



Valorização da Drêche Cervejeira: Fermentação de Pentoses

TOMÁS FELISMINO FURTADO TAVARES

Julho de 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente tornaram possível a concretização deste trabalho e me proporcionaram as condições necessárias para que atingisse mais uma meta importante na minha vida. Permitam-me que vos diga MUITO OBRIGADO:

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Nídia Sá Caetano, pelo incentivo, sentido crítico e apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Tecnologia Química do Instituto Superior da Engenharia do Porto (ISEP), o engenheiro Tomás, a engenheira Magda, a engenheira Marília e D. Lurdes pela disponibilidade e apoio demonstrados ao longo do trabalho com todo o profissionalismo.

À directora de laboratório de Tecnologia Química do Instituto Superior da Engenharia do Porto (ISEP) a Engenheira Teresa Sena Esteves.

Aos engenheiros Abel Duarte e engenheira Aurora Silva também pela disponibilidade e apoio demonstrados ao longo do trabalho com todo o profissionalismo.

A minha mãe Maria Augusta, aos meus irmãos, aos meus cunhados e sobrinhos; à minha família Maria Veiga, Myrian Tavares e Maira Tavares gostaria de expressar um agradecimento muito especial pelo carinho, amizade e paciência que demonstraram durante o período da realização desta tese.

Gostaria ainda de expressar a minha gratidão aos meus novos e velhos amigos David Andrade, Procópio Pires, Ivaldino Soares, Diana Meireles, Mestre Raquel Moura e Mestre Dilson Pereira pelos apoios e incentivos durante todo este processo.

À Universidade de Cabo Verde, aos meus colegas da mesma Universidade e aos meus amigos de Nhagar.

À UNICER, pelo financiamento do projecto PP-IJUP2012-UNICER- 6: Valorização da Drêche na Produção de Bioetanol: Otimização das Etapas de Fermentação de Pentoses e Recuperação de Etanol e de Açúcares não Fermentados e pelo apoio na realização de análises de determinação do teor de álcool no licor de fermentação.

Obrigado Meu Deus pela tua grandeza, pelo teu amor incondicional. Obrigado pelo carinho, pelo cuidado com a minha pessoa e com a minha família, por nunca desistir de mim, por me amparar em meus momentos tristes.

Sumário

O presente trabalho tem como objetivo a otimização da etapa de fermentação dos açúcares obtidos a partir da drêche cervejeira para produção do bioetanol através da utilização das leveduras *Pichia stipitis* NCYC 1541 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 2791 como agentes fermentativos. O meio de cultura usado para manter as culturas destas leveduras foi *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD). O principal propósito deste trabalho foi o de encontrar alternativas aos combustíveis fósseis, pautando-se por soluções inofensivas para o meio ambiente e sustentáveis.

Assim, o trabalho está dividido em quatro etapas: 1) caracterização química e biológica da drêche; 2) pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática para primeiramente quebrar as moléculas de lenhina que envolvem os polímeros de celulose e hemicelulose e em seguida romper as ligações poliméricas destas macromoléculas por ação enzimática e transforma-las em açúcares simples, respetivamente, obtendo-se então a glucose, a maltose, a xilose e a arabinose; e, por último, 3) otimização da etapa de fermentação da glucose, maltose e das pentoses que constitui a condição essencial para se chegar à síntese do bioetanol de um modo eficiente e sustentável e 4) a recuperação do bioetanol produzido por destilação fracionada. A quantificação dos açúcares libertados no processo foi feita recorrendo a análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste estudo foram identificados e quantificados cinco açúcares: Arabinose, Glucose, Maltose, Ribose e Xilose.

Na etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram usados os ácidos clorídrico (HCl) e nítrico (HNO₃) com a concentração de 1% (m/m), e as enzimas *Glucanex 100g* e *Ultraflo L*.

Foram testadas seis condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática, alterando os parâmetros tempo de contacto e razão enzimas/massa de drêche, respetivamente, e mantendo a temperatura (50 °C), velocidade de agitação (75 rpm) e concentração dos ácidos (1% (m/m)). No processamento de 25 g de drêche seca com 0,5 g de *Glucanex*, 0,5 mL de *Ultraflo* e um tempo de reação de 60 minutos para as enzimas foi obtida uma eficiência de 15%, em hidrolisado com 6% da celulose.

Realizou-se a fermentação do hidrolisado resultante do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática de drêche cervejeira e de meios sintéticos preparados com os açúcares puros, usando as duas estirpes selecionadas para este estudo: *Pichia stipitis* NCYC 1541 e *Kluyveromyces marxianus* NYCY 2791. As eficiências de fermentação dos açúcares nos meios sintéticos foram superiores a 80% para ambas as leveduras. No entanto, as eficiências de fermentação do hidrolisado da drêche foram de 45,10%

pela *Pichia stipitis* e de 36,58 para *Kluyveromyces marxianus*, para um tempo de fermentação de 72 horas e à temperatura de 30 °C. O rendimento teórico em álcool no hidrolisado da drêche é de 0,27 g/g, três vezes maior do que o real (0,0856 g/g), para *Pichia stipitis* e de 0,19 g/g seis vezes maior do que o real (0,0308 g/g), para a *Kluyveromyces marxianus*.

Palavras-chave

Ambiente, Bioetanol, Drêche cervejeira, Fermentação, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 2791, *Pichia stipitis* NCYC 1541.

Abstract

The present work aims to optimize the fermentation of sugars obtained from the brewer's spent grains for bioethanol production by using the yeasts *Pichia stipitis* NCYC 1541 and *Kluyveromyces marxianus* NCYC 2791 as fermenting agents. The culture environment used for growing the yeasts was Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD). The main purpose of this work is to find alternatives to fossil fuels and is driven by solutions harmless to the environment.

The work is divided into four steps: chemical and biological characterization of brewer's spent grains (BSG); acid and enzymatic hydrolysis to first break the lignin molecules involving cellulose and hemicellulose polymers and then break the bonds of these polymeric macromolecules by enzymatic action and transform them into simple sugars, respectively, thus producing glucose, maltose, xylose and arabinose; optimization step of glucose and pentose fermentation which is the essential condition for reaching the synthesis of bioethanol in an efficient and sustainable manner and finally bioethanol recovery. The quantification of sugars released in the process was done by using high performance liquid chromatography (HPLC). This study identified five sugars: arabinose, glucose, maltose, ribose and xylose.

For the pre-treatment and enzymatic hydrolysis step we used hydrochloric acid (HCl) and nitric acid (HNO₃) at 1% (m /m) of concentration, *Ultraflo L* and *Glucanex 100g* enzymes.

Six conditions of pre-treatment and enzymatic hydrolysis were tested, altering some parameters: contact time and the amount of enzymes, respectively, maintaining the temperature (50 °C), speed of agitation (75 rpm) and concentration of the acids (1% (w / w)). With 0.5 g of *Glucanex*, 0.5 mL of *Ultraflo* and 60 minutes of reaction time for the enzymes it was achieved 15% of efficiency in obtaining a hydrolyzate from a sample of BSG with 6% of cellulose

The hydrolyzed resulting from the acid pretreatment and enzymatic hydrolysis and a synthetic medium prepared with the same simple sugars, it was tested the process of fermentation with the two strains mentioned above in the text. The efficiencies for the synthetic medium with both yeasts were higher than 80%, after 72 h of fermentation time at a temperature of 30 °C. In what concerns the fermentation of the liquor resulting from the BSG pre-treatment and hydrolysis, the fermentation yield was substantially lower, of 45.10% for the *Pichia stipitis*, and of 36.58% for the *Kluyveromyces marxianus*, which is probably due to the presence of inhibitory compounds resulting from the process. The theoretical yield in alcohol in hydrolysates of brewery's spent

grains is of 0.27 g/g for *Pichia stipitis*, which is three times larger than the actual (0.0856 g/g) and 0.19 g/g for *Kluyveromyces marxianus* which is six times larger than the actual (0.0308 g/g).

Keywords

Bioethanol, brewer's spent grains (BSG), Fermentation, *Kluyveromyces marxianus* NCYC 2791, *Pichia stipitis* NCYC 1541.

Índice

Índice de Figuras	v
Índice de tabelas	vii
Nomenclatura	ix
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	2
1.1.1. Produção do bioetanol.....	2
1.1.2. Produção mundial de etanol	3
1.1.3. Produção Europeia de bioetanol.....	5
1.1.4. Produção nacional	6
1.2. Objetivos.....	7
1.2.1. Objectivos gerais.....	7
1.2.2. Metodologia	7
1.3. Estrutura de trabalho	7
2. Estado de Arte	9
2.1. Composição da drêche cervejeira	9
2.1.1. Celulose	11
2.1.2. Hemicelulose	11
2.1.3. Lenhina.....	12
2.1.4. Glucose, xilose, arabinose	13
2.2. Etapas da produção do etanol.....	13
2.2.1. Pré-tratamento	14
2.2.1.1. Pré- tratamento físico.....	14
2.2.1.2. Pré-tratamento químico	14
2.2.1.3. Pré-tratamento físico-químico	14
2.2.1.4. Pré-tratamento ácido.....	15
2.2.1.5. Pré-tratamento alcalino	15
2.2.2. Hidrólise enzimática	15
2.2.2.1. Enzimas.....	16
2.2.2.2. Factores que afetam as reações enzimáticas.....	18
2.2.3. Fermentação.....	21
2.2.3.1. Leveduras.....	22
2.2.3.2. Fungos	22

2.2.3.3.	Bactérias	23
2.2.3.4.	Fatores que afetam a fermentação alcoólica	23
2.2.3.5.	SHF versus SSF	23
2.2.4.	Recuperação do etanol	26
2.2.5.	Avaliação da eficiência do processo	27
3.	Descrição técnica	29
3.1.	Materiais e Métodos	29
3.1.1.	Caracterização de drêche cervejeira	29
3.1.1.1.	Teor da humidade	29
3.1.1.2.	Teor de Cinzas	29
3.1.1.3.	Análise granulométrica	29
3.1.1.4.	Poder Calorífico Superior	30
3.1.1.5.	Teor de matéria gorda	30
3.1.1.6.	Teor de celulose bruta	30
3.1.1.7.	Teor de lenhina	31
3.1.1.8.	Teor de carbono orgânico total	31
3.1.1.9.	Teor de hemiceluloses	32
3.1.2.	Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática	32
3.1.3.	Fermentação dos Açúcares Resultantes do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática	33
3.1.3.1.	Microorganismos Usados na Fermentação	33
3.1.3.2.	Preparação de Inóculo	33
3.1.3.3.	Condições de Fermentação	34
3.1.4.	Avaliação da Eficiência do Processo de Produção de Bioetanol.	34
3.1.5.	Recuperação do Bioetanol	35
3.2.	Resultados e Discussão	36
3.2.1.	Caracterização de drêche cervejeira	36
3.2.1.1.	Teor de humidade	36
3.2.1.2.	Teor da Cinzas	36
3.2.1.3.	Granulometria	36
3.2.1.4.	Poder calorífico superior	37
3.2.1.5.	Teor de matéria gorda	37

3.2.1.6.	Teor de celulose	37
3.2.1.7.	Teor de lenhina	37
3.2.1.8.	Teor de carbono orgânico total	37
3.2.1.9.	Teor de hemiceluloses	37
3.2.2.	Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática	38
3.2.3.	Fermentação dos Açúcares Resultantes do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática	43
3.2.4	Recuperação do Bioetanol	50
3.3.	Conclusões	51
3.4	Trabalhos futuros.....	53
	Referencias	55
	Anexo A. Caracterização da Drêche Cervejeira	59
	Anexo B: Curvas de Calibração para os Açúcares Simples, Quantificados por HPLC, Usadas para Avaliação da Eficiência do Processo de Produção de Bioetanol	64
	Anexo B I: Avaliação da Eficiência do Processo de Produção de Bioetanol	67
	Exemplo de cálculo para determinação da eficiência total de fermentação.	68
	Exemplo de cálculo para determinação da massa do etanol teórico.....	71
	Determinação do volume, da massa e do rendimento de álcool em 12,3 g de açúcar totais/100 g da drêche seca. Massa volúmica do etanol é de 789 g/L.	72

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Produção mundial de etanol (em milhões de litros) (ICNA, 2013).	4
Figura 1.2 – Expansão mundial do mercado de bioetanol (adaptado de OECD-FAO, 2010-2019).	4
Figura 1.3 – Expansão mundial do mercado de biodiesel (adaptado de OECD-FAO, 2010-2019).	5
Figura 1.4 – Mercados de etanol dominados pelos EUA, Brasil e a UE. Distribuição regional da produção mundial de etanol e o seu uso estimados em 2019. Adaptado de (OECD-FAO, 2010-2019)	5
Figura 1.5 – Consumo energético no Setor de Transportes Europeu em 2012 por tipo de biocombustível. Adaptado de (Euroserv`ER, 2013).....	6
Figura 2.1 – Composição da parede celular de biomassa lenho-celulósica (Neitzel, 2013).	10
Figura 2.2 – Estrutura molecular de um segmento de uma cadeia de celulose a) representação da ligação entre glucose $\beta(1-4)$ (Berg, et al., 2004), b) representando a rotação de 180° (Nelson & Cox, 2005),e c) estrutura da molécula de celulose com as respectivas ligações de hidrogénio (Veira, 2009).....	11
Figura 2.3 – Representação da estrutura molecular de hemicelulose (Santos, et al., 2012).	12
Figura 2.4 – Estrutura da lenhina: a) estrutura tridimensional de um fragmento do polímero de lenhina, sendo visíveis as 4 cadeias de xilanas (amarelo), b) monómero dos polímeros da lenhina (Klock, et al., 2005).....	12
Figura 2.5 – Representação química das moléculas de glucose, xilose e arabinose (Ferreira, 2009)	13
Figura 2.6 – Influência da concentração de substrato na velocidade da reacção (Berg, et al., 2004).	19
Figura 2.7 – Efeito do pH na velocidade da reacção enzimática (Cabral, et al., 2003).....	19
Figura 2.8- Representação esquemática de um modelo de “chave-e-fechadura” (Berg, et al., 2004).	20
Figura 2.9 – Efeito da temperatura na velocidade da reacção (Cabral, et al., 2003).	20
Figura 2.10 – Diagrama de blocos de um processo de SHF (Almeida, 2013. Adaptado).	24
Figura 2.11 – Diagrama de blocos de um processo de SSF (Almeida, 2013. Adaptado).	24
Figura 3.1 – Bomba calorimétrica usada na determinação do Poder Calorífico Superior	30
Figura 3.2 – Aparelho Solid Sample Module (Shimadzu) usado na determinação do teor de COT.....	31
Figura 3.3 – Fluxograma das etapas de Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática.	33
Figura 3.4 – HPLC e acessórios, usado na quantificação dos açúcares.	35

Figura 3.5 – Representação de analisador Anton Paar. Fonte UNICER.....	35
Figura 3.6 – Distribuição granulométrica da drêche	36
Figura 3.7 – Composição química da drêche cervejeira.....	38
Figura 3.8 – Açúcares obtidos após a aplicação do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática, nos diversos ensaios.....	39
Figura 3.9 – Percentagem dos açúcares totais obtidos em relação à massa processada.	42
Figura 3.10 – Percentagem das pentoses obtidas em relação à massa de drêche processada em cada um dos Ensaio.....	42
Figura 3.11 – Percentagem das hexoses obtidas em relação à massa de drêche processada em cada um dos Ensaio.....	43
Figura 3.12 – Evolução da massa de cada um dos açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por <i>Pichia stipitis</i> (resultados experimentais) e massa de etanol expectável no meio.....	44
Figura 3.13 – Evolução da massa de açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por <i>Pichia stipitis</i> (resultados experimentais) e massa de etanol expectável no meio (réplica).	45
Figura 3.14 – Evolução da massa de açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por <i>Kluyveromyces marxianus</i> (resultados experimentais) e massa de etanol no meio	45
Figura 3.15 – Evolução da massa de açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por <i>Kluyveromyces marxianus</i> (resultados experimentais) e massa de etanol no meio (réplica). ...	45
Figura 3.16 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por <i>Pichia stipitis</i>	47
Figura 3.17 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por <i>Pichia stipitis</i> (réplica).....	47
Figura 3.18 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por <i>Kluyveromyces marxianus</i>	48
Figura 3.19 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por <i>Kluyveromyces marxianus</i> (réplica).	48
Figura A 1. Reta de calibração.....	63
Figura B1 – Curva de calibração para a arabinose, ribose e xilose	64
Figura B2 – Curva de calibração para a maltose e glucose	65
Figura BI 1 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por <i>Pichia stipitis</i> (réplica II).....	70
Figura BI 2 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por <i>Kluyveromyces marxianus</i> (réplica II).	71

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Composição química da drêche.	10
Tabela 2.2 – Composição química dos diferentes lotes de drêche (Unicer).	10
Tabela 2.3 – Nomenclatura e classificação de enzimas (Cabral, et al., 2003).	17
Tabela 2.4 – Resultados obtidos no estudo do pré-tratamento e hidrólise enzimática de 25 g de drêche com a adição sequencial e em mistura dos ácidos (HCl e HNO ₃) e adição sequencial das enzimas (<i>Glucanex 100g e Ultraflo L</i>). Adaptado de (Moura, 2012)	18
Tabela 2.5 – Comparação entre o rendimento de etanol a partir de SSF (após 120 h) e SHF (após 120 h de hidrólise e 24 h de fermentação). Adaptado de (Öhgren, et al., 2007).....	25
Tabela 2.6 – Comparação da eficiência de fermentação em amostras de hidrolisados e em meios sintéticos contendo glucose e/ou Xilose.....	26
Tabela 3.1 – Condições experimentais e conversão dos açúcares para os Ensaio 1 a 3.....	40
Tabela 3.2 – Condições experimentais e conversão dos açúcares para os Ensaio 4 a 6.....	41
Tabela 3.3 - Composição em açúcares do meio de fermentação sintético (1000 mL de solução).	44
Tabela 3.4 – Eficiência de fermentação dos hidrolisados da drêche e de meios sintéticos e os respectivos rendimentos experimental.	49
Tabela A.1 - Determinação de teor de humidade e teor de sólidos na amostra normal	59
Tabela A.2 - Determinação de teor de humidade e teor de sólidos na amostra congelada.....	59
Tabela A.3 - Determinação de teor de cinzas.....	59
Tabela A.4 – Determinação da distribuição granulométrica	60
Tabela A.5 – Determinação do poder calorífico da drêche cervejeira (em base seca).....	60
Tabela A.6 – Determinação do teor de matéria gorda	61
Tabela A.7 – Determinação de teor de celulose	61
Tabela A.8 – determinação do teor da lenhina de Klason	61
Tabela A.9 – determinação do teor da lenhina solúvel.....	62
Tabela A. 10. Valores auxiliares determinados para traçar a curva de calibração.....	62
A tabela A.11 – Valores obtidos no cálculo do teor de Carbono Orgânico Total.....	63
Tabela A 12 – Determinação do teor de hemiceluloses.	63
Tabela B 1 – Valores auxiliares usados para determinar a curva de calibração de arabinose, ribose e xilose.....	64
Tabela B 2 – Valores auxiliares usados para determinar a curva de calibração de glucose e maltose.....	65

Tabela BI 1 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura <i>Pichia stipitis</i>	67
Tabela BI 2 – Réplica do Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura <i>Pichia stipitis</i>	67
Tabela BI 3 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	68
Tabela BI 4 – Réplica do consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	68
Tabela BI 5 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Pichia stipitis</i>	69
Tabela BI 6 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Pichia stipitis</i> (réplica).....	69
Tabela BI 7 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	69
Tabela BI 8 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (réplica).	70
Tabela BI 9 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Pichia stipitis</i> (réplica II).....	70
Tabela BI 10 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (réplica II).	71
Tabela BI 11 – Eficiência de fermentação em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Pichia stipitis</i>	73
Tabela BI 12 – Eficiência de fermentação em hidrolisado da drêche pela levedura de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	73
Tabela BI 13 – Eficiência de fermentação em amostra sintético pela levedura de <i>Pichia stipitis</i>	73
Tabela BI 14 – Eficiência de fermentação em sintético pela levedura de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	73

Nomenclatura

Sigla	Nome	Unidade
% (m/m)	Porcentagem em massa por massa	
%cel	Teor de celulose bruta	
%Len	Teor da lenhina de Klason	
%Len.Sol	Teor da lenhina solúvel	
A	Absorvância	
A _{pico}	Área do pico	min.g/L
C	Concentração	g/L
f	Fator de diluição	
g	grama	
H	Humidade	
h	hora	
L	Litro	
m	massa	g
MG	Massa Gorda	g
min	minuto	
PCs	Poder calorífico superior	MJ/kg
tr	tempo de residência média	min
V	Volume	L
ε	Absortividade	
t _a	tempo de contato dos ácidos	min
t _e	tempo de contato das enzimas	min

1. Introdução

No mundo, o setor dos transportes é quase inteiramente dependente de combustíveis derivados de petróleo, consumindo cerca de 60 % do petróleo produzido à escala mundial. Deste modo o setor dos transportes é responsável por cerca de 30 % das emissões dos gases com efeito de estufa, o que contribui em igual percentagem para o aquecimento global. Apenas um galão de gasolina produz cerca de 8 kg de dióxido de carbono, pelo que os derivados do petróleo são também responsáveis pelas emissões globais de monóxido de carbono (CO) e de dióxido de carbono (CO₂), cerca de 70% e 19% respetivamente (Balat, 2011).

