol (pH 5,5-6,5)		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
<i>P. anomala</i>	-/-	-/-	-/-	+(1)/+(1)	+(3)/+(4)	+(3)/+(5)
<i>K. marxianus</i>	-/-	-/(+1)	-/(+1)	-/-	-/(+1)	+(1)/+(1)
<i>C. tropicalis</i>	-/-	-/(+1)	-/(+1)	+(3)/+(2)	+(4)/+(5)	+(4)/+(5)
<i>C. utilis</i>	-/-	-/-	-/-	+(2)/+(1)	+(4)/+(5)	+(5)/+(5)
<i>P. stipitis</i>	-/-	-/(+1)	-/(+1)	-/-	-/(+1)	+(2)/+(2)
<i>S. cerevisiae</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	+(2)/+(2)	+(3)/+(2)
<i>Z. baillii</i>	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Observando a Tabela 20 pode concluir-se que no geral, o crescimento diminui em ambos os meios. No verde de bromocresol não foi registada nenhuma mudança de cor e o crescimento de biomassa foi mesmo muito pouco. No meio púrpura, a mudança de cor só foi máxima na *C. utilis*. Já o crescimento abundante foi observado na *P. anomala*, na *C. tropicalis* e na *C. utilis*.

Com os resultados obtidos, e a partir das seis leveduras iniciais, foi então feita uma pré-selecção das espécies que possam talvez ser as mais eficazes para o fim destinado – a remoção de ácido acético no meio fermentativo com licor. Passou-se então aos testes em meio líquido, mas agora apenas com as 4 melhores leveduras: ***Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis* e *Pichia anomala***. Este método permitiu diminuir o tempo e morosidade do processo envolvido nas fermentações, quer na preparação e análise dos meios por HPLC, tornando o processo de escolha muito mais rápido e fácil.

3.6.2 Optimização da etapa de desacidificação

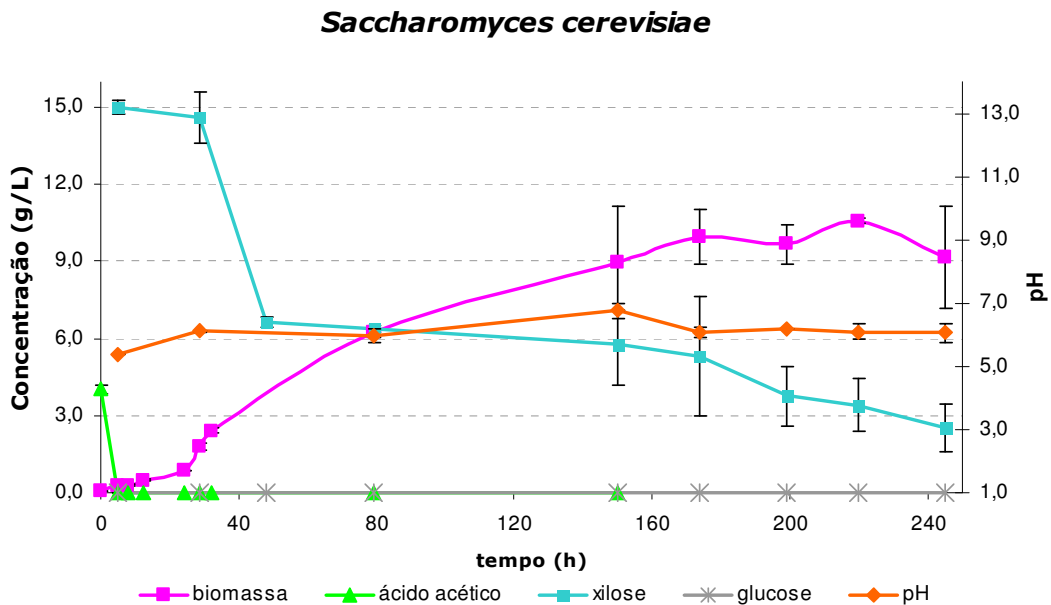
A - Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 26 – Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*.

Na figura 26 pode observar-se que o consumo de ácido acético foi de facto muito rápido e eficaz logo às 20h, acompanhado como era de esperar, de um ligeiro aumento de pH. No entanto, valores tão elevados de pH (maiores que 6,0) talvez possam ser prejudiciais ao metabolismo, o que pode ser facilmente controlado em biorreactor com adição de ácido fosfórico, por exemplo. Depois dá-se o consumo da fonte de carbono mais disponível, a xilose, que é consumida lentamente a partir das 40h até ao final da fermentação. De notar que a glucose presente no licor é muito baixa (1,5- 2,0g/L) e portanto na fermentação está diluída a 60% logo, não é quantificada no HPLC, foi por isso considerada nula em toda a fermentação. A taxa específica de crescimento (μ_0) foi de $0,15 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$.

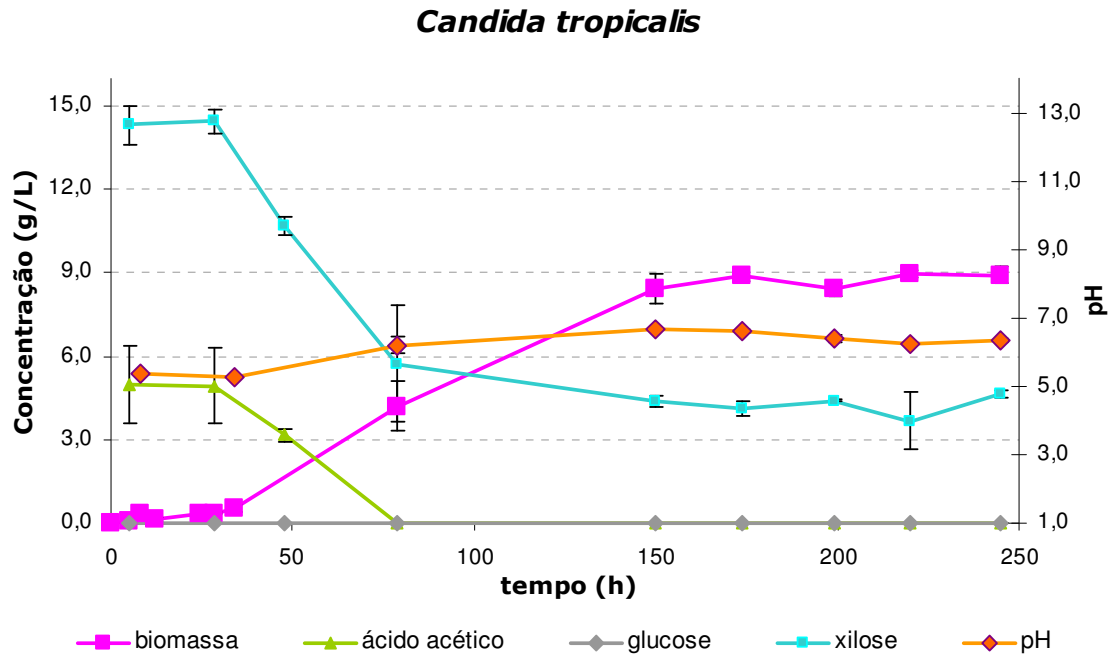
B - Fermentação com *Candida tropicalis*

Figura 27 – Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com *Candida tropicalis*.

Na fermentação representada na figura 27 o consumo de ácido acético já demorou mais tempo, desaparecendo por completo por volta das 70h de fermentação. O pH e a biomassa aumentaram gradualmente e a taxa específica de crescimento (μ_0) foi $0,14 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$. Neste caso, o consumo da xilose mais evidente acompanhou o consumo do ácido acético o que não é conveniente. O que se pretende é que a levedura consuma em primeiro lugar o ácido acético que é o inibidor da fermentação etanólica.

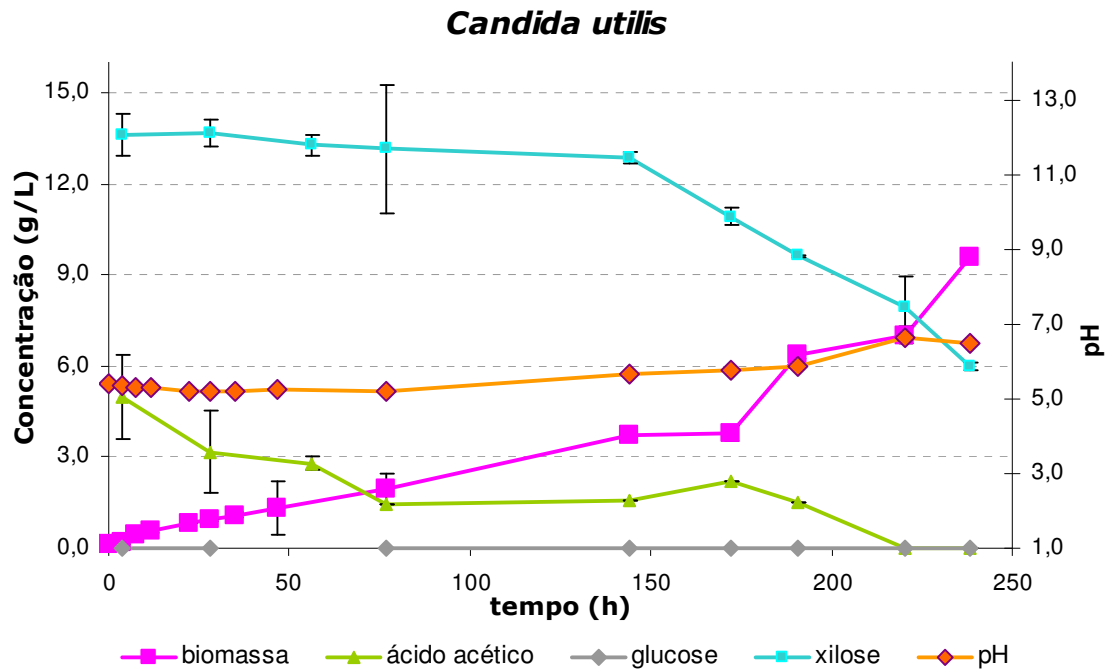
C - Fermentação com *Candida utilis*

Figura 28– Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com *Candida utilis*.

Na figura 28 o ácido acético é consumido muito lentamente durante toda a fermentação, só mesmo às 220h é que desaparece por completo, sendo o seu consumo acompanhado pelo da xilose. Mais uma vez o pH acompanha a diminuição de ácido acético aumentando para valores de 6,6. A taxa específica de crescimento foi ligeiramente mais alta ($0,16 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$).

D - Fermentação com *Pichia anomala*

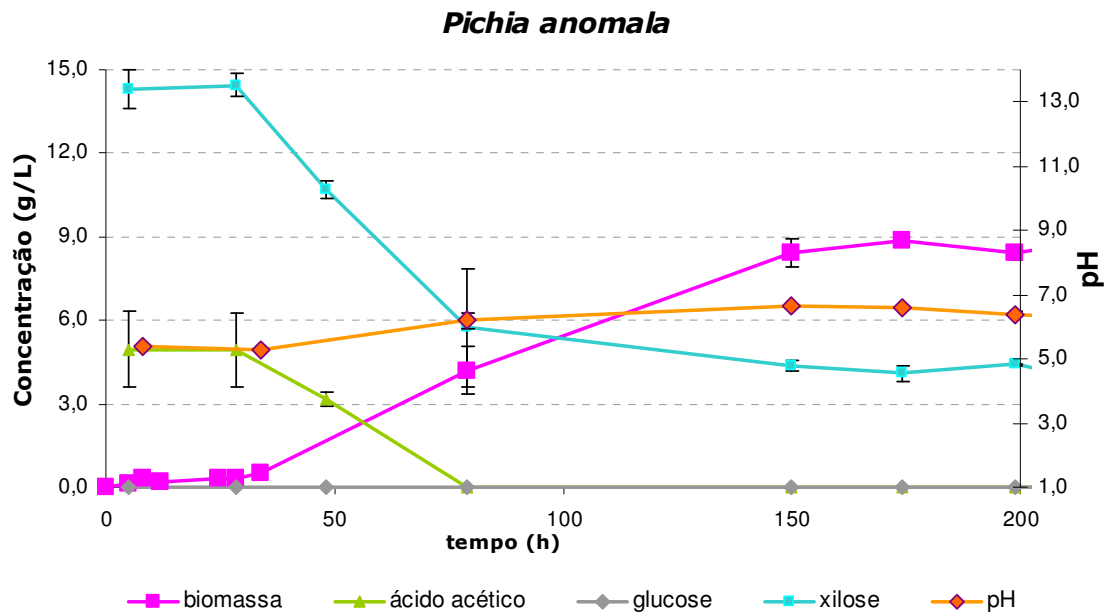


Figura 29 – Gráfico do crescimento e consumos da fermentação com *Pichia anomala*.

Finalmente no gráfico da figura 29 pode ver-se que o ácido também só foi consumido após 70h acompanhado de consumo de xilose. A taxa específica de crescimento no entanto, foi a maior de todas as outras fermentações: $0,22 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, talvez por ser a espécie mais resistente ao licor.

Os resultados obtidos nestas fermentações podem então comparar-se na Tabela 21:

Tabela 21 – Tabela resumo das fermentações com leveduras desacidificantes.