Em 2007, havia em todo o mundo, aproximadamente 806 milhões de automóveis e camiões ligeiros nas estradas e estima-se o aumento para 1,3 mil milhões até 2030 e para 2 mil milhões de veículos em 2050 (Balat, 2011). Este crescimento irá afetar a estabilidade dos ecossistemas e incrementar as alterações climáticas globais, bem como reduzir as reservas mundiais de petróleo.

O dramático aumento do preço do petróleo, a natureza finita dos combustíveis fósseis, a crescente preocupação em relação ao impacto ambiental, especialmente em relação às emissões de gases de efeito de estufa, a saúde das populações e a segurança das nações levam cada vez mais à procura de novas fontes e formas alternativas de energia para o setor dos transportes.

A produção de combustíveis alternativos tem de ser tecnicamente viável, economicamente competitiva, ambientalmente aceitável e estar sempre disponível. Numerosos potenciais combustíveis alternativos têm sido propostos pelos investigadores, incluindo o bioetanol, o biodiesel, o metanol, o hidrogénio, o biogás, etc. (Balat, 2011). Estes oferecem muitas vantagens em relação aos combustíveis de origem fóssil: são facilmente obtidos através das fontes de biomassa, apresentam maior segurança energética e reduzido impacto ambiental, são biodegradáveis, contribuem para a sustentabilidade, reunindo as preocupações económicas, sociais, ambientais e políticas. Além disso, a tecnologia de produção de biocombustíveis é relevante para o desenvolvimento dos países em vias de desenvolvimento na medida em que pode ajudar a aumentar os postos de trabalho, reduzir as faturas com a importação de energia e ainda abre potenciais mercados de exportação. As vantagens supracitadas já estão a ser analisadas e fazem parte da agenda dos investigadores, pelo que se prevê um aumento muito rápido da quota de biocombustíveis disponíveis no mercado nas próximas décadas.

1.1. Enquadramento

O biocombustível é uma fonte renovável de energia, produzida a partir de matérias-primas de base biológica, que pode ser usada como uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo. Desses biocombustíveis os mais comuns são o etanol, produzido a partir de milho, trigo ou beterraba, e o biodiesel, obtido a partir de sementes oleaginosas. Ambos são correntemente produzidos a partir de culturas alimentares clássicas que requerem terras agrícolas de alta qualidade para o crescimento, o que suscita algumas preocupações ao nível da sustentabilidade. No entanto, o bioetanol pode ser produzido também a partir de resíduos orgânicos domésticos de recolha selectiva, biomassa celulósica como herbáceas e lenhosas, resíduos agrícolas e florestais e de uma grande parte dos fluxos de resíduos sólidos urbanos e industriais (Demirbas, 2009).

As preocupações divulgadas pelos meios de informação sobre a escassez de alimentos, devido à produção de etanol a partir de matérias-primas alimentares (o etanol de 1ª geração), têm provocado a mudança para fontes de energias mais sustentáveis, com a produção de bioetanol a partir de matérias-primas celulósicas, produzindo-se assim o etanol de 2ª geração. No entanto a produção do etanol a partir de matérias-primas celulósicas ainda não é uma realidade industrial devido a alguns obstáculos técnicos, como a ineficiência do pré-tratamento, levando assim a um baixo rendimento na produção de bioetanol. Assim, a redução específica nos custos de conversão de biomassa poderia tornar o etanol celulósico bastante competitivo em relação a outros biocombustíveis.

As tecnologias para a produção do bioetanol têm sofrido grandes desenvolvimentos na última década. Os equipamentos e o processo de fabrico são, cada vez mais, alvo de estudos científicos com vista à otimização da sua eficiência (Shahsavarani, et al., 2013).

1.1.1. Produção do bioetanol

De entre os biocombustíveis, o mais importante e mais usado, sobretudo no continente americano é o bioetanol, que pode ser usado puro (E100) ou em misturas com gasolina (E20), em que 20 representa a percentagem em volume de etanol na mistura), com poucas ou sem quaisquer modificações nos motores automóveis.

O etanol ou álcool etílico é um composto orgânico líquido, incolor, tóxico, inflamável, com cheiro forte e consistência próxima à da água. Recentemente o termo "bioetanol"

também tem sido usado como sinónimo de etanol, quando se quer enfatizar a origem renovável (Novacana, s.d.).

Tecnicamente, o etanol pode ser produzido a partir de uma ampla variedade de matérias-primas renováveis, que podem ser classificadas em três grupos principais. As matérias:

- Contendo quantidades significativas de açúcares fermentáveis (cana-de-açúcar, beterraba);
- Com amido (milho, batata, arroz, trigo);
- Celulósicas (palha, capim, sabugo de milho, madeira, bagaço de cana, cevada);

A produção do bioetanol a partir das matérias-primas sacarinas ou amiláceas já se encontra desenvolvida e implementada a nível industrial.

A produção do bioetanol a partir de substâncias celulósicas pode ser feita por dois processos. O primeiro é um processo bioquímico que envolve um pré-tratamento, que liberta as hemiceluloses, ao qual se segue uma etapa de hidrólise que decompõe a celulose e hemiceluloses em açúcares simples (glucose e pentoses). O produto da hidrólise é posteriormente submetido à fermentação, obtendo-se como produtos finais o etanol e a lenhina. O segundo é um processo termoquímico que consiste na adição de calor e reagentes químicos à biomassa para a produção do gás de síntese, que é uma mistura de monóxido de carbono e hidrogénio. Posteriormente faz-se reagir o gás de síntese com um catalisador, produzindo o etanol e outros co-produtos líquidos (Energy, s.d.)

1.1.2. Produção mundial de etanol

Conforme os dados do Instituto de Pesquisas e Estudos Sociais e do Agronegócio (ICNA) a produção mundial de etanol cresceu ligeiramente em 2012 para 82,5 biliões de litros, representando um aumento de 2% relativamente ao produzido em 2011, como mostra a figura 1.1 (ICNA, 2013).

Analisando a figura 1.1 verifica-se que em 2006, a produção de etanol era praticamente nula nos países africanos. Denota-se uma evolução positiva da produção mundial de etanol e um aumento significativo nos países europeus e asiáticos e com menor expressão nos africanos (ICNA, 2013).

Com a implementação de políticas para o incentivo do uso de etanol, estima-se que a produção de etanol a nível mundial aumente para cerca de 130%, em relação ao ano

2014, que corresponde aproximadamente a 159 bilhões de litros para o ano 2019, conforme se pode verificar no gráfico da Figura 1.2.

Para o mesmo ano é também esperado um aumento da produção de biodiesel para valores na ordem de 41 bilhões de litros, como mostra o gráfico da Figura 1.3.

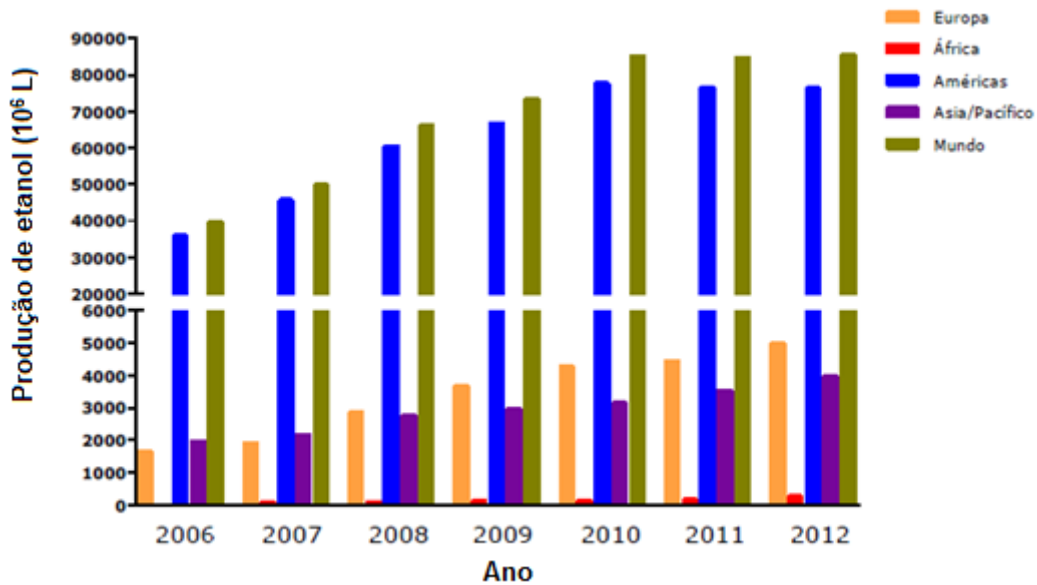


Figura 1.1 – Produção mundial de etanol (em milhões de litros) (ICNA, 2013).

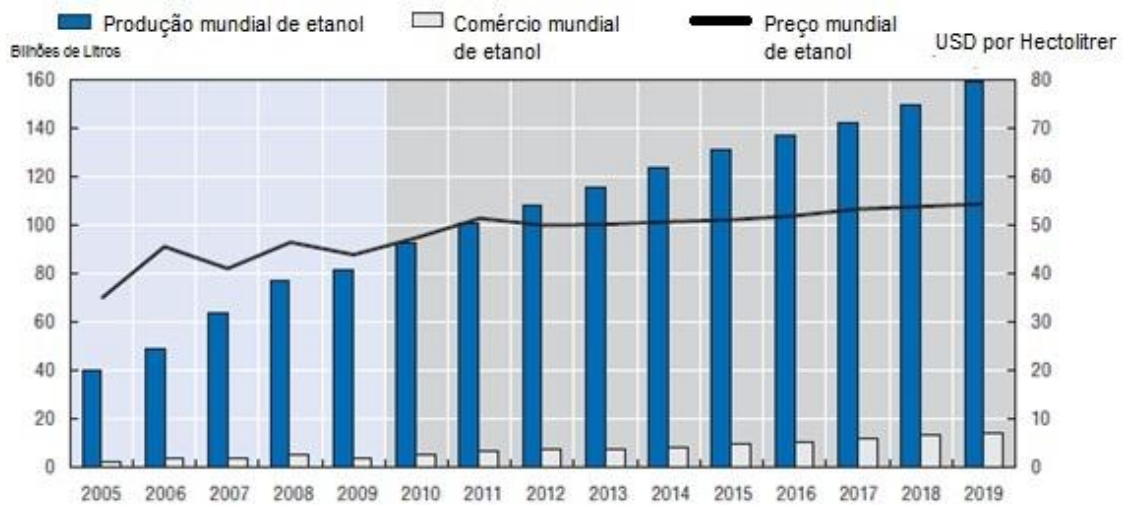


Figura 1.2 – Expansão mundial do mercado de bioetanol (adaptado de OECD-FAO, 2010-2019).

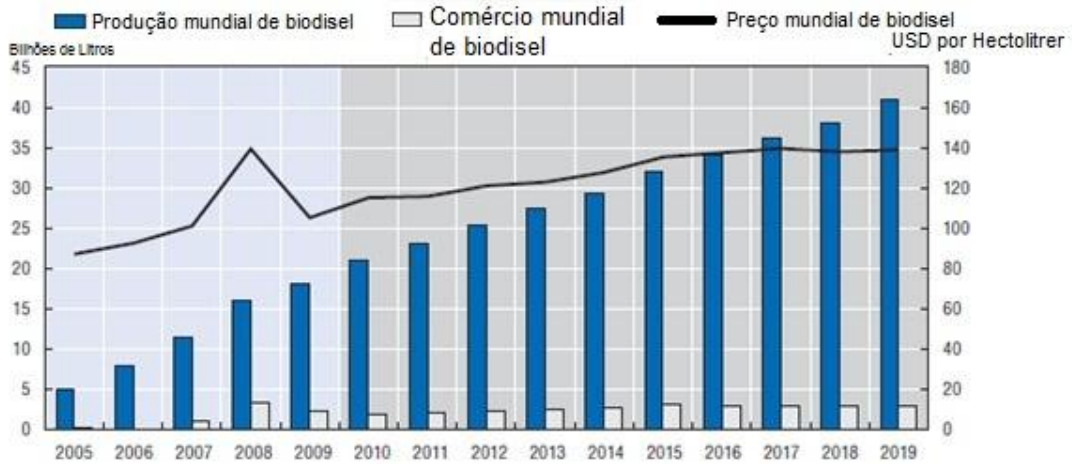


Figura 1.3 – Expansão mundial do mercado de biodiesel (adaptado de OECD-FAO, 2010-2019).

Os EUA (Estados Unidos da América) deverão manter-se como o maior produtor e consumidor de etanol (Figura 1.4). O Brasil, com a sua indústria de etanol baseada em cana-de-açúcar, deverá ser o principal exportador, nos próximos anos. Parte das exportações brasileiras de etanol deverão ser canalizadas, através de países como as Caraíbas, para os EUA devido às condições preferenciais de importação (OECD-FAO, 2010-2019). A União Europeia (UE) deverá aumentar a produção de etanol, em resposta à política de incentivo à utilização de biocombustíveis nos transportes.

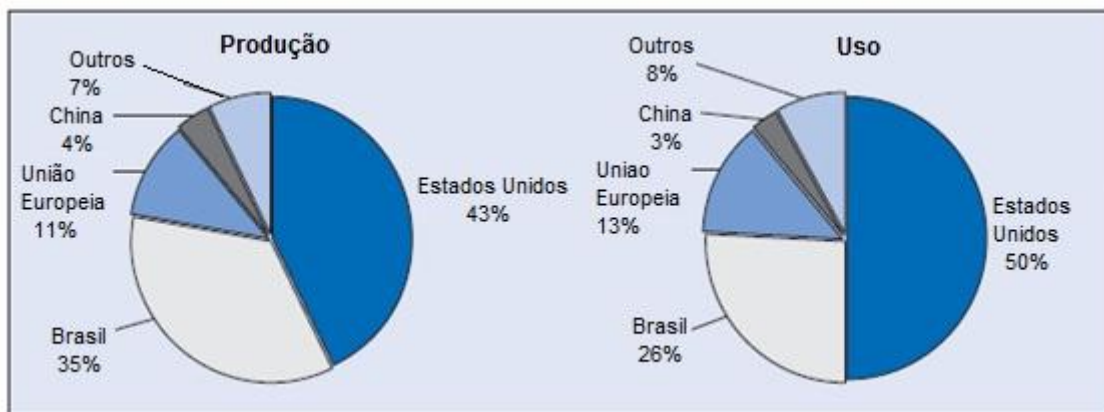


Figura 1.4 – Mercados de etanol dominados pelos EUA, Brasil e a UE. Distribuição regional da produção mundial de etanol e o seu uso estimados em 2019. Adaptado de (OECD-FAO, 2010-2019)

1.1.3. Produção Europeia de bioetanol

A UE, embora possua uma produção em menor escala que os dois principais produtores de etanol, EUA e Brasil, ocupa a terceira posição a nível mundial, com 11% de produção e 13% de consumo (Figura 1.4).

O aumento do consumo de biocombustíveis no sector dos transportes na Europa aumenta a cada ano. A Figura 1.5 representa a distribuição do consumo de diferentes biocombustíveis na Europa durante o ano de 2012 (Euroserv`ER, 2013).

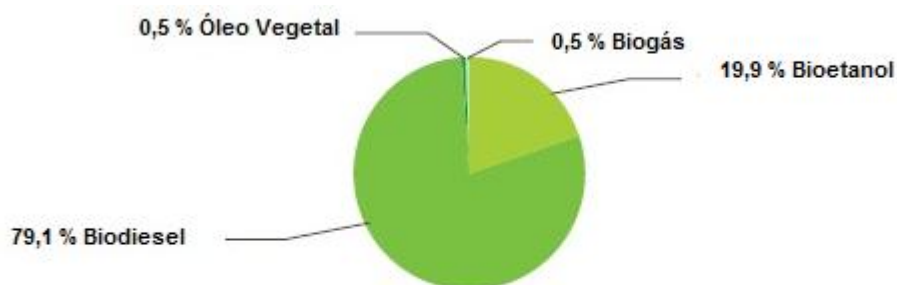


Figura 1.5 – Consumo energético no Setor de Transportes Europeu em 2012 por tipo de biocombustível. Adaptado de (Euroserv`ER, 2013).