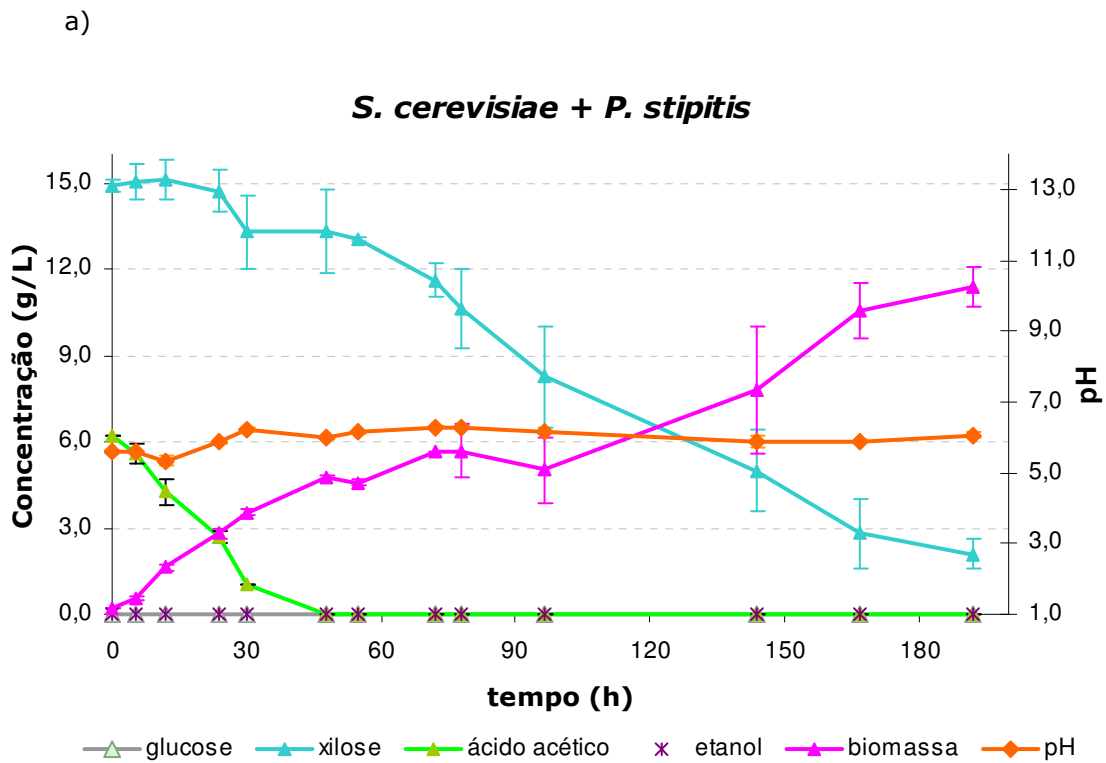
Levedura	$\mu_0 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Consumo completo do ácido acético após (h)	Consumo de xilose* (gL ⁻¹)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$0,15 \pm 0,02$	20	$12,0 \pm 0,6$
<i>Candida tropicalis</i>	$0,14 \pm 0,03$	70	$9,6 \pm 0,4$
<i>Candida utilis</i>	$0,16 \pm 0,05$	220	$7,6 \pm 0,9$
<i>Pichia anomala</i>	$0,22 \pm 0,03$	72	$7,1 \pm 0,3$

* xilose consumida até ao último ponto (das 0h às 240h de fermentação)

Como se pode observar os melhores resultados foram sem dúvida obtidos com a *Saccharomyces cerevisiae*, com um consumo de todo o ácido acético em apenas 20h. Assim, decidiu-se inocular esta levedura antes da *Pichia stipitis* com vista à remoção prévia do ácido. Foram então adoptados dois métodos:

- a) Inoculação da *Saccharomyces cerevisiae* e após 24h inoculação da *Pichia stipitis*;
- b) Inoculação da *Saccharomyces cerevisiae*, e após 24h filtração da biomassa e inoculação da *Pichia stipitis*;

Cada ensaio foi realizado em duplicado e os resultados podem comparar-se nas figuras 30 a) e b) que mostram as médias das duas fermentações.



b)

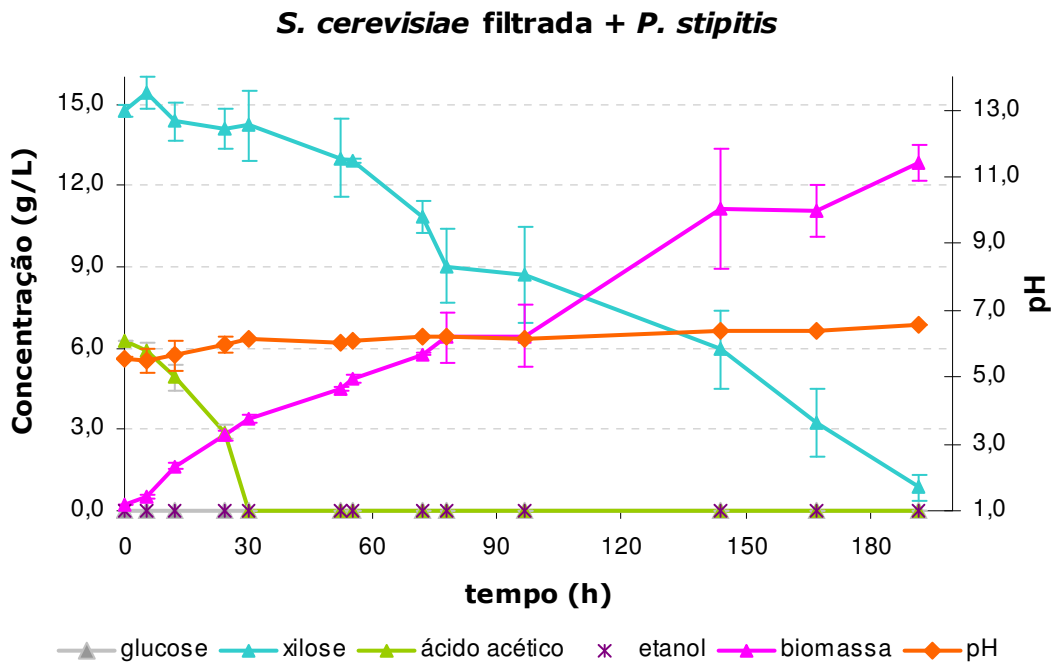


Figura 30 – Curvas de consumos do processo de desacidificação em meio líquido: a) com *Saccharomyces cerevisiae* seguida de adição de *Pichia stipitis* b) com *Saccharomyces cerevisiae* seguida de filtração e adição de *Pichia stipitis*.

Nos gráficos acima representados verifica-se que de facto há consumo da xilose praticamente toda após 8 dias de fermentação, no entanto a conversão para etanol não é conseguida em nenhum dos processos, daí que a filtração da biomassa não trouxe vantagens ao método. De facto evidencia-se um maior consumo da xilose a partir do momento que não há ácido acético, mas ainda assim há inibidores no licor que têm que ser previamente removidos, uma vez que a fermentação etanólica não é conseguida, apesar de ocorrer crescimento microbiano.