1.1.4. Produção nacional

Segundo os dados do Euroserv'ER de 2013, Portugal encontra-se na décima primeira posição ao nível europeu, no consumo de biocombustíveis, com uma produção de 287 mil toneladas em 2012.

Portugal é um país de escassos recursos energéticos naturais, que recorre a quase 80% de importação de combustíveis fósseis para produzir os bens básicos necessários para o seu crescimento económico. A utilização de fontes de energia alternativas, como o bioetanol, será uma opção vantajosa para o desenvolvimento sustentado do país (Eiras, et al., 2011)

Embora em Portugal a maior parte dos veículos utilize gasóleo, há ainda uma parte significativa dos transportes que utiliza como combustível a gasolina. Ora o bioetanol pode ser usado nos motores a gasolina com poucas (ou nenhuma) modificações, pelo que é naturalmente um combustível alternativo a utilizar nos veículos motorizados fabricados atualmente.

A produção de bioetanol em Portugal a partir da drêche cervejeira (conceito explicado na secção 2.1) seria uma mais-valia e estará altamente facilitada tendo em conta a abundância da drêche (um recurso natural ainda sub valorizado pelo sistema) existente no país - cerca de 45050 toneladas por ano (Unicer, 2012). Se bem que não seja o único aspecto a considerar, o facto de se utilizar um subproduto e não uma matéria-prima alimentar ou produzida especificamente para fins energéticos e

utilizando solos agrícolas, constitui um forte contributo para a sustentabilidade do processo (Moura, 2012).

1.2. Objetivos

Tendo como pano de fundo a problemática anteriormente descrita, foi proposta a realização desta dissertação, tendo em vista satisfazer um conjunto de objectivos que seguidamente se apresentam.

1.2.1. Objectivos gerais

Encontrar soluções alternativas aos combustíveis de origem fóssil, utilizando matérias-primas residuais e processos sustentáveis. No caso presente, pretende-se produzir bioetanol a partir do subproduto da indústria cervejeira, a drêche cervejeira.

1.2.2. Metodologia

A metodologia a utilizar para atingir o objectivo do projeto é a seguinte:

- 1- Caracterização Química/Física da drêche;
- 2- Pré-tratamento, que tem como finalidade quebrar as cadeias de lenhina, que protegem os polímeros de celulose e hemiceluloses da biomassa lenhocelulósica; hidrólise enzimática, que tem como finalidade permitir a quebra das cadeias de polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) em açúcares simples (essencialmente glucose, xilose e arabinose e eventualmente outras pentoses);
- 3- Otimização da etapa de fermentação dos açúcares simples, com especial interesse na fermentação das pentoses que constituem a parte mais significativa dos açúcares obtidos a partir da drêche cervejeira;
- 4- Recuperação do etanol produzido a partir da drêche cervejeira para utilização como fonte de energia amiga do ambiente.

1.3. Estrutura de trabalho

Esta tese está estruturada em cinco capítulos, detalhando todo o percurso dos estudos realizados.

No 1º capítulo apresenta-se uma breve introdução justificativa da importância do uso dos biocombustíveis, no setor dos transportes, como recurso alternativo aos combustíveis fósseis. Nesta abordagem destaca-se especialmente o bioetanol, as suas formas de produção, bem como as principais vantagens e desvantagens da sua utilização. Ainda neste capítulo realça-se o nível de produção e utilização das energias

renováveis, à escala mundial, abordando também o seu consumo a nível Europeu e especificamente em Portugal.

No 2º capítulo as abordagens disponíveis na literatura serão o foco principal e servirão de pilares que sustentam os estudos e os resultados apresentados. Nesta segunda parte, o foco encontra-se essencialmente nas variantes de utilização da drêche cervejeira e nas metodologias utilizadas para a produção de bioetanol.

O 3º capítulo é dedicado à apresentação do trabalho experimental com descrição dos procedimentos e dos métodos utilizados nas fases da conversão da drêche em bioetanol. Também serão detalhadamente analisados os resultados obtidos.

O 4º capítulo espelha as principais conclusões do estudo e algumas recomendações para trabalhos futuros, atendendo às limitações ou obstáculos encontrados ao longo do estudo.

O 5º capítulo enquadra a compilação de anexos. Neles se encontram as normas utilizadas, bem como todos os procedimentos necessários para a execução experimental deste trabalho, exemplos de cálculos e ainda as fichas de segurança de todos os reagentes utilizados.

2. Estado de Arte

2.1. Composição da drêche cervejeira

De acordo com a Portaria 1/96, de 3 de Janeiro, a cerveja é uma “bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Saccharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente a cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável”.

A cevada é a matéria-prima primordial, tendo sido nos últimos anos objeto de um profundo trabalho de investigação científica. Em unidades industriais a cevada é transformada em malte através de um processo denominado maltagem. Toda a massa insolúvel que resulta da filtração do mosto é designada de drêche (Fonseca & Teixeira, 2007).

A indústria cervejeira produz grande quantidade de subprodutos, mais concretamente a drêche, que constitui cerca de 85% do total de subprodutos (Mussatto, et al., 2006). No entanto, como a maioria destes são produtos derivados da agricultura, encontram-se disponíveis no mercado a baixo custo ou mesmo sem qualquer custo ao longo de todo o ano, e podem facilmente ser reciclados e reutilizados na produção de biocombustíveis, nomeadamente o bioetanol de segunda geração.

A composição química da drêche varia com as características da cevada:

- A altura da colheita;
- As condições de moagem e maltagem;
- A quantidade e o tipo de adjuvantes adicionados no processo de fermentação.

A drêche cervejeira pode ser considerada um material lenho-celulósico rico em proteínas e fibras, que representam respetivamente cerca de 20 e 70% da sua composição. Os principais componentes destes tecidos fibrosos são: a arabinose, a lenhina (macromolécula polifenólica) e a celulose (Mussatto, et al., 2006). Na tabela 2.1 encontra-se a composição química da drêche cervejeira, resultado dos estudos realizados por Mussatto et al. (2006) e Xiros et al. (2008).

Como se observa na Tabela 2.1. a composição da drêche pode apresentar valores muito distintos. Essa diferença deve-se ao processo de produção da cerveja e à natureza das matérias-primas usadas na indústria cervejeira.

Tabela 2.1 – Composição química da drêche.

Componente	Composição de Drêche (% m/m)	
	Mussatto et al., 2006	Xiros et al., 2008
Celulose	16,8	12
Hemicelulose	----	40,2
Proteína total	15,2	14,2
Lenhina	27,8	11,5
Cinzas	4,6	3,3
Lípidos	-----	13,3

Na Tabela 2.2 apresenta-se a composição de diferentes lotes de drêche provenientes da UNICER. Os lotes identificam-se pela data de colheita da amostra - por exemplo L080109 significa uma colheita de 8 Janeiro de 2009. Verifica-se que cada lote tem composição variável com a data de colheita.

Tabela 2.2 – Composição química dos diferentes lotes de drêche (Unicer).

Constituinte % (m/m)	Amostras				
	L080109	L270109	L090209	L250209	L090309
Humidade	72,3 ± 0,3	76,4 ± 0,1	75,1 ± 0,3	75,8 ± 0,1	76,3 ± 0,6
Massa seca	27,4	23,6	24,9	24,2	23,7
Cinzas*	4,07 ± 0,02	3,77 ± 0,02	4,06 ± 0,02	3,58 ± 0,02	4,07 ± 0,02
Lípidos*	7,54	7,5	6,92	7,53	7,94
Açúcares*	52,0 ± 2,6	70,2 ± 6,0	63,7 ± 2,8	51,2 ± 2,1	55,1 ± 2,7

* % em base seca

O material lenho-celulósico que serve de matéria-prima para a produção de bioetanol é constituído principalmente por três polímeros: a celulose, as hemiceluloses e a lenhina, que estão associados uns aos outros, através de ligações covalentes. A Figura 2.1 representa a composição da parede celular da biomassa lenho-celulósica.

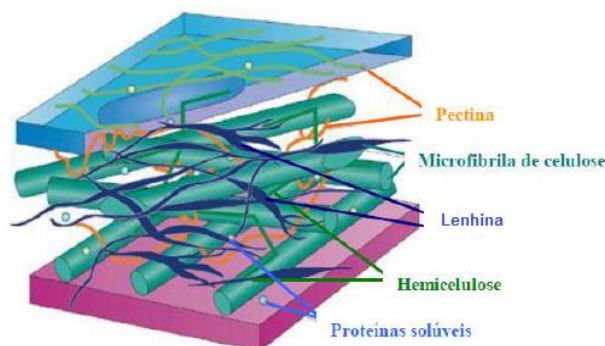


Figura 2.1 – Composição da parede celular de biomassa lenho-celulósica (Neitzel, 2013).

2.1.1. Celulose

A **celulose** é um polímero linear, proveniente da junção de milhares de moléculas de glucose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, Figura 2.2 a). A sua fórmula química é $C_6H_{10}O_5$ e é insolúvel em água. Aquele tipo de ligação, aliado à rotação de 180° que cada unidade de glucose sofre na cadeia relativamente à unidade precedente, Figura 2.2 b), confere ao polissacárido uma estrutura planar que é estabilizada por ligações de hidrogénio, Figura 2.2 c). Existe praticamente em todo o reino vegetal e é o principal componente da parede celular. Considerada como o esqueleto básico das células vegetais, as suas moléculas filamentosas e altamente resistentes conferem uma elevada rigidez à estrutura vegetal.

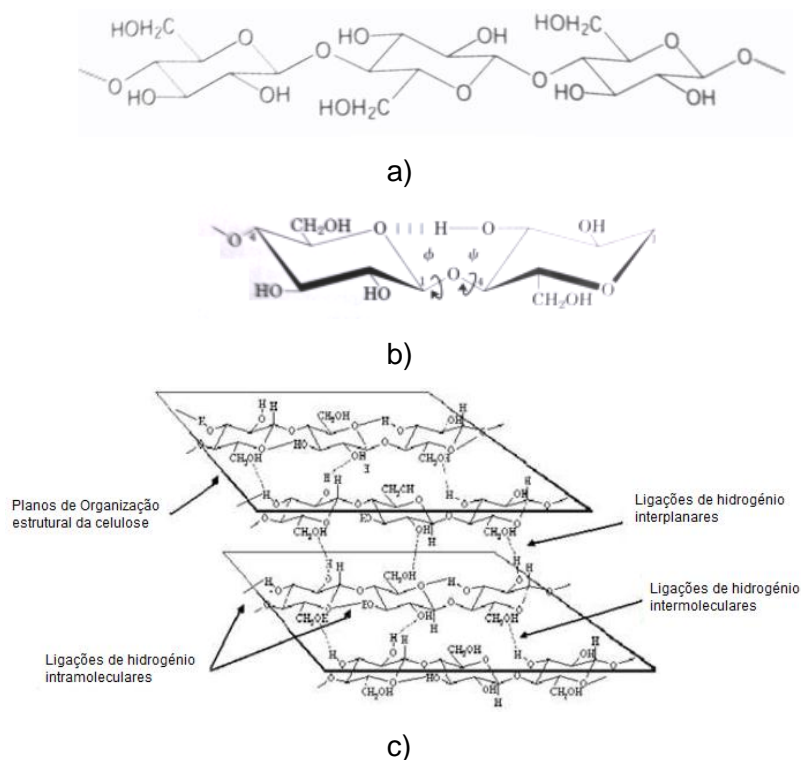


Figura 2.2 – Estrutura molecular de um segmento de uma cadeia de celulose a) representação da ligação entre glucose $\beta(1\rightarrow4)$ (Berg, et al., 2004), b) representando a rotação de 180° (Nelson & Cox, 2005), e c) estrutura da molécula de celulose com as respectivas ligações de hidrogénio (Veira, 2009).

2.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses são hidratos de carbono de estrutura complexa (polimérica) constituídos por diferentes monómeros, tais como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glucose e galactose), ácidos urónicos (ácido 4-O-metilglucorónico, ácido D-glucorónico e ácido D-galacturónico). O componente dominante das hemiceluloses provenientes da madeira e das plantas agrícolas, como relva e palha, é

a xilana, de fibra longa.

As hemiceluloses têm um peso molecular menor do que a celulose e possuem ramos de cadeias laterais curtas constituídas por diferentes açúcares de fácil hidrólise. As hemiceluloses funcionam como uma ligação entre a lenhina e as fibras de celulose e proporcionam a toda a rede de celulose-hemicelulose-lenhina uma maior rigidez (Hendriks & Zeeman, 2009).

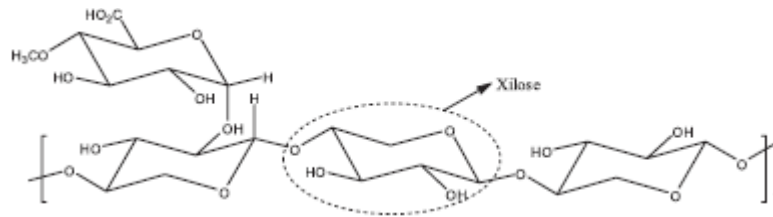


Figura 2.3 – Representação da estrutura molecular de hemicelulose (Santos, et al., 2012).

2.1.3. Lenhina

A lenhina é, depois da celulose e das hemiceluloses, um dos polímeros aromáticos mais abundantes na natureza, e está presente na parede celular. A lenhina corresponde a cerca de 15 a 35% do peso do material lenho-celulósico. É um heteropolímero amorfo constituído por três unidades de fenil-propano diferentes (p-cumárico, álcool coniferílico e sinapílico) que são mantidos juntos por diferentes tipos de ligações. As principais funções da lenhina são as de conferir à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e stress oxidativo. O heteropolímero amorfo é também insolúvel em água e oticamente ativo, o que faz com que a degradação da lenhina seja muito difícil (Hendriks & Zeeman, 2009).

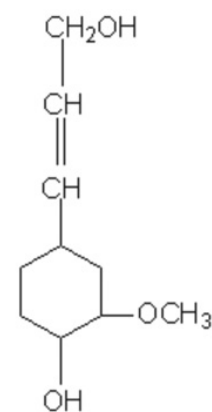
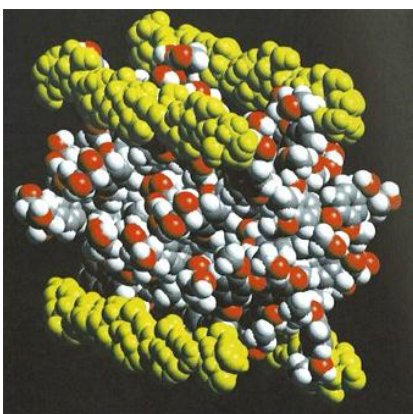


Figura 2.4 – Estrutura da lenhina: a) estrutura tridimensional de um fragmento do polímero de lenhina, sendo visíveis as 4 cadeias de xilanas (amarelo), b) monômero dos polímeros da lenhina (Klock, et al., 2005).

2.1.4. Glucose, xilose, arabinose

A glucose, a xilose e a arabinose são hidratos de carbonos, monossacáridos, mais abundantes na matéria-prima lenho-celulósica e não sofrem hidrólises quando estão nas suas formas mais simples. Estes açúcares possuem um grupo aldeído daí o prefixo aldo- (aldohexoses e aldopentoses) nas suas designações, conforme representação da Figura 2.5.

A xilose e a arabinose são aldopentoses constituídas por cinco átomos de carbono e podem ser encontradas na composição de alguns biopolímeros, tais como as hemiceluloses, enquanto a glucose é uma aldohexose com seis átomos de carbono e pode ser encontrada em vários frutos e materiais lenho-celulósicos (Moura, 2012).

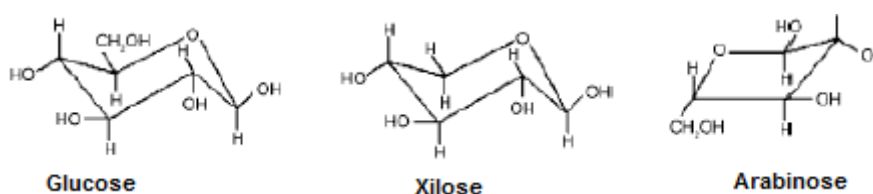


Figura 2.5 – Representação química das moléculas de glucose, xilose e arabinose (Ferreira, 2009) .

2.2. Etapas da produção do etanol

Conforme se disse anteriormente, o bioetanol de segunda geração é obtido a partir de matérias-primas ricas em hidratos de carbono complexos como a celulose e hemiceluloses. Constitui assim uma alternativa interessante para reduzir a competição com a indústria alimentar e acrescentar valor para os resíduos agro-industriais.

Os materiais lenho-celulósicos são formados por três polímeros estruturais: celulose, hemiceluloses e lenhina e ainda pequenas quantidades de outros compostos. Estes hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses), podem ser sacrificados e eventualmente fermentados para a obtenção do bioetanol. Embora existam alguns estudos sobre a fermentação de misturas de hexoses e pentoses, os processos são complexos e ainda não são utilizados a nível industrial.

A hidrólise enzimática é limitada devido a alguns fatores, dos quais se destacam a reduzida área superficial da fibra de celulose para o ataque das enzimas, o teor e a cristalinidade da lenhina e o grau de polimerização da celulose (Dagnino, et al., 2012).

Para a concretização dos objetivos deste trabalho serão aplicados os seguintes procedimentos: o pré-tratamento ácido, a hidrólise enzimática, a fermentação alcoólica e a recuperação do etanol utilizando destilação ou separação por membranas.

2.2.1. Pré-tratamento

O pré-tratamento tem por objetivo elevar ao máximo a conversão dos açúcares em etanol. É aplicado nas biomassas lenhosas.

Conforme se disse anteriormente, o complexo lenho-celulósico é composto por uma matriz de celulose, lenhina e hemiceluloses ligadas umas às outras para formar cadeias de polímero. O pré-tratamento é feito para quebrar esta matriz, de modo a reduzir o grau de cristalinidade da celulose e aumentar a fração de celulose amorfa, que é a forma mais conveniente para o ataque enzimático. Nas biorrefinarias com base em materiais lenho-celulósicos, que têm açúcares como intermediários, é necessário quebrar a estrutura da matéria-prima para obter os açúcares simples a partir da celulose e hemiceluloses. Vários tipos de processos têm sido relatados na literatura, com base nos trabalhos experimentais, nomeadamente os físicos, os químicos, os físico-químicos e os biológicos (Conde-Mejía, et al., 2012), (Sarkar, et al., 2012).

2.2.1.1. Pré- tratamento físico

O pré-tratamento físico, consiste na redução da cristalinidade de celulose melhorando a eficiência de hidrólise enzimática, sendo realizado através de um processo de trituração. A quantidade de energia mecânica gasta na moagem de materiais lenho-celulósicos depende do tamanho inicial e final das partículas mas também da humidade que estes apresentam e da sua natureza. A redução do tamanho pode proporcionar melhores resultados, mas quando as partículas são muito finas pode gerar a formação de aglomerados, criando efeitos indesejáveis sobre o processamento posterior, como a hidrólise enzimática e a fermentação.