3.7 RESINAS DE TROCA IÓNICA

De facto, quer a desacidificação por arrastamento de vapor, quer a desacidificação biológica conseguida com grande sucesso, não promoveram a fermentação dos açúcares a etanol, o que leva a concluir que há outros inibidores no licor, certamente os lenhosulfonatos que estão presentes em grande concentração. Para ultrapassar esta

limitação fez-se uma separação em coluna de permuta iónica e utilizou-se apenas a fracção dos açúcares que daí se obteve para promover a fermentação etanólica.

Este tipo de permuta iónica está já descrito em várias patentes internacionais com o objectivo de separar a xilose do licor ao sulfito ácido para ser posteriormente usada em ração animal [56] ou produtos aromáticos utilizados na indústria alimentar [35].

As soluções obtidas directamente das colunas de troca iónica apresentavam-se praticamente incolores e a sua composição foi determinada por HPLC (Tabela 22). No FT-IR verificou-se apenas vestígios dos lenhosulfonatos.

Tabela 22 – Composição da solução de açúcares recolhida a partir de separação iónica do licor por resinas catiónica e aniónica.

Componente	Concentração (gL⁻¹)
Lenhosulfonatos	Vestígios
Ácido acético	0,0 ± 0,0
pH	5,40 ± 0,05
Xilose	5,7 ± 0,3
Glucose	0,5 ± 0,2

Esta solução foi concentrada quatro vezes em evaporador rotativo, suplementada com Meio Suplementar (MS) e dividida para duas fermentações a pH diferentes (acertado com NH₄OH): uma a 5,8 e outra a 7,0.

FERMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AÇÚCARES

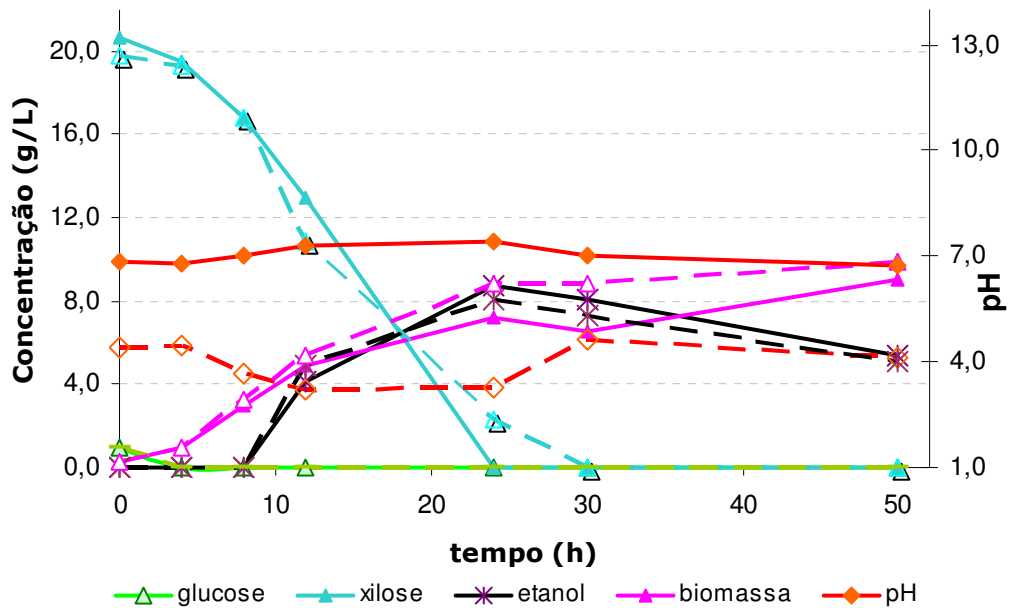


Figura 31- Fermentação da solução de açúcares a pH 7,0 (linhas a cheio) e pH 5,8 (linhas a tracejado).

Tabela 23- Resumo das fermentações com a solução de açúcares a diferente pH.

Parâmetros	pH 5,8	pH 7,0
Etanol (g L^{-1})	8,1	8,8
$Y_{p/s}$ (g etanol/g açúcar consumido)	0,49	0,48
$Q_{p_{\max}}$ (g etanol/L meio fermentado e por h)	1,22	1,04
Eficiência da Conversão (%)	96	94
Consumo Total de açúcares após (h)	30	24

Como se pode observar pelo gráfico da Figura 31 e pela Tabela 23, a *Pichia stipitis* conseguiu consumir todos os açúcares e fermentá-los a etanol. Estas foram de facto as fermentações mais eficientes com uma conversão acima dos 94% e em apenas 24h e 30h a pH 7,0 e 5,8 respectivamente. Apesar de se obter mais etanol a pH 7,0 (cerca de $8,8\text{g L}^{-1}$), a eficiência da conversão foi maior a pH 5,8 assim como a produtividade volumétrica.

Este foi de facto o método mais eficaz na remoção de todos e quaisquer inibidores, no entanto, a recolha da própria solução de açúcares das resinas foi um processo muito demorado e trabalhoso.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objectivo principal o aproveitamento de monossacrídeos presentes no licor ao sulfito ácido, nomeadamente de xilose, para produção de bioetanol. No entanto, logo de início, pôde verificar-se que este licor tem um efeito inibitório na fermentação alcoólica. Com as fermentações em Erlenmeyers verificou-se a variação de metabolismo da *Pichia stipitis* à medida que o volume de licor aumentava no meio de fermentação. O valor máximo assimilado foi 40% (v/v) de licor, uma vez que com 60% (v/v) a levedura já não conseguiu consumir nenhum açúcar e consequentemente produzir etanol. O rendimento máximo obtido foi de 73% com apenas 20% (v/v) de licor e decresceu para 45% com o dobro de licor. Os ensaios prévios em meio sintético provaram que de facto o ácido acético presente no licor ($8,2\text{gL}^{-1}$) é um dos fortes inibidores a eliminar pois, o meio sintético com ácido acético não evidenciou actividade fermentativa. Neste caso, diz-se que a levedura está sob stress ácido. Torna-se portanto necessário atenuar o efeito de inibição do ácido acético permitindo prolongar a fermentação e obter concentrações finais de etanol mais elevadas.

As fermentações em biorreactor tinham como objectivo controlar essencialmente o pH, visto que este é um dos factores importantes para o correcto metabolismo fermentativo, no entanto, não tiveram sucesso. Foi observado um depósito elevado que confirmou-se não ser apenas biomassa, pelo ensaio abiótico. Este depósito, que provavelmente terá origem em precipitações do ácido e da base adicionados ao reactor, influenciou as medições de absorvância que monitorizavam o crescimento e pode ter impedido de algum modo o processo da fermentação. O tipo de geometria e agitação diferentes relativamente ao Erlenmeyer também poderão estar na origem de diferenças ao nível de transferências de oxigénio e de massa no processo fermentativo.

A hidrólise enzimática só se revelou realmente eficaz para elevadas concentrações de enzima. Com 6,0% (m/v) de Econase Wheat P Plus® conseguiu-se aumentar a concentração de glucose cerca de quatro vezes mais e a de xilose para 30%, no entanto é necessário verificar a viabilidade deste processo a nível industrial. Mesmo aumentando a fonte de carbono disponível, as fermentações realizadas não foram bem sucedidas pois continuou-se a tentar os 60% de licor, o que revela que realmente o factor toxicidade presente se sobrepõe à capacidade fermentativa da levedura.

Na remoção de inibidores tentou-se retirar o ácido acético do licor por destilações por arrastamento de vapor e por desacidificação biológica. Nas destilações só se conseguiu remover cerca de 50% do ácido acético. Na desacidificação biológica foram usadas seis leveduras diferentes das quais a *Saccharomyces cerevisiae* se revelou a mais eficiente, consumindo todo o ácido acético em apenas 20h. Ainda assim, a adição

de um inóculo de *Pichia stipitis* após este passo não revelou qualquer produção de etanol após todo o consumo de xilose. A *P. stipitis* usou a xilose apenas para crescimento e manutenção.

Conclui-se então que outros compostos inibidores como os lenhosulfonatos e os compostos fenólicos, estejam a bloquear o processo fermentativo e a sua remoção praticamente completa fez-se usando colunas de resinas de troca iónica. Deste processo resultou uma solução rica em xilose praticamente incolor que depois de concentrada foi usada em duas fermentações a diferentes valores de pH. A pH 5,8 obteve-se uma eficiência mais elevada (96%), no entanto o consumo de xilose demorou mais 6h do que a pH7,0 onde a eficiência foi ligeiramente menor (94%). Conclui-se portanto que um pH intermédio, talvez 6,5 fosse o ideal. De facto, este foi o método mais eficaz na remoção conjunta de todos os inibidores (ácido acético, lenhosulfonatos, furfural, fenólicos, etc.), tornando conseqüentemente as fermentações com a *Pichia stipitis* extremamente rápidas e eficientes. Este estudo permitiu verificar que a fermentação directa do licor não permite a produção de bioetanol, mas que esta pode ser conseguida depois de uma separação e concentração dos monossacarídeos fermentáveis com elevados rendimentos e produtividades. No entanto, há que associar sempre ao produto final, o custo total deste processo de separação quanto à viabilidade de produção à escala industrial.

5. BIBLIOGRAFIA

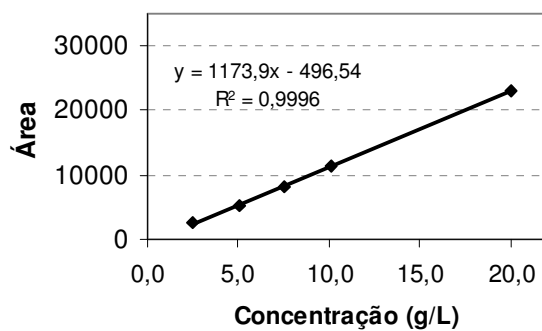
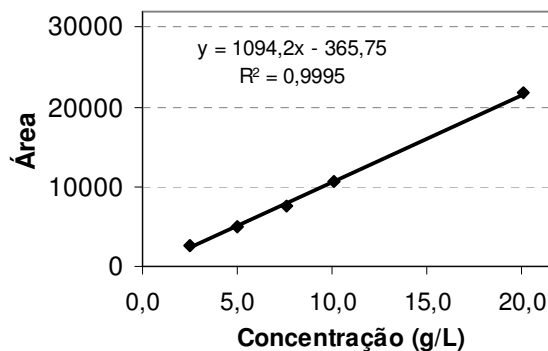
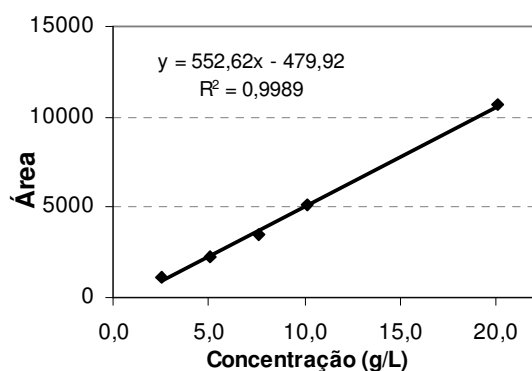
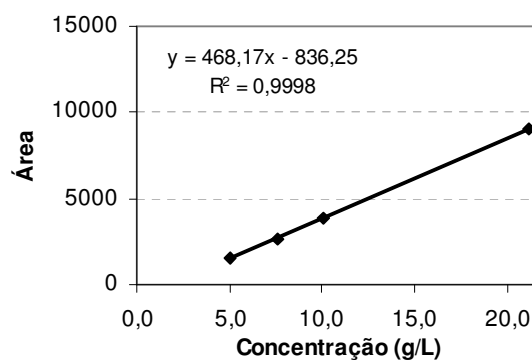
1. Bernardo J., D.G.E.G., *Biocombustíveis: Políticas, Legislação e Incentivos*. 2007: Almada.
2. <http://www.alternative-energy-news.info/technology/biofuels/>. (Janeiro, 2008)
3. Dermibas, A., *Progress and Recent trends in biofuels*. Progress in Energy and Combustion Science, 2007(33)1-18.
4. <http://www.biofuelstp.eu/> (Novembro, 2007)
5. <http://www.portugal.gov.pt>. Plano Nacional para as Alterações Climáticas. (Dezembro, 2007)
6. <http://www.biodieselbr.com> (Janeiro, 2008)
7. Demirbas, A., *Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass*. Energy Sources, 2005. 27327-337
8. <http://www.eubia.org>, Association E.B.I. (Janeiro, 2008)
9. <http://genome.jgi-psf.org/Picst3.home.html> (Dezembro, 2007)
10. Agbogbo, F.K., et al., *Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis*. Process Biochemistry, 2006. 41(11)2333-2336
11. Chandrakant, P., Bisaria, V.S., *Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol*. Critical Reviews in Biotechnology, 1998. 18(4)295-331.
12. Kurtzman, C. P., Fell, J.W., *The Yeasts. A taxonomic study*. 4th ed. 1996.
13. Schuller, D.E., *Desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial para a levedura de contaminação alimentar Zygosaccharomyces bailii*, Tese de Mestrado in Departamento de Biologia. 1998, Universidade do Minho
14. Thornton, R.J., Rodriguez, S. B., *Deacidification of red and white wines by a mutant of Schizosaccharomyces maliderovans under commercial winemaking conditions*. Food Microbiology, 1996(13)475-482
15. Yu, Z., Zhang, H., *Pretreatments of cellulose pyrolysis for ethanol production by Saccharomyces cerevisiae, Pichia stipitis YZ-1 and Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy, 2003(24)257-262
16. Alexander, M.A., Chapman, T.W., *Continuous ethanol production from D-xylose by Candida shehatae*. Biotechnology and Bioengineering, 1987. 30685-691
17. Kesava, S.S., Rakshit, S. K., Panda, T., *Production of ethanol by Zymomonas mobilis: the effect of batch step-feeding of glucose and relevant growth factors*. Process Biochemistry, 1995. 30(1)41-47.
18. Ruanglek, V., Maneewatthana, D., Tripetchkul, S., *Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bioethanol production by Zymomonas mobilis*. Process Biochemistry, 2006(41)1432-1437.
19. Panesar, P.S., Marwaha, S. S., Kennedy, J.F., *Zymomonas mobilis: an alternative ethanol producer*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006(81)623-635
20. Taherzadeh M. J., F., M., Hjorth, H., Edebo, L., *Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology, 2003(88)167-177
21. [http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_\(biochemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Fermentation_(biochemistry)) (Novembro, 2007).