2.2.1.2. Pré-tratamento químico

Os pré-tratamentos químicos envolvem o uso de um ácido concentrado ou diluído, de uma base, ou amónia diluída em solvente orgânico, SO₂, CO₂ ou outros produtos químicos. Este método é de fácil operação e tem apresentado bom rendimento de conversão de biomassa em curto espaço de tempo.

2.2.1.3. Pré-tratamento físico-químico

No pré-tratamento físico-químico, uma das técnicas mais utilizadas é a explosão por vapor (*steam explosion*) que consiste no aquecimento da biomassa com vapor a alta pressão e temperatura (20 a 50 bar, 160 a 290 °C), seguindo-se uma descompressão brusca. Quando o vapor se expande dentro da matriz lenho-celulósico as fibras da

biomassa individuais separam-se obtendo-se uma elevada recuperação da xilose (45 a 65%). Este método de pré-tratamento pode ocorrer sem a utilização de qualquer catalisador (Sarkar, et al., 2012).

2.2.1.4. Pré-tratamento ácido

Segundo Sarkar et al., (2012), o pré-tratamento ácido é considerado uma das técnicas mais importantes e com maior rendimento em açúcares da matéria lenho-celulósica. É normalmente realizado com ácidos concentrados ou diluídos (normalmente entre 0,2 e 2,5 % (m/m)) para preparar a matéria-prima para a hidrólise da celulose. Entre os vários tipos de ácidos usados, incluindo o ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃) e ácido sulfúrico (H₂SO₄), este último é o mais usado para o efeito. Os ácidos atacam os polissacáridos, especialmente as hemiceluloses que são mais fáceis de hidrolisar que a celulose. No pré-tratamento podem formar-se vários inibidores, como o ácido acético (CH₃COOH), o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, que afetam o crescimento dos microorganismos usados na etapa de fermentação. No pré-tratamento da palha do trigo, realizado com o ácido sulfúrico diluído obteve-se um rendimento de sacarificação de 74 %.

2.2.1.5. Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino do material lenho-celulósico digere a matriz da lenhina, da celulose e das hemiceluloses, ficando a mistura preparada para a degradação enzimática. Este ataque alcalino rompe a parede celular por dissolução da hemicelulose, lenhina e sílica. Neste processo os substratos podem ser fracionados em lenhina alcalino-solúvel, hemiceluloses e resíduos, o que faz com que seja fácil utilizá-los para a recuperação dos produtos mais valiosos. O resíduo final (principalmente celulose) pode ser utilizado para produzir papel ou derivados de celulose. Os hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amónio podem ser utilizados neste processo. A título de exemplo pode-se referir o estudo da eficácia de diferentes soluções alcalinas através da análise de digestibilidade e de dissociação de hemiceluloses em palha do trigo, para o qual se obteve um aumento de digestibilidade de 14 para 55%, e uma redução da lenhina de 55 para 20%, aplicando hidróxido de sódio a 1,5 % durante 144 horas a 20 °C (Sarkar, et al., 2012).

2.2.2. Hidrólise enzimática

Neste passo do processo, as cadeias celulósicas e hemicelulósicas são quebradas de forma a produzir açúcares simples, fermentáveis. Esse passo pode ser realizado usando ácidos inorgânicos ou enzimas.

A hidrólise, em geral, é uma reação em que as ligações glicosídicas entre as moléculas de açúcares simples dos polímeros são quebradas por meio de uma molécula de água, formando oligossacáridos mais curtos ou monossacáridos. Na sacarificação dos açúcares para a produção do etanol são selecionadas enzimas hidrolíticas e várias hidrolases de glicosil (glicosidases) que catalisam a hidrólise de polissacáridos. Na hidrólise ácida diluída da celulose ou das hemiceluloses, o íon de hidrogénio atua como catalisador e é adicionado para formar um ácido conjugado que conduz à quebra da ligação glicosídica. Embora os íões de hidrogénio (H^+) catalisem a hidrólise e remoção de hemicelulose a um pH baixo, a operação a um pH elevado (acima de 10) pode solubilizar e remover a lenhina resultando assim a melhoria da digestibilidade da celulose (Pakarinen, 2012).

Normalmente utilizam-se enzimas uma vez que elas são bastante seletivas e têm um desempenho ótimo a temperaturas entre 30 a 40 °C e a um pH de 4,0 a 5,0.

Todavia o custo das enzimas têm um peso considerável o que tem levado a que sejam realizados estudos para procurar uma forma de minimizar o consumo de enzimas na produção de etanol de segunda geração (Moura, 2012).

2.2.2.1. Enzimas

As enzimas, catalisadores de sistemas biológicos, são notáveis dispositivos moleculares que determinam o perfil de transformações químicas e também participam na transformação de uma forma de energia para outra. A maioria das reações nos sistemas biológicos não ocorre em velocidades perceptíveis na ausência de enzimas, que aceleram as reações por fatores de até um milhão de vezes ou mais. As enzimas são altamente específicas tanto na reação catalisada como na sua escolha de reagente os quais são chamados de substratos (Berg, et al., 2004).

A Comissão para Enzimas da União Internacional de Bioquímica (IUB) estabeleceu a classificação das enzimas segundo a Tabela 2.3 (Cabral, et al., 2003).

Tabela 2.3 – Nomenclatura e classificação de enzimas (Cabral, et al., 2003).

Classe de Enzima	Tipo de reação catalisada
Óxido-redutases	Reações de oxidação-redução
Transferases	Transferências de 1 átomo ou grupo entre moléculas
Hidrolases	Reação de hidrólise
Liasas	Remoção de um grupo de uma molécula (sem ser por hidrólise)
Isomerases	Reação de isomerização
Ligases	Reações de síntese acoplados à hidrólise de uma molécula de ATP

A hidrólise é realizada antes da fermentação (SHF) ou simultaneamente (SSF). Pelo exposto anteriormente, as enzimas necessárias para a hidrólise são dependentes da matéria-prima e normalmente são utilizadas misturas ricas de vários componentes de enzimas. Os substratos de primeira geração, como o amido, são hidrolisados com amilases enquanto a invertase é usada para hidrolisar a sacarose. A hidrólise de material lenho-celulósico é significativamente mais complexa quando comparada com a do amido, por exemplo. Várias enzimas *celulolíticas* ou *celulases* e *hemicelulases* ou *hemicelulolíticas* são necessárias para hidrolisar a parede celular. A pesquisa extensiva realizada durante as últimas décadas tem levado ao desenvolvimento de misturas de enzimas eficientes e que já se encontram comercialmente disponíveis. *Trichoderma reesei* são as celulases fungo-mesófilas mais estudadas.

Como a celulose constitui a maior parte dos hidratos de carbono nos materiais lenho-celulósicos das plantas, é a matéria-prima mais importante a converter em açúcares. Apesar da sua estrutura complexa, pode ser quase completamente hidrolisada por enzimas. Tradicionalmente são necessários dois tipos de celulases para a hidrólise da celulose, endoglucanases (EG) (endo-1,4- β -glucanases) e celobiohidrolases (CBH) (exo-1,4- β -glucanases). As EG podem hidrolisar ligações internas de cadeias de celulose e as extremidades da cadeia são atacadas pelas CBHs, que são as únicas enzimas que hidrolisam eficientemente a celulose. Elas são divididas em dois tipos: CBH I e CBH II. A CBH I atua sobre as extremidades redutoras e a CBH II nas extremidades não redutoras da cadeia. As EGs e as CBHs libertam xilo-oligossacarídeos e celobiose de celulose, que são posteriormente quebrados a glucose por β -glicosidases.

A complexidade nativa das hemiceluloses requer um alto grau de coordenação entre as enzimas envolvidas. A maioria das enzimas têm exigências muito específicas para o tipo de reação a ser catalisado e precisa determinado substrato, apenas sendo capaz de se ligar efetivamente a determinados compostos. O que geralmente leva a

cada grupo lateral requerer um tipo especial de hemicelulase para quebrar os polímeros em moléculas de açúcar simples. Os grupos laterais incluem arabinosidases, glucuronidasas, galactosidasas e esterases. O principal grupo de enzimas capaz de quebrar a “espinha dorsal” das *hemicelulases* são as *xilanases* e *mananases*. Tem sido observado que a quantidade de xilanos, especialmente, parece frequentemente restringir a hidrólise enzimática global das celuloses, por exemplo, cobrindo a superfície da celulose e impedindo o acesso de celulases à superfície de celulose (Pakarinen, 2012).

Vários estudos têm sido realizados com a finalidade de melhorar a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática do material lenho-celulósico com vista à conversão a açúcares simples e à produção do bioetanol. Moura (2012) estudou a eficácia de diferentes ácidos em diferentes condições para a otimização da etapa de pré-tratamento da drêche cervejeira, nomeadamente os ácidos clorídrico, sulfúrico e nítrico. Também avaliaram os rendimentos de diferentes enzimas, tais como a *Viscozyme L*, *Glucanex 100g*, *Ultraflo L*, *Cellulase de Aspergillus niger* e *Hemicellulase de Aspergillus niger*, na etapa de hidrólise enzimática. Este estudo foi realizado a diferentes temperaturas, consoante as enzimas utilizadas, e a um pH compreendido entre 4 e 6. O melhor resultado obtido foi de 72% de conversão de drêche seca em açúcares simples, utilizando uma mistura sequencial dos ácidos e enzimas. Os resultados encontram-se na tabela 2.4

Tabela 2.4 – Resultados obtidos no estudo do pré-tratamento e hidrólise enzimática de 25 g de drêche com a adição sequencial e em mistura dos ácidos (HCl e HNO₃) e adição sequencial das enzimas (*Glucanex 100g* e *Ultraflo L*). Adaptado de (Moura, 2012) .

Adição de HCl e HNO ₃	m _{Glucanex} (g)	V _{UltrafloL} (mL)	m _{Xilose} (g)	m _{Arabinose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total}	Conversão (% m/m)
Sequencial	2,4843	2,3	3,638	10,28	4,108	18,026	72,1
Em mistura	2,5432		1,813	4,246	1,35	7,41	29,6

2.2.2.2. Factores que afetam as reações enzimáticas

Em 1950 Monod (Fonseca & Teixeira, 2007) propôs a equação 2.1 para exprimir a dependência entre a taxa de crescimento, μ , e a concentração do substrato $[S]$, equação esta que é idêntica à de Michaelis-Menten (Fonseca & Teixeira, 2007) .

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (2.1)$$

em que K_s é a constante da saturação e μ_{\max} é a taxa de crescimento máxima do substrato. A cinética do crescimento depende de K_s , quanto maior é o seu valor menor é a velocidade de crescimento de microorganismo e vice-versa, ou seja, quanto menor é o valor de K_s maior é afinidade da enzima para o substrato.

A concentração do substrato é um dos fatores que afetam a velocidade de crescimento do microorganismo, logo de acordo com a equação 2.1 pode-se esperar que com o aumento da concentração de substrato a velocidade da reação enzimática aumente para um valor máximo. A Figura 2.6 representa a velocidade de crescimento do microorganismo com o aumento da concentração do substrato.



Figura 2.6 – Influência da concentração de substrato na velocidade da reação (Berg, et al., 2004).

O pH também é um fator que afeta o crescimento enzimático. Na maioria dos processos biológicos envolvendo células vivas, sejam microbianas, animais ou vegetais ocorre variação do pH durante o crescimento celular, existindo a necessidade de medição e controle de pH. As enzimas têm um pH ótimo, no qual a sua forma é tal que permite que elas catalisem com maior eficiência uma determinada reação química, cuja velocidade então é máxima. Em valores abaixo (mais ácidos) ou acima (mais básicos) desse pH ótimo, a atividade da enzima e a velocidade da reação por ela catalisada diminuem, porque a sua forma tridimensional se altera. A Figura 2.7 representa a variação de velocidade de reação com o pH (Cabral, et al., 2003) (Nelson & Cox, 2005).

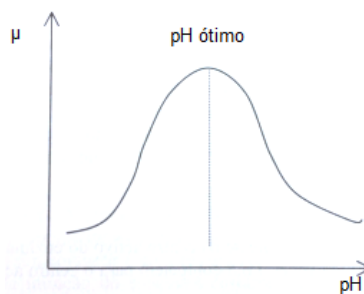


Figura 2.7 – Efeito do pH na velocidade da reação enzimática (Cabral, et al., 2003)

A velocidade das reações químicas aumenta com o aumento da temperatura. Todavia, nas reações catalisadas por enzimas, a velocidade tende a diminuir quando a temperatura ultrapassa os 35 °C ou 40 °C. Isto ocorre porque, a temperaturas elevadas, as estruturas secundária e terciária da enzima alteram-se, afetando a sua configuração espacial. Como a ligação da enzima ao substrato depende da forma da molécula da enzima (mecanismo "chave-fechadura", Figura 2.8), se a mesma for alterada, conseqüentemente a função também será (Cabral, et al., 2003) (Nelson & Cox, 2005).

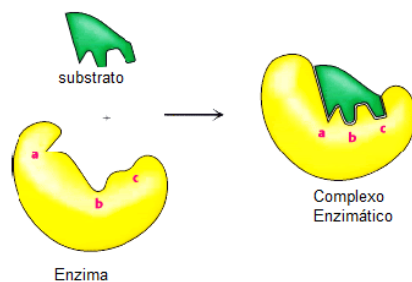


Figura 2.8- Representação esquemática de um modelo de "chave-e-fechadura" (Berg, et al., 2004).

Em 1946, Hinshelwood propôs que a variação da taxa de crescimento com a temperatura fosse traduzida pela lei de Arrhenius, de acordo com a equação 2.2

$$\mu_{\max} = A_1 e^{\frac{-E_1}{RT}} - A_2 e^{\frac{-E_2}{RT}} \quad (2.2)$$

onde A_1 e A_2 são as constantes cinéticas e E_1 e E_2 representam a energia de ativação do crescimento celular e da morte térmica.

A temperatura superior a 70 °C as reações enzimáticas geralmente cessam, pois habitualmente ocorre desnaturação completa e irreversível da maioria das enzimas, conforme mostra a Figura 2.9.

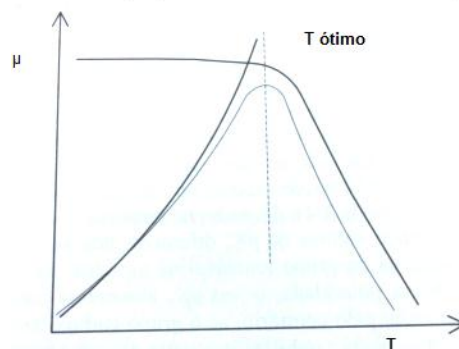


Figura 2.9 – Efeito da temperatura na velocidade da reação (Cabral, et al., 2003).

2.2.3. Fermentação

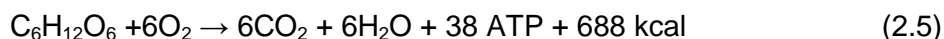
O objetivo do presente trabalho de investigação é o de estudar a otimização da etapa de fermentação da drêche cervejeira, que é considerada um material lenho-celulósico, constituído por polímeros de glucose e vários outros monómeros de hexoses (6 átomos de carbonos) e de pentoses (5 átomos de carbono).

O material lenho-celulósico é frequentemente hidrolisado com ácido, sendo os açúcares resultantes utilizados na fermentação por microorganismos tais como as leveduras. O hidrolisado contém não só glucose mas também vários monossacáridos, tais como xilose, manose, galactose, arabinose, e oligossacáridos, devendo ser utilizado um microorganismo ou consórcio de microorganismos eficiente para fermentar esses açúcares para a produção do bioetanol a nível industrial. De acordo com a equação 2.3 e 2.4, o rendimento teórico máximo é de 0,51 kg de bioetanol e 0,49 kg de dióxido de carbono por kg de xilose e glucose (Balat, et al., 2008). Este tipo de fermentação é designado de fermentação alcoólica.

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico através do qual certos açúcares, principalmente a sacarose, a glucose e a frutose são transformados em álcool etílico (ou etanol).



A conversão das pentoses segue a estequiometria da equação 2.3, que mostra que três moléculas de pentose (xilose ou arabinose) se convertem em cinco moléculas de etanol e cinco de dióxido de carbono. No caso da glucose, a estequiometria da conversão é a da equação 2.4, sendo que uma molécula de glucose se converte em duas moléculas de etanol e duas de dióxido de carbono. No entanto se existir, um recetor externo de eletrões, de acordo com a equação 2.5, para o ciclo de Krebs, a glucose é oxidada completamente a CO_2 e H_2O , com formação de 38 moléculas de Trifosfato de adenosina (ATP) por mole de glucose oxidada. Este processo é denominado de respiração aeróbia, no qual a ATP é obtida, quer por fosforilação a nível de substrato, quer por fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de eletrões.



Em qualquer processo de obtenção de energia há simultaneamente reações de oxidação e de redução, tendo por isso de existir, um recetor de eletrões. Nas reações de glicólise, o Dinucleotido de nicotinamina e adenina oxidada NAD^+ é reduzido a

Dinucleotido de nicotinamina NADH + H⁺. Assim na fermentação alcoólica, o NADH cede os seus elétrões ao acetaldeído que se reduz, originando etanol e regerando NAD⁺ que está novamente disponível para captar elétrões.

De acordo com Gay-Lussac, o balanço energético resultante da fermentação alcoólica da glucose é de 2 moles de ATP com a formação de 2 moles de etanol e de 2 moles de CO₂. Para a levedura, o produto essencial é o ATP enquanto o etanol e o CO₂ são produtos finais (Ferreira, et al., 1998), equação 2.6.



O processo de fermentação alcoólica envolve microorganismos que utilizam os açúcares fermentáveis como alimento para produzir o álcool etílico (ou etanol) e outros subprodutos (Balat, et al., 2008). Estes microorganismos são capaz de converter eficientemente as hexoses e pentoses a etanol. Enquanto a fermentação de hexoses, (glucose, manose e galactose) a etanol, estão bem desenvolvidas em larga escala, utilizando as correntes leveduras de padeiro *Saccharomyces cerevisiae*, a conversão de pentoses (xilose e arabinose) a etanol é ainda uma das principais barreiras à industrialização da produção do etanol a partir dos materiais lenho-celulósicos (Liang, et al., 2013).

2.2.3.1. Leveduras

A *Saccharomyces cerevisiae* não fermenta as pentoses, no entanto existem algumas leveduras que são capazes de fermentar as pentoses: *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehate*, *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*. Alguns microorganismos fermentam a xilose sob as condições aeróbicas, outros sob as condições limitantes de oxigénio, mas a taxa de produção de etanol é baixa quando comparado à fermentação alcoólica a partir da glucose (Reis, 2012). Várias outras espécies de leveduras também tem sido reportadas com potencial para fermentar as xiloses, *Brettanomyces*, *clavispora*, *Schizo saccharomyces*, e várias famílias da *Cândida*, (*C. tenius*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. blankii*, *C. friedrichii*, *C. solani* e *C. parapsilosis*), e as espécies de *Debaromyces* (*D. nepalensis* e *D. polymorpha*) (Kuhada, et al., 2011).

2.2.3.2. Fungos

Também existem alguns fungos filamentosos que podem fermentar as pentoses, nomeadamente *Chalara*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Paecilomyces* e *Trichoderma*. Algumas outras estirpes de fungos têm sido estudadas para fermentar os substratos celulósicos naturais mais complexos, tais como, *Monilias p.*,

Neocallimastix sp., *Trichoderma reesei* e *Fusarium oxysporum*, que têm demonstrado a capacidade de conversão direta de celulose e hemiceluloses em etanol / ácido acético na fermentação em uma única etapa. Apesar da capacidade de fermentar as pentoses, estes fungos têm vários inconvenientes fisiológicos, tais como, longo período de fermentação, baixa produtividade de etanol, viscosidade do caldo de fermentação elevada, a exigência de baixos níveis críticos de oxigênio e formação de subprodutos, em grandes quantidades. No entanto, os fungos filamentosos podem ser interessantes devido à sua capacidade para crescer naturalmente em biomassa vegetal, o que geralmente não acontece com as leveduras (Kuhada, et al., 2011).

2.2.3.3. Bactérias

Há bactérias que são capazes de metabolizar as pentoses. Entretanto, esses microorganismos normalmente apresentam um baixo rendimento de etanol. Esse baixo rendimento é devido à baixa tolerância às concentrações de etanol, de açúcar e de pH, para além de gerar vários subprodutos, (Reis, 2012). As bactérias com potencial de fermentar as pentoses são: *Escherichiacoli*, *Zymomonas mobilise* as bactérias termófilas como *ethanolicus* ou *Th. Saccharolyticum* (Almeida, et al., 2011).

2.2.3.4. Fatores que afetam a fermentação alcoólica

O sucesso de um processo fermentativo depende de vários fatores, destacando-se, a temperatura, o pH como referido anteriormente na seção 2.2.2.2 no caso das enzimas. Para além destes fatores, a presença de oxigênio é também limitante do sucesso da fermentação. Quando o oxigênio está disponível, a fermentação pára praticamente, a taxa do consumo dos açúcares baixa, e a produção de etanol é inibida. Este fenómeno é conhecido como efeito de Pasteur (Stansfield, et al., 1998).

2.2.3.5. SHF versus SSF

Há hidrólise e fermentação separada (SHF) e a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) são duas configurações principais nos processos de produção de bioetanol a partir de matéria-prima lenho-celulósica. A escolha de uma configuração é determinada pelo equilíbrio entre as vantagens e desvantagens associadas a cada uma delas.

Na SHF, a hidrólise e fermentação são realizados em passos diferentes. Isto faz com que seja possível executar cada processo sob as suas condições ótimas (temperatura e pH). Além disso, a SHF oferece a possibilidade de reciclagem de células, enquanto em SSF, não é possível separar as células das partículas sólidas da matéria-prima (Magnus, et al., 2012). Outra vantagem da SHF é que a hidrólise enzimática em

sólidos provenientes de pré-tratamentos ocorre na ausência de inibidores que podem reduzir o rendimento da fermentação, (Mesa, et al., 2011).

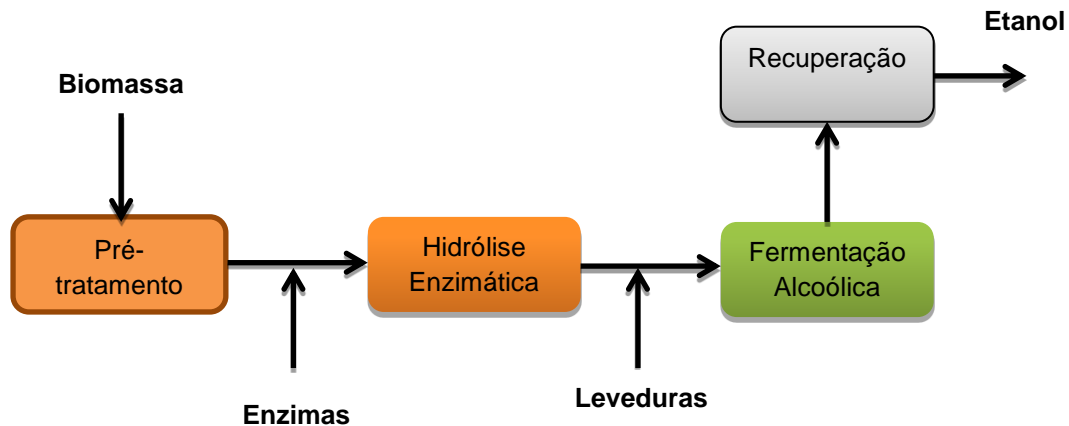


Figura 2.10 – Diagrama de blocos de um processo de SHF (Almeida, 2013. Adaptado).

Na SSF, a hidrólise enzimática da matéria-prima originária do pré-tratamento e a fermentação são executadas no mesmo reator, o que permite que os açúcares libertados, a partir da hidrólise sejam rapidamente consumidos pelos microrganismos, minimizando, assim, a inibição do produto final das enzimas *celulolíticas*. Este é o processo mais atractivo devido ao menor custo de capital e ao menor tempo de operação. Uma das desvantagens deste método é que as condições para a hidrólise enzimática e a fermentação têm de ser as mesmas, tipicamente abaixo do ideal para ambos os passos. No entanto, a SSF tem provado ser uma estratégia mais eficiente do que a SHF para diversas matérias-primas, tais como o pinheiro, a palha de trigo e a palha de milho (Magnus, et al., 2012). Um dos principais inconvenientes da SSF é o de que a sacarificação geralmente mais eficiente a temperatura mais elevada do que a fermentação (Mesa, et al., 2011).

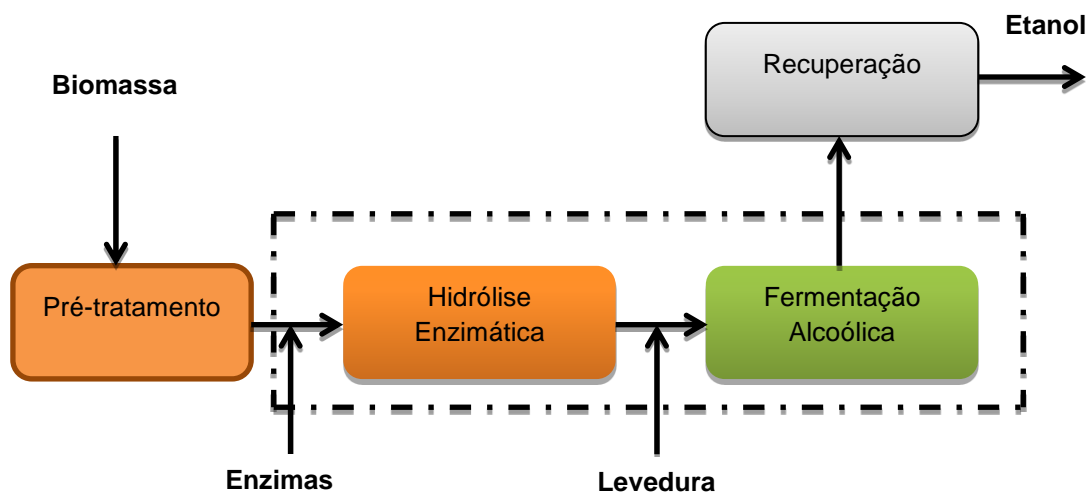


Figura 2.11 – Diagrama de blocos de um processo de SSF (Almeida, 2013. Adaptado).

Na Tabela 2.5 encontra-se representado o resultado de um estudo comparativo entre o processo de SSF e SHF, realizado com palha de milho usando explosão de vapor como pré-tratamento. Para atingir o objetivo do referido estudo foi assumido um rendimento de fermentação de etanol, SSF, de 90% em 24 horas (0,46 g de etanol por 1 g de glicose) (Öhgren, et al., 2007)

Tabela 2.5 – Comparação entre o rendimento de etanol a partir de SSF (após 120 h) e SHF (após 120 h de hidrólise e 24 h de fermentação). Adaptado de (Öhgren, et al., 2007).

Biomassa	Rendimento em etanol SSF/SHF %	Produção de etanol total (%)	Concentração de etanol após 120/144 h (g / L)
Biomassa de palha de milho (<i>Whole slurry</i>)			
SSF	78,2	72,4	20,5
SHF	64,1	59,3	16,8
Biomassa de palha de milho com açúcar adicionado (<i>Washed slurry with additional sugar</i>)			
SSF	69,3	64,1	18,2
SHF	76,2	70,6	19,4
Biomassa de palha de milho com xilanases adicionadas (<i>Whole slurry with additional xylanases</i>)			
SSF	81,5	75,4	21,4
SHF	68,2	63,2	17,9

Da análise da Tabela 2.5 pode-se verificar que o processo de SSF apresenta melhor resultado do que o processo de SHF. A Biomassa de palha de milho com xilanases adicionadas apresenta uma concentração de etanol, após 120 h de 21,4 g/L correspondente a um rendimento global de 75,4% de etanol, significativamente superior aos 17,9 g/L obtidos em SHF (Öhgren, et al., 2007).

Na Tabela 2.6 encontra-se representado o resultado de um estudo de fermentação realizado por White et al., (2008), com amostras em meios sintéticos e hidrolisados de drêche com as stirpes de *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* em 48 horas de fermentação

Tabela 2.6 – Comparação da eficiência de fermentação em amostras de hidrolisados e em meios sintéticos contendo glucose e/ou Xilose

Leveduras	Substratos	$Y_{P/S}$ (g/g)	%Conversão teórica	Y (g etanol/100g da drêche)
<i>P. stipitis</i>	4% Glucose	0,31	60,8	-----
	4% Xilose	0,38	74,1	-----
	2% Glucose/Xilose	0,33	64,7	-----
	Hidrolisado da drêche	0,32	62,7	4,2
<i>K. marxianus</i>	4% Glucose	0,36	70,6	-----
	4% Xilose	0,17	33,3	-----
	2% Glucose/Xilose	0,23	45,1	-----
	Hidrolisado da drêche	0,23	45,1	3,0

2.2.4. Recuperação do etanol

Terminado o processo de fermentação é necessário aumentar a grau de pureza do etanol, ou seja, separar o etanol da água.

Um dos processos utilizados para separar o etanol obtido da fermentação da água é a destilação fracionada. A destilação fracionada, baseia-se nas volatilidades dos compostos envolvidos, ou seja, levando a mistura etanol-água à ebulição. Como o ponto de ebulição do etanol (78,3 °C) é inferior ao da água (100 °C), o etanol será convertido em vapor primeiro que a água, e pode ser separado e recuperado após condensação, com 95 % da pureza. Normalmente, a maioria das biorefinarias usa colunas de destilação contínua em múltiplos estágios. O composto mais volátil é recuperado na parte superior (topo) e o menos volátil na parte inferior (base) da coluna (Limayem & Ricke, 2012).

A coluna de fraccionamento consiste numa unidade de operações unitárias cilíndrica dividida em varias seções por uma série de pratos perfurados, que permitem o fluxo ascendente de vapor. O vapor do topo é enviado a um condensador e o condensado resultante é dividido por um divisor de refluxo, sendo parte retirado como produto e parte reenviado à coluna como refluxo (Coulson, 1993).

Um outro processo que pode ser utilizado para separar o etanol da água, é a separação por membranas em que a alimentação e o retentado se encontram no estado líquido enquanto a espécie permeada emerge a jusante da membrana na fase vapor (Seader, 1998).

2.2.5. Avaliação da eficiência do processo

A avaliação da eficiência do processo de produção de bioetanol a partir da drêche será feita seguindo a evolução da concentração dos açúcares simples e do álcool, o que geralmente é feito recorrendo às técnicas analíticas de espectroscopia, espectrometria, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de gás (GC) (Skoog, et al., 2006).

3. Descrição técnica

Para atingir o objetivo definido neste trabalho, otimização da etapa de fermentação dos açúcares produzidos a partir da drêche cervejeira, desenvolveu-se um conjunto de estudos em várias etapas do processo de produção do etanol: primeiramente a análise granulométrica, depois a caracterização química da drêche e os métodos de pré-tratamento, hidrólise enzimática; por último na escolha de leveduras capazes de fermentar as pentoses, seguida de destilação e análise dos resultados.

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Caracterização de drêche cervejeira

Como já foi referido no texto, a composição da drêche, varia com vários fatores, nomeadamente, o tempo de colheita e o tipo de cerveja a produzir, por isso fez-se a caracterização do referido material. Foram avaliados os seguintes parâmetros: o teor de humidade, a granulometria, o poder calorífico, o teor de cinzas, matéria gorda, celulose, lenhina, carbono orgânico total e ainda o teor de hemiceluloses.

3.1.1.1. Teor da humidade

Para a avaliação deste parâmetro na amostra congelada e na amostra recolhida diretamente, foi usado o método direto. O método consiste em colocar uma certa quantidade de amostra numa estufa (Brinder) a 105 °C, fazendo ciclos de secagem, arrefecimento e pesagem periódicos até o peso se manter constante, sendo o teor de humidade calculado pela diferença entre a massa inicial e a massa final (seca), de acordo com o procedimento descrito no *Standard Methods* (APHA, et al., 1992).

3.1.1.2. Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado colocando uma determinada massa da drêche seca num cadinho de porcelana em mufla (Naberthem, B150) a 550 °C durante 4 h. O teor da matéria inorgânica foi determinado pela diferença entre a massa antes e após a queima, de acordo com os procedimentos descritos no *Standard Methods* (método 2460-G).

3.1.1.3. Análise granulométrica

A área de contato é um dos fatores importantes para melhorar a eficiência do tratamento enzimático. A drêche é constituída pelas cascas dos cereais, apresentando partículas com uma distribuição de tamanhos característica. A classificação granulométrica foi feita recorrendo a um sistema de peneiros com malhas de diferentes aberturas e respetivo vibrador, sendo registadas as massas da fração recolhida em cada um dos peneiros.

3.1.1.4. Poder Calorífico Superior

O valor do poder calorífico superior (PCS) foi determinado com o auxílio de uma bomba calorimétrica adiabática (Parr, 6772) – Figura 3.1. O poder calorífico superior da biomassa indica-nos o conteúdo energético da mesma. O valor do PCS foi obtido de acordo com o procedimento descrito na norma Europeia EN 14918. A equação A.1 (Anexo A) foi usada no cálculo do poder calorífico superior.

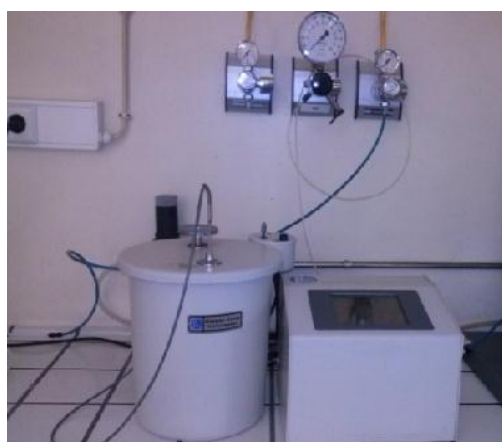


Figura 3.1 – Bomba calorimétrica usada na determinação do Poder Calorífico Superior

3.1.1.5. Teor de matéria gorda

Sendo um dos parâmetros importantes na determinação da quantidade de celulose bruta, normalmente é avaliado o teor de matéria gorda em material lenho-celulósico. A matéria gorda foi determinada após a extracção sólido-líquido pelo método de Soxhlet, de acordo com o procedimento descrito na norma portuguesa (NP-1005, 1974). A amostra foi colocada num filtro em forma de dedal no respectivo Soxhlet, ligado a um balão de fundo redondo com a solução de n-hexano levado a ebulição durante 4 h. Após esse tempo a amostra de gordura extraída e solvente foi levada a um evaporador rotativo para recuperar o solvente para posterior reutilização. O teor de matéria gorda corresponde à massa da matéria gorda (g) em 10 g de drêche seca inicialmente pesada.

3.1.1.6. Teor de celulose bruta

Com o teor de matéria gorda determinado no ponto anterior, foi quantificado o teor de celulose bruta de acordo com a norma portuguesa (NP-1005, 1974). O procedimento consiste em pesar 2 g de drêche e transferi-la para um balão de fundo redondo onde se adicionam 200 mL de H_2SO_4 a 0,1 N. Ligar o balão ao condensador e levar a mistura à ebulição com o auxílio de uma manta de aquecimento (Labmaster Isopad), durante 30 min. Após esse tempo, filtrar a mistura sob vácuo com uma membrana de fibra de vidro, lavar o bolo de filtração com água desionizada até pH neutro. Transferir

todo o resíduo de filtração para o balão com 200 mL de água desionizada, efectuar a ligação do balão ao condensador e levar a mistura à ebulição por 30 min. No final da lavagem transferir todos os resíduos para um cadinho de porcelana, previamente calcinado na mufla. Após a secagem na estufa até obtenção de massa constante calcinar o resíduo na mufla a 600 °C durante 30 min.

3.1.1.7. Teor de lenhina

Para determinar o teor de lenhina total primeiramente, foi determinada a porção de lenhina de Klason e de lenhina solúvel e posteriormente a lenhina total, que é a soma da lenhina de Klason e solúvel. A norma TAPPI T222 om-06 serviu de suporte para determinar o teor de lenhina. O procedimento consiste em pesar 1 g de drêche seca, transferir para um balão de destilação de 1000 mL e juntar 15,00 mL de H₂SO₄ com uma concentração de 72% (m/m), de forma lenta. A reação foi realizada em banho termostático a 20 °C, por 2 h sob agitação constante. Após esse tempo a reação foi interrompida pela adição de 575 mL de água desionizada, e a mistura foi levada a ebulição durante 4 h. Em seguida filtrou-se a solução num sistema de filtração em vácuo e colocou-se os resíduos na estufa até obtenção de peso constante. O teor de lenhina de Klason foi determinado com a equação A.3 (anexo A). Com o volume de filtrado proveniente da etapa anterior foi lido o valor da absorvância a 205 nm num espectrofotómetro de UV-vis (Shimadzu UV – 160A) e o teor de lenhina solúvel foi determinado pela equação A.4 (Anexo A).

3.1.1.8. Teor de carbono orgânico total

O teor do Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado de acordo com o procedimento do aparelho Analisador de COT (Shimadzu, TOC-VSN) figura 3.2, com o módulo de análise de sólidos (Shimadzu, Solid Sample Module), existente no Laboratório de Tecnologia, do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior da Engenharia do Porto (ISEP).



Figura 3.2 – Aparelho Solid Sample Module (Shimadzu) usado na determinação do teor de COT.