22. Mc Millan, J.D., *Hemicellulose conversion to ethanol. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization.* , ed. C. E. 1996. , Washington, DC. 287-313
23. Bruinenberg, P.M., de Bot, P. H., van Dijken, J. P., and W.A. and Scheffers, *NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeast.* Applied Microbiology Biotechnology, 1984, (19)256-260
24. Dien, S.B., Hespell, R. B., Wyckoff, H. A., Bothast, R. J., *Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic E. coli strain.* Enzyme and Microbial Technology, 1998(23)366-371.
25. Dien, B.S., Cotta, M. A., Jeffries, T.W., *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status.* Applied Microbiology Biotechnology, 2003(63)258-266
26. Jeffries, T.W., Jin, Y.-S., *Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts.* Applied Microbiology Biotechnology, 2004(63)495-509.
27. Hägerdal-Hahn B. , S., K., *Effect of oxygenation on xilose fermentation by Pichia stipitis.* Applied and Environmental Microbiology, 1990. (54)3389-3394.
28. Nigam, J.N., *Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of Pichia stipitis.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnonology, 2001. 26145-150
29. Slininger, P.J., Dien, B. S., Gorsich, S. W., Liu, Z. L., *Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast Pichia stipitis NRRL Y-7124.* Applied Microbial and Cell Physiology, 2006(72)1285-1296.
30. Mussatto, S.I.R.I.C., *Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative process: a review.* Bioresource Technology, 2004(93)1-10.
31. Agbogbo, F.K., Wenger, K. S., *Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by Pichia stipitis.* Biotechnology Letters, 2006(28)2065-2069.
32. Agbogbo, F.K., Wenger, K. S., *Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using Pichia stipitis.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnonology, 2007(34)723-727.
33. Hägerdal-Hahn B., P., E., *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification.* Bioresource Technology, 2000(74)17-24.
34. Hägerdal-Hahn B., P.E., *Fermentation of lignocellulosic hydrolyisates II: inhibitors and mechanisms of inhibition.* Bioresource Technology, 2000(74)25-33.
35. Jeewon, L., *Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.* Journal of Biotechnology, 1997. 561-24.
36. <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=234&ordem=1&canal=5> (Novembro, 2007)
37. Ragauskas, A., Nagy, M., Kim, D. H., *From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production.* Industrial Biotechnology, 2006. 2(1)55-62.
38. Biermann, C.J., *Handbook of pulp and papermaking.*, 1996, 2nd Edition, Academic Press.
39. <http://www.ecy.wa.gov/programs/air/pdfs/pulpmil3.pdf> (Outubro, 2007)
40. Kirk, T., Farrell, R., *Enzimatic "combustion": the microbial degradation of lignin.* Annual Review of Microbiology, 1987(41)465-505.

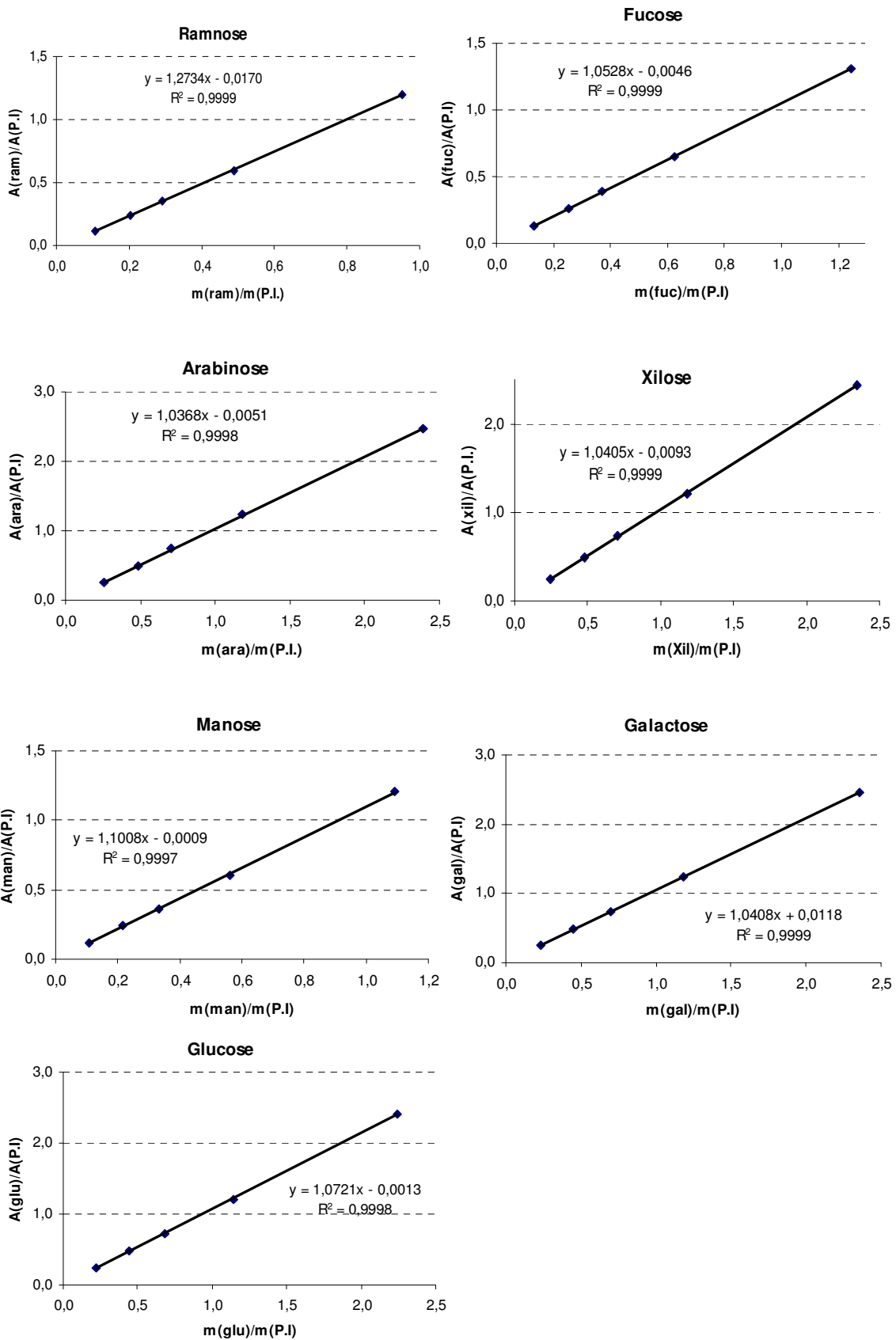
41. Sjöström, E., *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. 2nd ed. 1993: Academic Press.
42. Myrvold, B.O., *A new model for the structure of lignosulphonates Part 1. Behaviour in dilute solutions*. *Industrial Crops and Products*, 2008(27)214-219.
43. Imai, T., Ohono, T., *The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Applied Environmental Microbiology*, 1995(61)3604-3608.
44. Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., Nilvebrant, N.O., *The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood*. *Enzyme Microbial Technology*, 1998(24)151-159.
45. Parajó, J.C., Dominguez, H., Dominguez, J.M., *Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates*. *Bioresource Technology*, 1998(66)25-48.
46. Marques, A.P., Evtuguin, D.V., Magina, S., Amado, F.M.L., Prates, A. *Study of the chemical composition of sulphite spent liquor from acidic magnesium-based sulphite pulping of *Eucalyptus globulus**. in European Workshop on Lignocellulosic and Pulp. 25-28 Agosto 2008. Estocolmo, Suécia.
47. Hernandez-Pérez, G., Goma, G., Rols, J.L., *Degradation of lignosulfonated compounds by *Streptomyces viridosporus*: effect of the culture medium and the nature of the lignosulfonate molecule*. *Water Reserach*, 1999. 33(8)1837-1844.
48. Yang, B., Wyman, C. E., *Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol*. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 2008(2)26-40.
49. Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996. 18312-331.
50. Dominguez, J.M., Gong, C.S., Tsao, G. T., *Pretreatment of sugar bagasse hemicellulose hydrolyzate for xylitol production by yeast*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996. 5749-56
51. Van Zyl, C., Prior, B. A., du Preez, J. C., *Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis**. *Enzyme and Microbial Technology*, 1991. 1382-86.
52. Schneider, H., *Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using a mutant yeast*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996(19)94-98.
53. Hoebler, C., *Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1989. 37(2).
54. Li, A., Anttizar-Ladislao B., Khraisheh, M., *Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bioethanol production*. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 2007. (30)189-196.
55. <http://www.enzymedevelopment.com/pdf/Assays%20-%20pfd/Birch%20Xylan%20Unit%20BXU-UNC.pdf>. (Novembro, 2007)
56. <http://www.megazyme.com/downloads/en/data/S-AXBP.pdf>. (Novembro, 2007)
57. van Leeuwenhok, A., *Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status*. *Springer Science* 2006(90)391-418.
58. Eklund, R., Zacchi, G., *Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995(17)255-259.