3.1.1.9. Teor de hemiceluloses

Devido à sua constituição, a quantificação das hemiceluloses é de grande importância neste estudo. Para determinar o teor de hemiceluloses foi usado o sistema de extração Soxhlet e manta de aquecimento. Primeiramente foi pesado 1 g de drêche seca e transferido para um balão de fundo redondo, juntando 200 mL de solução de NaOH a 2% (m/V), ligando o condensador e levando a ebulição durante 4 h. Após esse tempo, o material foi filtrado e lavado com água desionizada, seguidamente foi colocado na estufa a 105 °C até obtenção de massa constante. O teor de hemicelulose foi determinado pela razão entre a massa final e a massa da drêche seca, pesada inicialmente.

3.1.2. Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática

O pré-tratamento ácido é aplicado para quebrar as moléculas de lenhina que envolvem os polímeros de celulose e hemiceluloses, ao qual se segue a aplicação de um tratamento por hidrólise enzimática, com a finalidade de quebrar as cadeias poliméricas de celulose e hemiceluloses em açúcares simples, libertando-se então glucose, xilose, arabinose, maltose e ribose.

O pré-tratamento ácido e a hidrólise enzimática foram realizados em banho termostático à temperatura de 50 °C e com agitação à velocidade de 75 rpm. O processo decorreu em vários ensaios com diferentes tempos de reação, razão quantidade de enzimas / quantidade de drêche e com a mesma quantidade (100 mL) dos ácidos (HCl e HNO₃) à concentração de 1% (m/m), conforme o esquema da Figura 3.3 representado na secção 3.1. Em todos os ensaios o pH foi ajustado a cerca de 4,6 quando a enzima era a *Glucanex* e 6,0 quando a enzima era a *Ultraflo*.

Com o objetivo de minimizar o consumo de enzimas e maximizar a conversão dos açúcares foram realizados vários ensaios preliminares diferentes para o pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática. Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições de temperatura, concentração dos ácidos e velocidade de agitação do banho, 50 °C, 1% (m/m) e 75 rpm respetivamente. O pré-tratamento foi realizado com os ácidos HCl e HNO₃ e a hidrólise enzimática com as enzimas *Glucanex 100g* e *Ultraflo L*. Tanto os ácidos como as enzimas foram introduzidos sequencialmente.

Esses ensaios foram realizados com base no trabalho realizado por Moura (2012). A figura 3.3 representa esquematicamente o procedimento usado para o pré-tratamento e hidrólise enzimática.

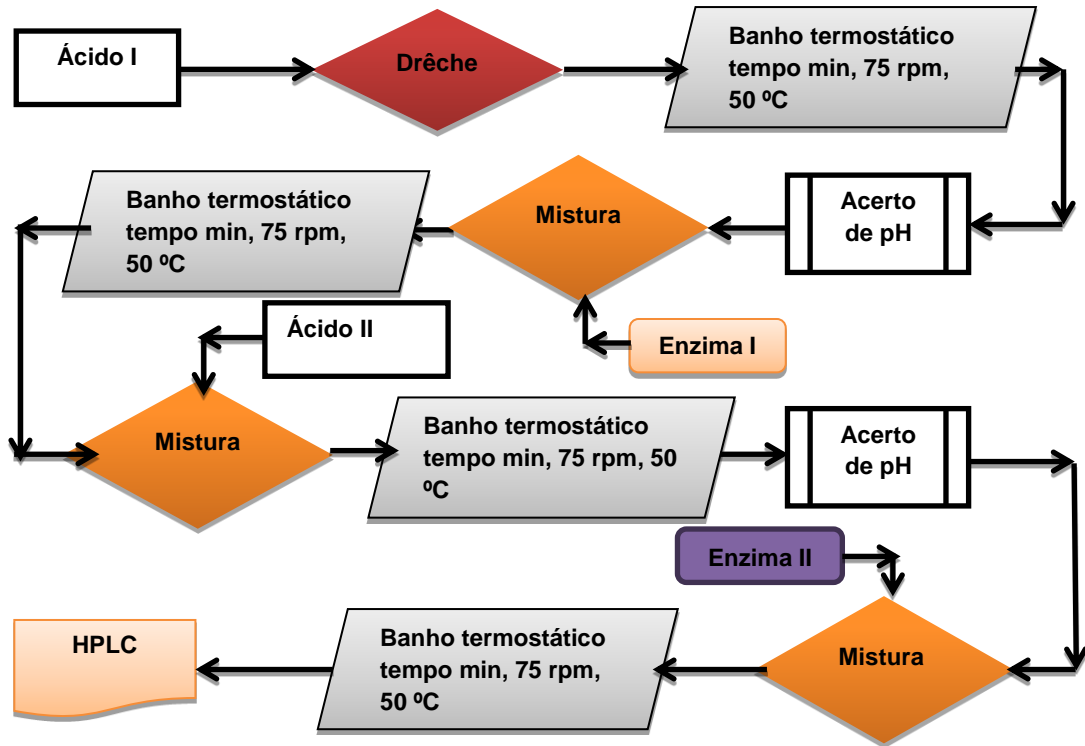


Figura 3.3 – Fluxograma das etapas de Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática.

Enzima I – *Glucanex* 100 g e Enzima II – *UltrafloL*; Ácido I – HCl e Ácido II – HNO₃

3.1.3. Fermentação dos Açúcares Resultantes do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática.

O hidrolisado resultante de ensaio 1, antes de ser submetido ao processo de fermentação foi filtrado sob vácuo, utilizando membranas de fibra de vidro para remoção dos sólidos, e depois esterilizado em autoclave a 121 °C durante 20 min.

3.1.3.1. Microorganismos Usados na Fermentação

Para a conversão dos açúcares provenientes do pré-tratamento ácido e da hidrólise enzimática em bioetanol, foram utilizadas duas estirpes: *Pichia stipitis* NCYC 1541 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 2791, adquiridas da coleção da *National Collection of Yeast Cultures* (NCYC) do Reino Unido.

3.1.3.2. Preparação de Inóculo

Os inóculos de biomassa de levedura usados nos ensaios de fermentação em meio líquido foram preparados em meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD). O YEPD foi preparado dissolvendo 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glucose em 1000 mL de água. A cultura em meio sólido foi preparada com 3,9 g de extrato de levedura, 2,0 g de peptona, 3,9 g de glucose e 4,1 g de agar em 200 mL de água. Os meios de cultura e os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 min para destruir e remover todos os organismos.

Os microorganismos foram cultivados em YEPD e incubados em estufa a 25 °C, durante 3 dias e a repicagem foi cultivada igualmente em estufa a 25 °C, durante 2 dias. Os microorganismos foram conservados em tubos de ensaio em meio de cultura YEPD sólido a temperatura de 3 °C.

3.1.3.3. Condições de Fermentação

Após ter sido escolhido o melhor procedimento para o pré-tratamento e hidrólise enzimática iniciou-se o processo fermentativo com o hidrolisado proveniente da etapa anterior e com amostras sintéticas preparadas de acordo com a Tabela 3.1 em 1000 mL de água desmineralizada. A opção pela utilização de um meio sintético teve em vista a comparação dos resultados de fermentação e avaliação do potencial efeito da existência de inibidores resultantes do processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática da drêche cervejeira.

O processo de fermentação tanto para o hidrolisado como para o meio sintético foi realizado em banho termostático a uma temperatura de 30 °C e com agitação a 75 rpm.

3.1.4 Avaliação da Eficiência do Processo de Produção de Bioetanol.

Na avaliação da eficiência do processo de produção de bioetanol a partir da drêche cervejeira recorreu-se às técnicas analíticas de espectroscopia e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o método analítico mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Esta técnica é utilizada pelos investigadores para separar e quantificar espécies numa grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido que contém a amostra na forma de uma mistura de solutos.

Neste trabalho foi utilizado um HPLC (Figura 3.4), constituído por uma válvula de injeção 231XL (Gilson) com um *loop* de amostragem de 20 µL e uma bomba Gilson (modelo 307), equipado com um detetor do tipo *Evaporative Light Scattering* (ELSD) (modelo PLEMD 960, da Polymer Laboratories), nas seguintes condições: caudal de ar de 7 mL/min, temperatura do detetor de 70 °C, e pressão na coluna de 50 bar. O eluente utilizado foi uma mistura acetonitrilo/água ultrapura nas proporções de 80:20 (v/v), a um caudal de 0,7 mL/min. A coluna usada foi uma Knauer Eurospher II 100, NH₂, 5 µm, 250x4,6 mm, c/ pré-coluna, à temperatura ambiente. O tempo de análise foi de 40 min.

Para avaliar a eficiência do processo de produção de Bioetanol, começou por se realizar a curva de calibração para os diferentes tipos de açúcares puros (arabinose, glucose, maltose, xilose e ribose). Nas tabelas B1 e B2 (anexo B), encontram-se os valores auxiliares usados para o traçado das retas de calibração (figuras B1 e B2 do anexo B).

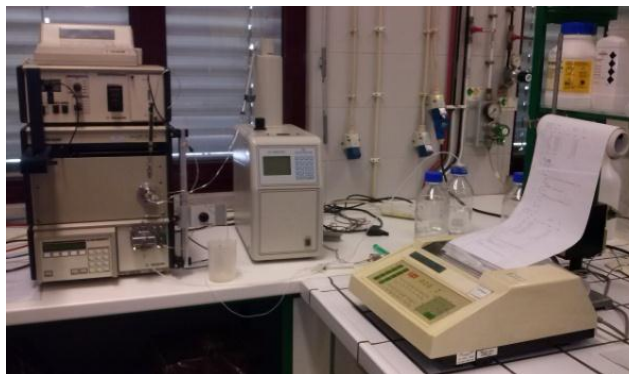


Figura 3.4 – HPLC e acessórios, usado na quantificação dos açúcares.

3.1.5 Recuperação do Bioetanol

Devido ao baixo volume de álcool produzido não foi possível realizar a destilação. Para a quantificação do etanol recorreu-se à análise pelo equipamento Anton Paar, Figura 3.5, no laboratório da UNICER. O método baseia-se na medição de densidade usando um analisador DMA 4500, de tubo em U oscilante, com módulo de medição *Alcolyzer Beer* ME e no traçador de amostra *Xsample* 122. O método de medição NIR (reflete na região próxima do infravermelho) onde elimina a efluência de outros componentes da amostra na medição do teor de álcool e garante os resultados com elevada precisão (UNICER).



Figura 3.5 – Representação de analisador Anton Paar. Fonte UNICER.

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1. Caracterização de drêche cervejeira

A drêche utilizada neste trabalho foi analisada quanto aos seus principais parâmetros físico-químicos: teor de humidade, distribuição granulométrica, teor de cinzas, poder calorífico, teor de matéria gorda, teor de celulose, teor de carbono orgânico total e o teor de hemicelulose.

3.2.1.1. Teor de humidade

O teor de humidade da amostra congelada e da amostra bruta recolhida foi de 72,0% e 72,6%, respetivamente. Os resultados estão próximos dos valores fornecidos pela Unicer (Tabela 2.1). No anexo A, na Tabela A.1 e A.2 encontram-se os resultados determinados experimentalmente.

3.2.1.2. Teor da Cinzas

O valor das cinzas encontrado foi de 4,4 %, (anexo A tabela A.3) o que vai de encontro aos valores publicados na Tabela 2.1 (Mussatto, et al., 2006).

3.2.1.3. Granulometria

A classificação granulométrica da drêche seca faz-se passando a matéria-prima por peneiros da série de Taylor com aberturas de 1,19; 0,710; 0,600; 0,500; 0,420; 0,297; 0,149 mm. Com a massa retida em cada peneiro e a massa total foi determinada a distribuição granulométrica, que se encontra representada na Figura 3.6.

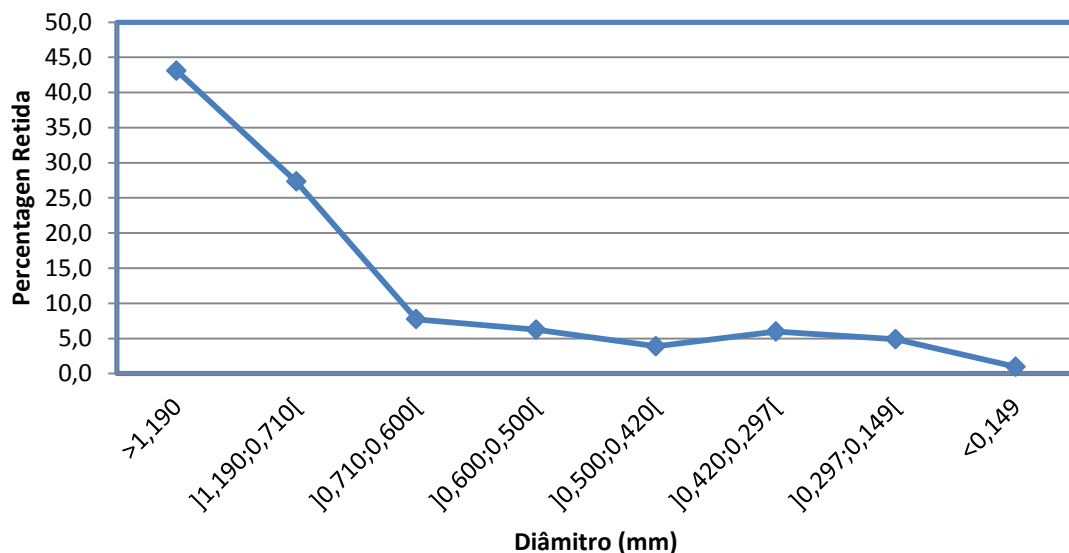


Figura 3.6 – Distribuição granulométrica da drêche

3.2.1.4. Poder calorífico superior

Na Tabela A.5 do anexo A encontra-se o resultado determinado neste estudo para a amostra de drêche colhida e que foi de 19,8 MJ/kg de drêche seca. Esses valores foram obtidos de acordo com o procedimento descrito na norma Europeia EN 14918.

3.2.1.5. Teor de matéria gorda

O resultado encontrado na determinação de matéria gorda para a amostra de drêche colhida e usada neste estudo foi de 5,4% conforme se pode ver na Tabela A.6, anexo A, e está ligeiramente abaixo do valor fornecido pela Unicer (6,9 a 7,9%).

3.2.1.6. Teor de celulose

A fração da celulose obtida foi de 6,09 %. Pode-se verificar que este valor foi menor do que o valor fornecido na bibliografia, na Tabela 2.1. Como a baixa concentração da celulose implica normalmente uma baixa concentração da glucose pode haver uma diminuição no rendimento em bioetanol na produção de bioetanol de 2ª geração. Os valores auxiliares para o cálculo do teor de celulose encontram-se no anexo A (Tabela A.7).

3.2.1.7. Teor de lenhina

O valor do teor de lenhina determinado foi de 34,8 %, o que está ligeiramente acima dos valores fornecidos na Tabela 2.1. A presença de elevado teor de lenhina pode dificultar o pré-tratamento e hidrólise enzimática e conseqüentemente a conversão de drêche em etanol. Os resultados obtidos encontram-se listados nas tabelas A.8 e A.9 (Anexo A).

3.2.1.8. Teor de carbono orgânico total

O valor do teor de carbono orgânico total (COT) obtido experimentalmente foi de 97,9 % e encontra-se na Tabela A.11.

3.2.1.9. Teor de hemiceluloses

O valor determinado experimentalmente foi de 39,7 %, ligeiramente inferior ao valor encontrado por Xiros et al. (2008), Tabela 2.1. Os valores que serviram para o cálculo do teor das hemiceluloses encontram-se na Tabela A 12 (Anexo A).

Na Figura 3.7 encontra-se representado o resultado de um estudo comparativo entre Mussatto et al. (2006) e Xiros et al. (2008), e o valor determinado no presente trabalho para a composição química, para a drêche cervejeira.

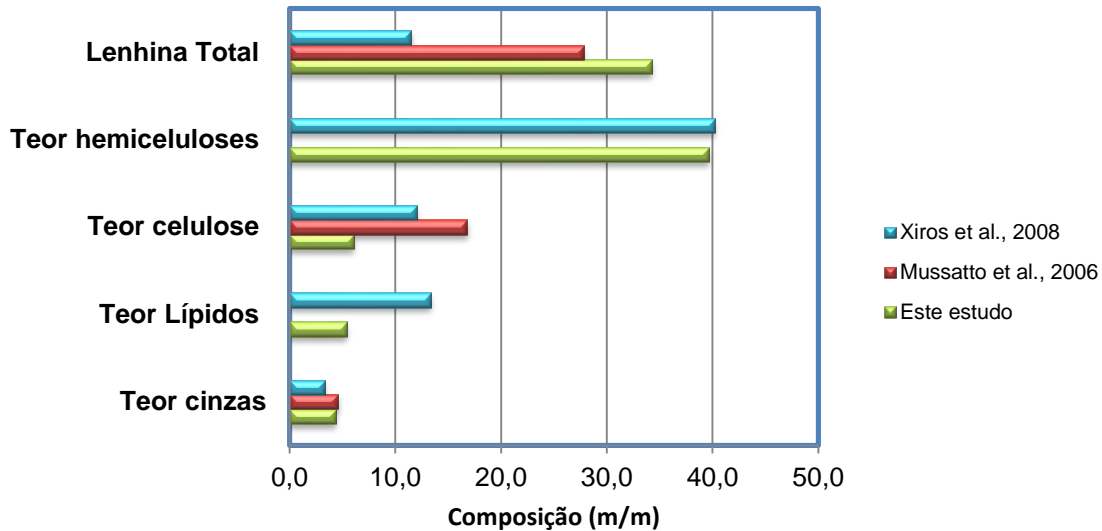


Figura 3.7 – Composição química da drêche cervejeira.

Na figura 3.7 pode-se observar que o teor de hemiceluloses determinado no presente trabalho (39,7%) é aproximadamente igual ao reportado por Xiros et al, (2008) (40,2%). O teor de cinzas é semelhante ao determinado por Mussatto et al. (2006). No entanto o valor do teor de celulose, o principal responsável pelas hexoses (glucose e maltose) foi bastante menor em relação ao determinado pelos autores anteriormente referidos. Em relação ao teor de lenhina, o valor encontrado é de aproximadamente 35%, valor esse que é superior aos valores encontrados por Mussatto et al., (2008) e Xiros et al., (2006).

3.2.2. Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática

Para avaliar a eficiência das diversas etapas do processo, nomeadamente o pré-tratamento e a hidrólise enzimática foram quantificados os açúcares libertados da biomassa após a aplicação do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática em cada um dos ensaios. As Tabelas 3.1 a 3.2 e as Figuras 3.8 a 3.11 apresentam a quantidade de açúcares libertados, em cada ensaio, pelas enzimas *Glucanex 100g* e *Ultraflo L*, a partir de 25 g de drêche seca.

Das Tabela 3.1 e Tabela 3.2 pode verificar-se que o aumento da razão quantidade de enzimas/quantidade de drêche favorece o aumento da conversão dos açúcares até um ponto ótimo, a partir do qual o aumento da quantidade de enzimas já não favorece o aumento da conversão. Ainda é de observar que quando a quantidade de enzimas aumenta para valores de cerca de 150% em relação ao ensaio 1, a conversão dos açúcares decresce aproximadamente 42%, no ensaio 4, com maior decréscimo para a

xilose, pelo que podemos concluir que existe uma quantidade ótima de enzimas a usar para que a conversão seja completa.

Em relação ao tempo de contato, pode-se observar que o aumento do tempo de contato não favorece o aumento da conversão dos açúcares.

Da análise dos resultados das Tabelas 3.1 e 3.2 pode-se observar que ao aumentar o tempo de contato da enzima diminui a quantidade dos açúcares convertidos, o que significa que os 30 min são necessários para que a reação de hidrólise seja completa.

Assim, para o ensaio 1, o tempo da reação com o ácido I (HCl) e enzima I (*Glucanex 100g*) foi de 60 minutos repartidos em períodos de 30 minutos cada, e o tempo de contato para a reação do ácido II (HNO₃) e enzima II foi também o mesmo (i). No que diz respeito à quantidade de enzimas, para cerca de 25 g de drêche seca foram usados 0,5 g de Glucanex e 0,5 mL de Ultraflo.

Da análise da Figura 3.8 pode-se concluir que a ribose e a arabinose foram os açúcares simples com a maior taxa de produção. Pode ainda observar-se que a maior taxa de produção de açúcares totais ocorreu no ensaio 4, em que a ribose e a arabinose constituíram aproximadamente 66% e 17% dos açúcares totais, correspondendo a uma massa de 3,7 g e 0,9 g respetivamente. No entanto, o ensaio 1 apresenta maior taxa de conversão para a xilose e a maltose, respetivamente 0,5 g e 0,76 g, correspondentes a cerca de 14% e 20% dos açúcares totais.

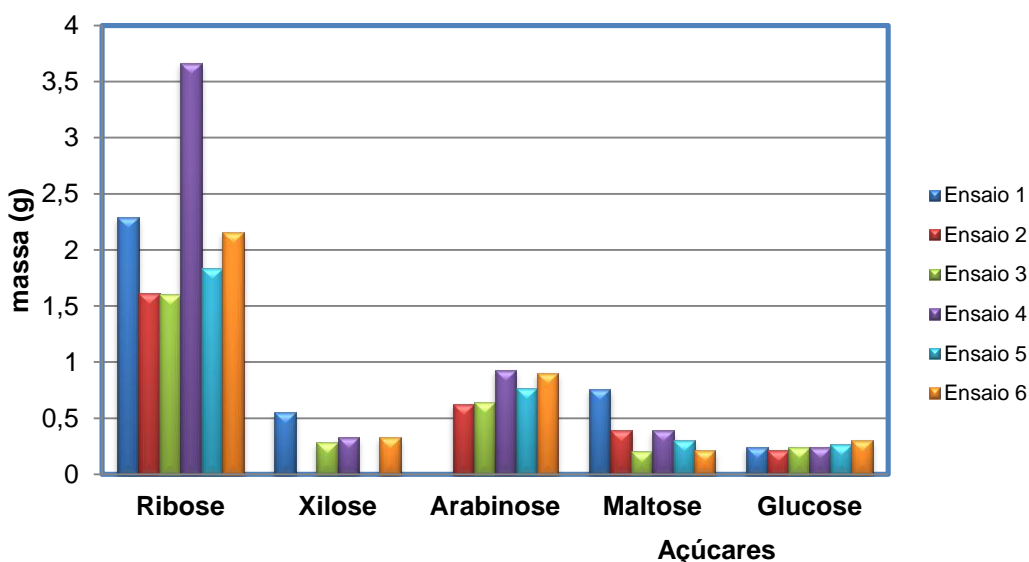


Figura 3.8 – Açúcares obtidos após a aplicação do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática, nos diversos ensaios.

Tabela 3.1 – Condições experimentais e conversão dos açúcares para os Ensaios 1 a 3.

Ensaio	t _{contacto al} (min)	t _{contacto el} (min)	t _{contacto all} (min)	t _{contacto ell} (min)	m _{Glucanex} (g)	V _{Ultraflo} (mL)	V _{filtrado} (L)	Comp	t (min)	A _p (min)
1	30	30	30	30	0,5	0,5	0,146	Ribose	17,247	1368
								Xilose	19,408	1013
								Arabinose	----	---
								Maltose	34,467	1587
								Glucose	36,706	775
								m _{Total} (g)		
2	30	60	30	30	0,5	0,5	0,138	Ribose	16,11	966
								Xilose	---	---
								Arabinose	24,92	363
								Maltose	32,76	638
								Glucose	34,668	685
								m _{Total} (g)		
3	60	60	30	30	0,5	0,5	0,147	Ribose	15,672	892
								Xilose	18,78	273
								Arabinose	24,753	312
								Maltose	32,467	648
								Glucose	34,384	761
								m _{Total} (g)		

Tabela 3.2 – Condições experimentais e conversão dos açúcares para os Ensaios 4 a 6.

Ensaio	t _{contacto al} (min)	t _{contacto el} (min)	t _{contacto all} (min)	t _{contacto ell} (min)	m _{Glucanex} (g)	V _{Ultraflo} (mL)	V _{filtrado} (L)	Comp	t (min)	A _p (min)
4	60	60	30	30	1,0657	2,0	0,150	Ribose	14,687	2244
								Xilose	20,617	3835
								Arabinose	23,083	8642
								Maltose	30,432	5375
								Glucose	31,895	7275
								m _{Total} (g)		
5	30	30	30	60	1,5464	2,3	0,140	Ribose	15,208	1112
								Xilose	----	--
								Arabinose	23,418	6438
								Maltose	30,162	3795
								Glucose	31,618	1038
								m _{Total} (g)		
6	420	420	960	420	0,5228	0,5	0,142	Ribose	14,427	1317
								Xilose	20,062	4395
								Arabinose	22,05	9095
								Maltose	25,073	1055
								Glucose	29,402	1244
								m _{Total} (g)		

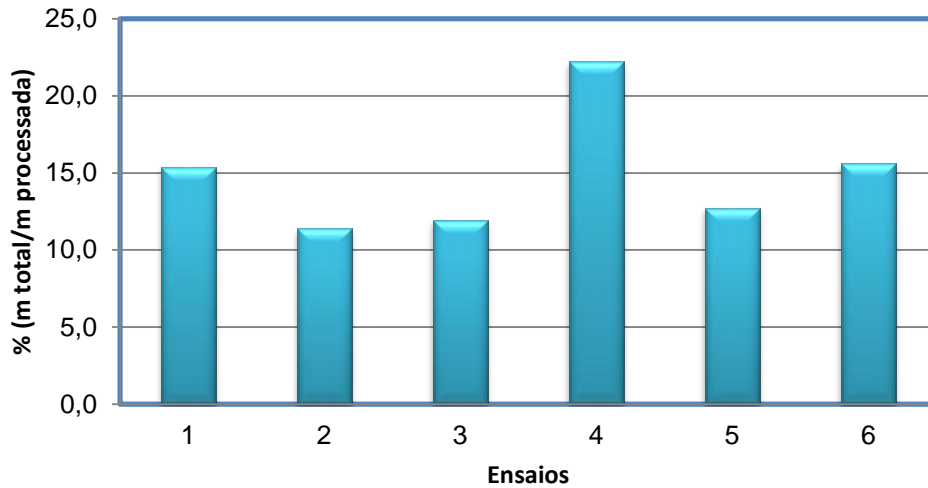


Figura 3.9 – Percentagem dos açúcares totais obtidos em relação à massa processada.

Analisando a Figura 3.9 pode-se concluir que a maior quantidade de açúcares totais foi obtida no ensaio 4 com 22,3% seguida dos ensaios 1 e 6, com aproximadamente 15% cada. A máxima conversão reportada em estudos anteriores foi de 72% (Moura, 2012), para uma amostra de drêche com uma percentagem de celulose de aproximadamente 13% e em que a quantidade de enzimas usada foi de 2,5 g de *Glucanex 100g* e 2,3 mL de *Ultraflo L*. No estudo agora realizado, a percentagem de celulose na drêche era de apenas 6% e a quantidade de enzimas adicionada foi de 0,5 g de *Glucanex 100g* e 0,5 mL de *Ultraflo L*.

As figuras 3.10 e 3.11 representam a taxa da conversão das pentoses e hexoses obtidas a partir de 25 g de drêche cervejeira.

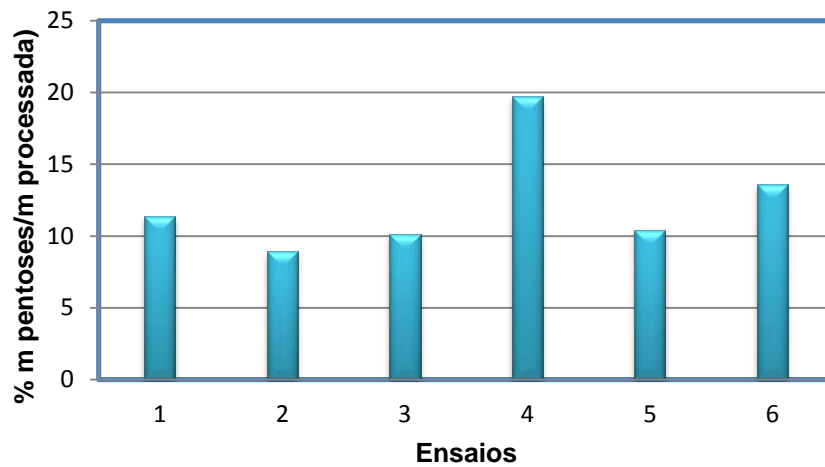


Figura 3.10 – Percentagem das pentoses obtidas em relação à massa de drêche processada em cada um dos Ensaio.

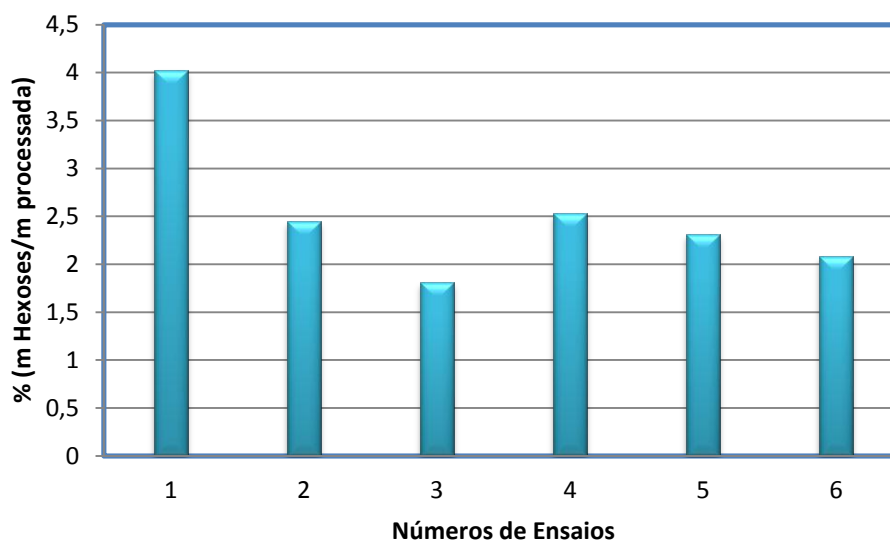


Figura 3.11 – Percentagem das hexoses obtidas em relação à massa de drêche processada em cada um dos Ensaio.

Com base na Figura 3.10 pode concluir-se que os ensaios 4 e 6 originaram maior conversão dos polissacarídeos a pentoses, correspondendo a cerca de 20 % e 13 %, respetivamente.

Analisando a Figura 3.11 é possível concluir-se que nos ensaios 1 e 4 ocorre maior conversão dos polissacarídeos a hexoses, com cerca de 4% e 2,5%, respetivamente. A baixa conversão dos polissacarídeos a hexoses deve-se ao baixo teor da celulose, 6%, presente na amostra de drêche cervejeira utilizada.

Em suma, podemos considerar que no ensaio 1 se obteve maior rendimento de conversão dos polissacarídeos do que nos restantes ensaios, uma vez que a quantidade das enzimas utilizadas foi de 0,5 g para o *Glucanex 100g* e 0,5 mL para o *Ultraflo L* e o tempo de pré-tratamento e hidrólise enzimática foi de 60 min repartido em 30 min cada operação.

3.2.3. Fermentação dos Açúcares Resultantes do Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática.

Escolhido o melhor procedimento para o pré-tratamento e hidrólise enzimática iniciou-se o processo fermentativo com amostras sintéticas preparadas de acordo com a composição da Tabela 3.3 em 1000 mL de água desmineralizada e com o hidrolisado proveniente da etapa anterior (pré-tratamento e hidrólise enzimática). A opção pela utilização de um meio sintético teve em vista a comparação dos resultados de

fermentação e avaliação do potencial efeito da existência de inibidores resultantes do processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática da drêche cervejeira.

O processo de fermentação tanto para o hidrolisado como para o meio sintético foi realizado em banho termostático a uma temperatura de 30 °C e com agitação a 75 rpm.

Tabela 3.3 - Composição em açúcares do meio de fermentação sintético (1000 mL de solução).

Açúcares	Ribose	Arabinose	Xilose	Maltose	Glucose
m (g)	12,8855	9,6881	15,806	8,2929	12,4563

O processo de fermentação dos açúcares foi realizado ao longo de um período de 72 horas. As amostras foram recolhidas periodicamente para a quantificação do consumo dos açúcares. Ambos os ensaios foram realizados com 10% (v/v) do inóculo. A cinética do consumo dos açúcares em meio sintético com as leveduras de *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* encontram-se representados nas Figura 3.12 a Figura 3.15.

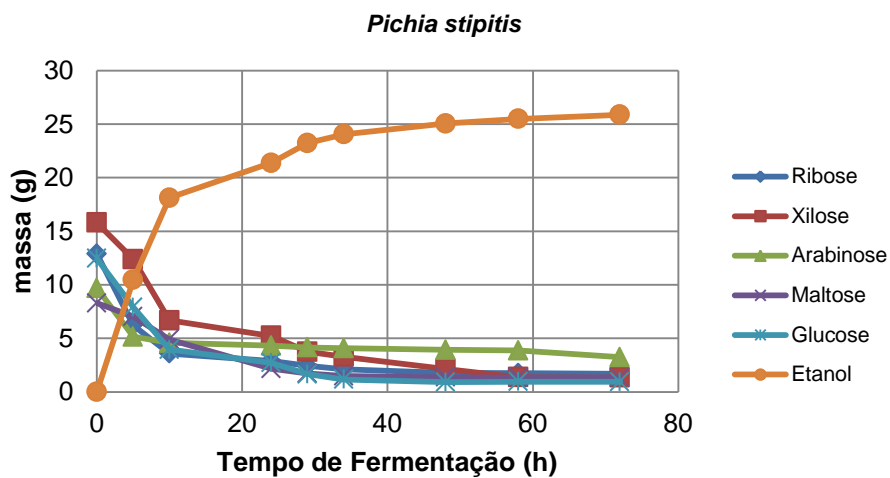


Figura 3.12 – Evolução da massa de cada um dos açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por *Pichia stipitis* (resultados experimentais) e massa de etanol expectável no meio.

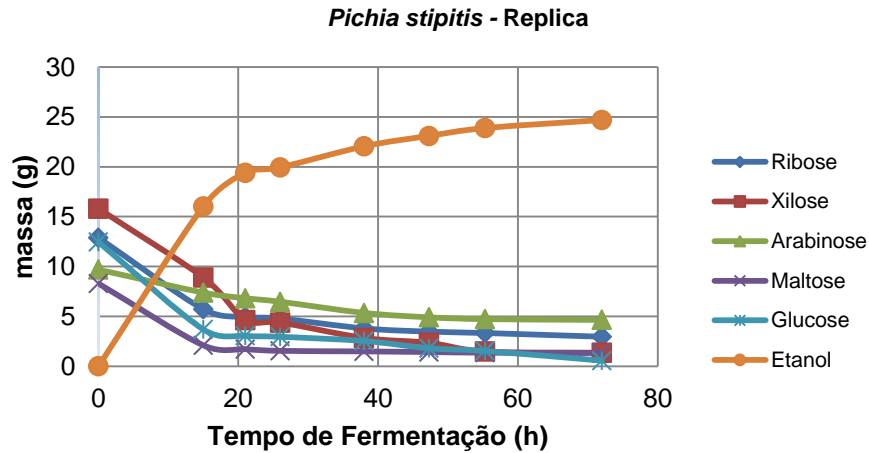


Figura 3.13 – Evolução da massa de açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por *Pichia stipitis* (resultados experimentais) e massa de etanol expectável no meio (réplica).

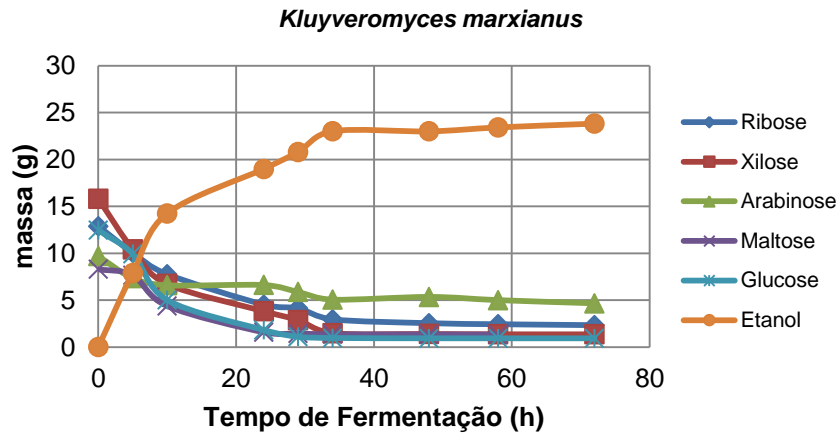


Figura 3.14 – Evolução da massa de açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por *Kluyveromyces marxianus* (resultados experimentais) e massa de etanol no meio

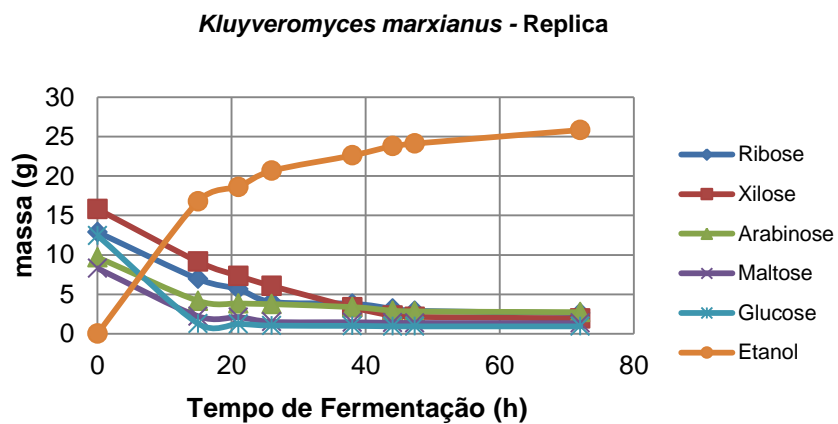


Figura 3.15 – Evolução da massa de açúcares no meio sintético (1 L) fermentado por *Kluyveromyces marxianus* (resultados experimentais) e massa de etanol no meio (réplica).