59. Kadam, K.L., Schmidt, S. L., *Evaluation of Candida acidothermophilum in ethanol production from lignocellulosic biomass*. Applied Microbiology Biotechnology, 1997. 48709-713.
60. Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., *Food Chemistry*. 3rd ed, ed. Springer-Verlag. 2004, Germany. 267.
61. Limtong, S., Sumpradit, T., Kitpreechavanich, V., Tuntirungkij, M., Seki, T., Yoshida, T., *Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and Saccharomyces cerevisiae*. Kasetsart Journal (Nature Science), 2000. 1(34)64-73.

6. ANEXOS

ANEXO 1 – Rectas de Calibração (HPLC)**Recta de Calibração da Glucose****Recta de Calibração da Xilose****Recta de Calibração do Ácido Acético****Recta de Calibração do Etanol**

ANEXO 2 – Retas de Calibração (GC-FID)



ANEXO 3 – Gráficos correspondentes às fermentações em Erlenmeyers

BATCH I - ERLENMEYER COM 0% HSSL

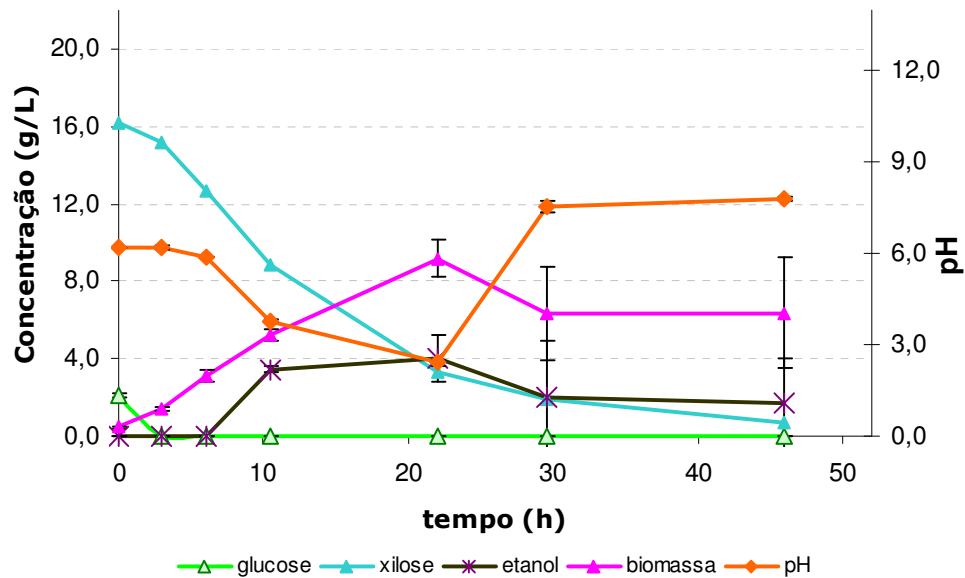


Figura 32- Fermentação em meio suplementar (MS) e 0% de licor.

BATCH II - ERLENMEYER COM 20% HSSL

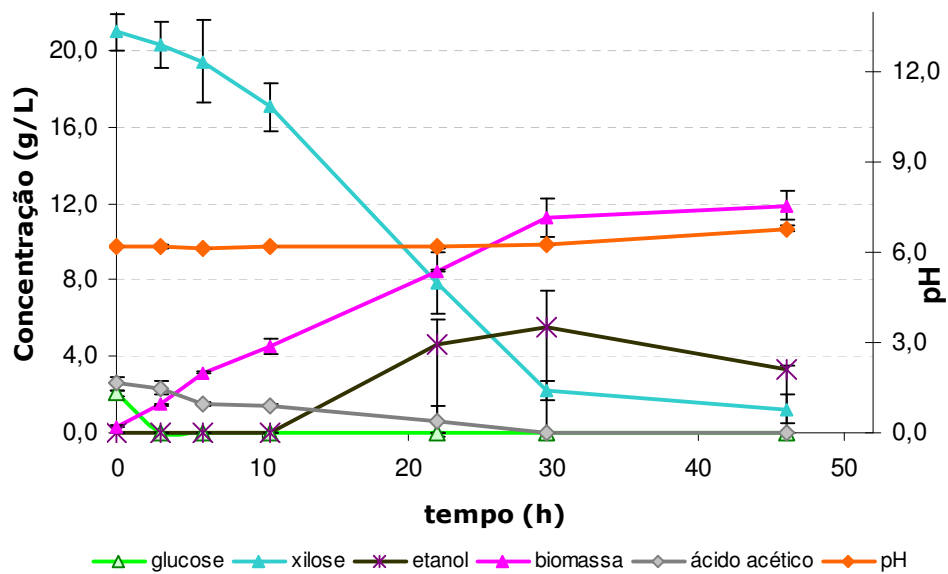


Figura 33 - Fermentação com 20% de licor.

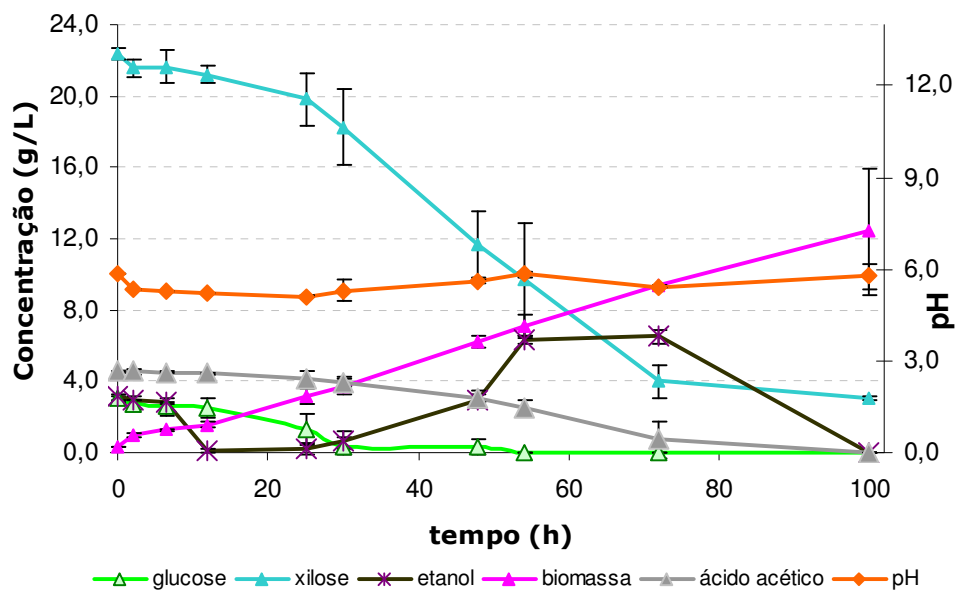
BATCH III - ERLLENMEYER COM 40% HSSL

Figura 34 – Fermentação com 40% de licor

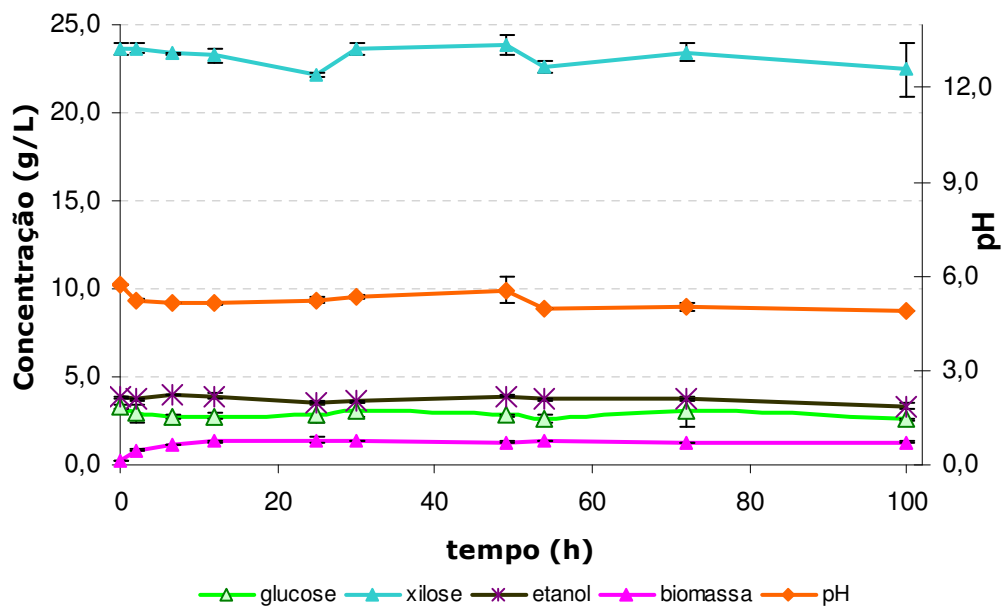
BATCH IV - ERLLENMEYER COM 60% HSSL

Figura 35 – Fermentação com 60% de licor.

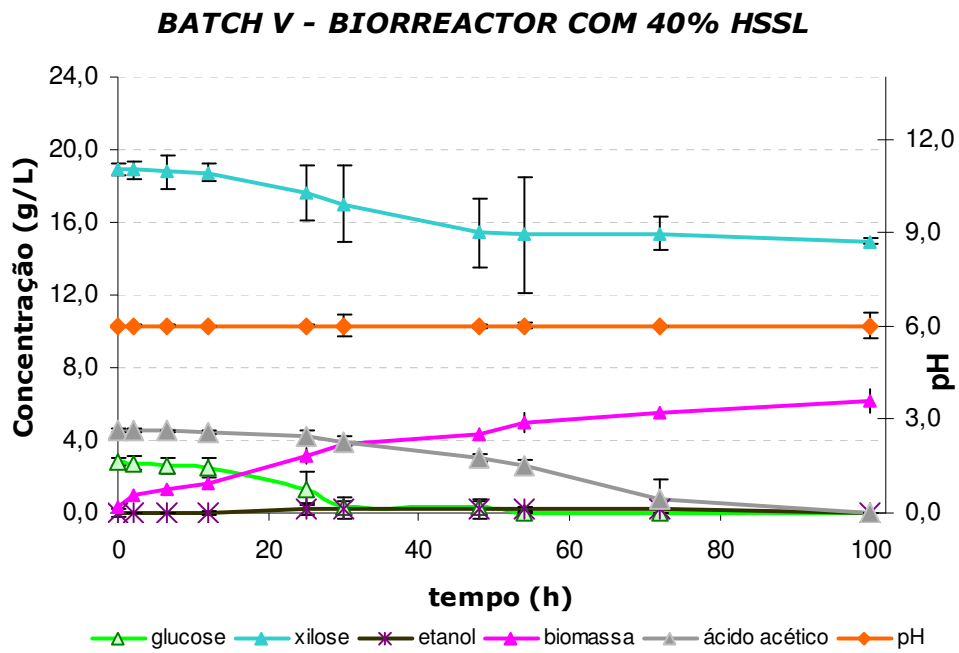


Figura 36 - Fermentação com 40% de licor em biorreator.

ANEXO 4 – Espectro de FT-IR relativo ao ensaio abiótico.