Da análise da Figura 3.12 à Figura 3.15 pode-se concluir que as leveduras cultivadas em meio sintético foram capazes de consumir cerca de 80% dos açúcares presentes no meio, após 72 horas de fermentação, com menor eficiência para a arabinose. O maior consumo dos açúcares ocorreu nas primeiras 40 horas, altura a partir da qual as concentrações dos açúcares se mantiveram praticamente constantes no mosto. Os resultados obtidos experimentalmente, usados na construção dos gráficos encontram-se nas tabelas do Anexo BI.

No que diz respeito à produção de etanol, as Figuras 3.12 a 3.15 indicam uma massa total de álcool produzida de aproximadamente 25 g. O processo de fermentação iniciou-se com a massa total dos açúcares de 59.13 g e após 72 horas apresentava uma massa média dos açúcares de 10 g, o que corresponde a uma conversão de cerca de 83%.

Para ambas as leveduras foram realizadas réplicas. Os resultados das Figuras 3.12 para *Pichia stipitis* e Figura 3.14 para *Kluyveromyces marxianus* permitem concluir pela concordância dos resultados obtidos na fermentação, em particular no caso da *Kluyveromyces marxianus*.

Em conformidade com os resultados apresentados na Tabela 3.4, pode-se verificar que as leveduras *Pichia stipitis* (A) e *Kluyveromyces marxianus* (B) foram capazes de consumir mais de 80% dos açúcares presentes no meio sintético, após 72 horas de fermentação.

Após o estudo da cinética do consumo dos açúcares em meio sintético, iniciou-se o estudo da cinética de fermentação do hidrolisado da drêche cervejeira. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 3.16 a 3.19, para fermentações realizadas nas mesmas condições de temperatura, tempo e velocidade de agitação (30 °C, 72 h e 75 rpm respectivamente). Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

Nas Figuras 3.16 a 3.19 está representada a cinética do consumo dos açúcares do hidrolisado da drêche pelas leveduras *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*. Analisando os resultados destas figuras pode-se observar que ambas as leveduras foram capazes de consumir os açúcares presentes no hidrolisado de drêche, com maior consumo pela *Pichia stipitis* (45,1%), Tabela 3.4. Observa-se ainda que a maior produção teórica do etanol (3,34 g) foi obtida com a *Pichia stipitis* e a menor (2,32 g) com a *Kluyveromyces marxianus* após 72 horas de fermentação. O correspondente volume teórico do álcool produzido foi de 4,3 mL pela *Pichia stipitis* (a partir de

aproximadamente 100 g de drêche) enquanto a *Kluyveromyces marxianus* produziu apenas 2,9 mL de álcool.

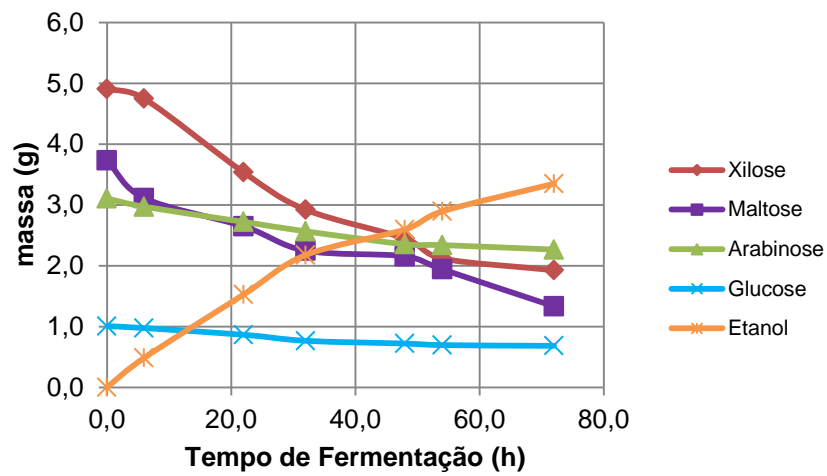


Figura 3.16 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por *Pichia stipitis*.

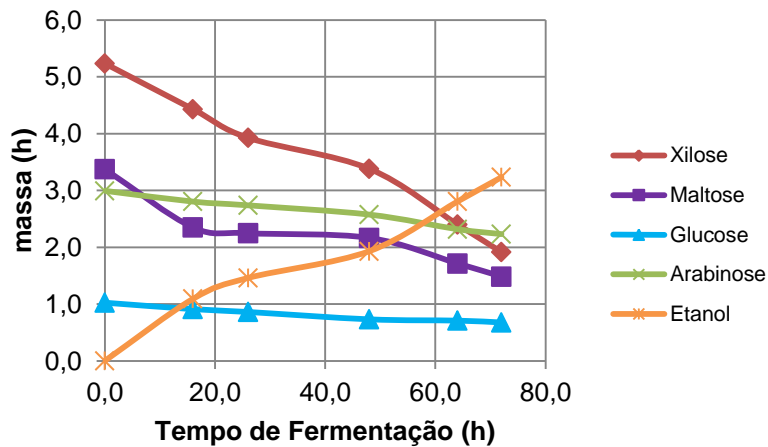


Figura 3.17 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por *Pichia stipitis* (réplica).

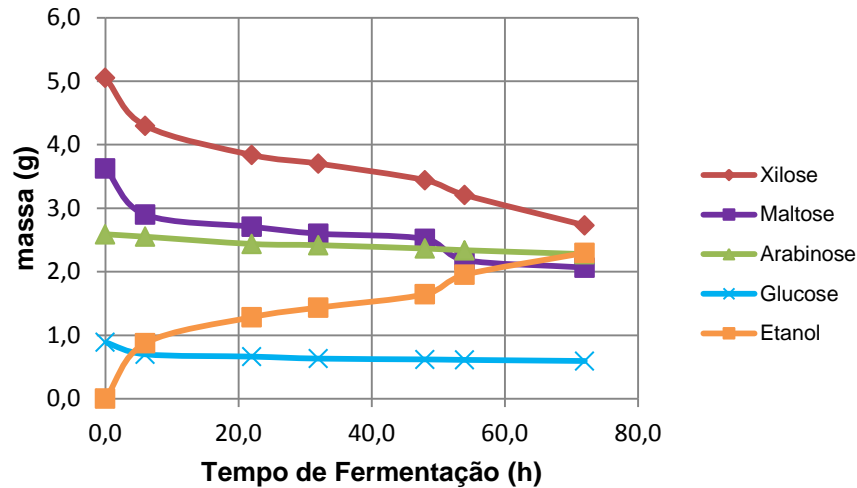


Figura 3.18 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por *Kluveromyces marxianus*.

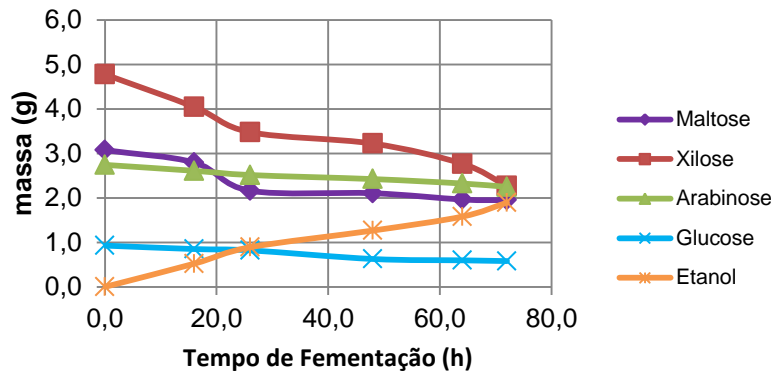


Figura 3.19 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por *Kluveromyces marxianus* (réplica).

Na Tabela 3.4 encontram-se os valores determinados experimentalmente da eficiência de fermentação nos hidrolisados da drêche e nos meios sintéticos. Consta-se que a eficiência de fermentação por ambas as estirpes foi de aproximadamente 90% para a xilose no meio sintético enquanto no hidrolisado a eficiência de fermentação da xilose foi de apenas 58,0 % pela *Pichia stipitis* e de 46,46% pela *Kluveromeces marxianus*. A eficiência de fermentação da arabinose foi de 59,30% em meio sintético e 22,8% em hidrolisado por *Pichia stipitis*, e de 61,82% em meio sintético e 15,35% em hidrolisado por *Kluveromeces marxianus*.

Tabela 3.4 – Eficiência de fermentação dos hidrolisados da drêche e de meios sintéticos e os respectivos rendimentos experimental.

<i>P. stipitis</i>	Substratos	%Conversão Experimental	Y (g etanol/100g drêche)	<i>K. marxianus</i>	Substratos	%Conversão Experimental	Y (g etanol/100g drêche)
Licor Sintético	Xilose	91,47±0,07	n.d	Licor Sintético	Xilose	89,59±2,62	n.d
	Arabinose	59,30±10,33			Arabinose	61,82±14,05	
	Ribose	82,01±7,04			Ribose	80,84±1,50	
	Maltose	83,97±0,02			Maltose	83,93±0,07	
	Glucose	93,97±2,10			Glucose	92,52±0,01	
	Total	83,61±2,80			Total	83,74±0,15	
Hidrolisado da drêche	Xilose	58,0±12,35	0,17	Hidrolisado da drêche	Xilose	46,46±5,98	0,06
	Arabinose	22,8±6,02			Arabinose	15,35±3,04	
	Maltose	55±9,80			Maltose	41,46±4,32	
	Glucose	26,0±12,41			Glucose	27,420±13,77	
	Total	45,1±9,70			Total	36,58±2,49	

n.d: não disponível

De acordo com os resultados da Tabela 3.4 a *Pichia stipitis* apresenta maior rendimento de conversão de açúcares, tanto em meio sintético como em hidrolisado da drêche do que a *Kluyveromyces marxianus*. Segundo White et al. (2008), a conversão de açúcar sintético por fermentação em 48 horas é superior a 60% por *Pichia stipitis* e superior a 30% quando foi utilizada a *Kluyveromyces marxianus* (Tabela 2.5). No trabalho agora realizado, os valores encontrados após 72 horas de fermentação de açúcares em meio sintético foram superiores ao encontrado por White et al (83%) com ambas as estirpes.

Aloisio et al. (2014) realizaram um estudo de fermentação com a estirpe *Pichia stipitis* em meio sintético e hidrolisado de biomassa de amoreira e concluíram que, em meio sintético, a estirpe é capaz de consumir 10 kg/m³ de xilose em 24 h, podendo atingir 17 kg/m³ em 30 horas de fermentação, Já no caso da glucose, a *Pichia stipitis* foi capaz de fermentar 17 kg/m³ de glucose em 10 horas de fermentação. No que diz respeito ao hidrolisado de biomassa de amoreira, a *Pichia stipitis* foi capaz de consumir toda a glucose, mas apenas 11% da xilose, correspondendo a uma produção de etanol total de 2,6 kg/m³ (Aloisio, et al., 2014). O valor da eficiência, em 72 h de fermentação, determinado neste trabalho para glucose foi de 93% em amostra de licor sintético e 26% para o hidrolisado da creche, usando a *Pichia stipitis*.

3.2.4 Recuperação do Bioetanol

O resultado do teor de álcool no mosto de fermentação determinado experimentalmente foi de 0,22 % para a *Pichia stipitis* e 0,08 % (v/v) para a *Kluyveromyces marxianus*, correspondendo a uma produção de álcool em volume de 1,32 mL e 0,48 mL e em massa de 1,054 g e 0,378 g respetivamente. O rendimento real da produção de álcool foi de 0,085 g de álcool por g de açúcar pela *Pichia stipitis* e 0,0308 g de álcool por g de açúcar pela *Kluyveromyces marxianus*. O resultado encontrado por White et al (2008) foi de 0,32 g para *Pichia stipitis* e 0,22 g para a *Kluyveromyces marxianus*, valores estes superiores aos encontrados no presente estudo. A explicação para os baixos resultados de conversão pode estar relacionada com o tipo de pentoses existentes neste trabalho mas também com a presença de produtos inibidores da fermentação e que não foram removidos antes da referida etapa.

3.3. Conclusões

Este trabalho teve como objetivo a otimização da etapa de fermentação da drêche cervejeira pelos microorganismos *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*.

Para atingir o objetivo traçado, primeiramente começou-se por realizar a caracterização físico-química da drêche, avaliando os valores dos parâmetros: teor de humidade, granulometria, teor de cinzas, poder calorífico, teor de matéria gorda, teor de celulose, teor de lenhina, teor de carbono orgânico total e teor de hemiceluloses. A amostra em estudo era constituída por 72% de humidade, 28% de sólidos, dos quais 4,4% cinzas, 5,5% lípidos, 6,1% celulose, 39,7% hemiceluloses, 34,5% lenhina, correspondendo a 97,9% de carbono orgânico total e com um poder calorífico superior de 19,8 MJ/kg.

Após a caracterização da drêche, procedeu-se ao pré-tratamento com ácido e hidrólise enzimática, tendo sido realizados um conjunto de ensaios com vista à minimização do consumo de enzimas e, por conseguinte, do custo do processo. O melhor resultado foi obtido no ensaio 4 onde o tempo de reação foi de 60 minutos, tanto para o ácido I (HCl) como para a enzima I (*Glucanex 100g*). O tempo de reação para o ácido II (HNO₃) e enzima II (*Ultraflo L*) foi de 30 minutos cada. A massa de *Glucanex 100g* utilizada no ensaio 4 foi de 1,06572 g e o volume de *Ultraflo L* de 2,0 mL, para 25 g de drêche seca. No referido ensaio o rendimento total em açúcares foi de 5,564 g de açúcar por cada 25 g de drêche, correspondente a uma taxa de conversão de 22,2%.

No ensaio 1 a percentagem de conversão a açúcares foi menor do que no ensaio 4, aproximadamente 15%, correspondente a uma massa total de açúcares de 3,848 g por cada 25 g da drêche, mas podemos considerar que o ensaio 1 foi mais eficiente do que o ensaio 4 uma vez que foi utilizado menor tempo de reação e menor quantidade de enzimas – 30 minutos para ambos os ácidos e ambas as enzimas, 0,5 g de *Glucanex 100g* e 0,5 mL de *Ultraflo L*. Os açúcares identificados após a hidrólise enzimática são as pentoses (arabinose, xilose e ribose) e as hexoses (glucose e maltose). Devido ao elevado teor de hemiceluloses, a conversão para as pentoses foi cerca de 20% no ensaio 4 e 11% no ensaio 1.

Com o licor obtido após a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática no ensaio 1 e com a amostra de licor de açúcares em meio sintético iniciou-se o processo de fermentação com as leveduras *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* cultivadas em YEPD. No licor sintético a eficiência de fermentação foi superior a 80% tanto para *Pichia stipitis* como para *Kluyveromyces marxianus*, com uma produção estimada de 25 g de etanol a partir de 59 g de açúcares totais. A eficiência de fermentação em licor

sintético foi em média de 91% para xilose e de 60% para a arabinose por ambas as leveduras.

Para o hidrolisado de drêche a eficiência total de fermentação foi de 45,1% pela *Pichia stipitis* e de 36,58% pela *Kluyveromyces marxianus* com uma produção teórica de etanol de 3,2 g para a primeira e de 2,2 g para a segunda em 12,23 g de açúcar totais/100 g de drêche. A eficiência de fermentação foi de 58,0% para a xilose e 22,8% para a arabinose por *Pichia stipitis* enquanto que para *Kluyveromyces marxianus* foi de 46,46% para a xilose e de 15,35% para a arabinose após um tempo de fermentação de 72 h. O resultado do rendimento teórico em etanol encontrado foi de 0,27 g/g de açúcar para *Pichia stipitis* e de 0,19 g/g de açúcar para *Kluyveromyces marxianus* e o rendimento real em álcool foi de 0,0856 g/g de açúcar para *Pichia stipitis* e 0,0308 g/g de açúcar para *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado da drêche. Para a *Pichia stipitis* o rendimento teórico é três vezes menor do que o rendimento real e para *Kluyveromyces marxianus* foi seis vezes menor.

Finalmente, mesmo ocorrendo consumo de açúcar para o metabolismo e crescimento das leveduras, a produção teórica de etanol foi muito baixo nas condições operatórias do presente trabalho. Esse baixo rendimento em álcool durante a fermentação do hidrolisado da drêche pode estar relacionado com a formação de produtos inibidores durante o processo de hidrólise enzimática da drêche.

Embora neste trabalho não tenha sido possível otimizar completamente as condições de fermentação dos hidrolisados de drêche cervejeira, foi possível identificar e testar duas leveduras capazes de metabolizar pentoses, o que não acontece com a *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura que habitualmente apenas fermenta a glucose.

3.4 Trabalhos futuros

Após a realização do presente trabalho e face aos resultados obtidos, foi possível identificar alguns aspetos passíveis de melhoria, conducentes à real otimização das condições de fermentação dos açúcares no hidrolisado da creche cervejeira. Assim, sugere-se:

- ✓ Estudar outras condições e formas de condução do processo de fermentação, como por exemplo a alteração do pH e da temperatura de fermentação;
- ✓ Melhorar a forma de recolha das amostras, para quantificação do consumo dos açúcares;
- ✓ Fazer um estudo mais aprofundado em relação às condições de arejamento para as leveduras utilizados no presente estudo;
- ✓ Avaliar os fatores que interferem na produção de etanol a partir dos materiais lenho-celulósicos, como por exemplo a formação de xilitol, que inibe a formação de etanol.

Referencias

Almeida, J. R. M. d., 2013. Adaptado.

<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Newsletter.asp?id=27735&secao=Artigos%20Especiais>. [Online]

[Acedido em 28 Novembro 2013].

Almeida, J., Runquist, D., Sánchez i Nogué, V. & Lidén, G. G.-G. M., 2011. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol. *Biotechnology Journal*, 6(3), p. 286–299.

Aloisio, L., De Santis, A., Spera, D. & Pignatelli, V. & A. R., 2014. Innovative of Second Generation Ethanol Production from Biomass Crops by *Pichia Stipitis*. *Chemical Engineering Transactions*, Volume 38, pp. 115-120.

APHA, AWAA & WPCF, 1992. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. s.l.:s.n.

Ask, M. et al., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, Volume 90, p. 391–418.

Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), p. 858–875.

Balat, M., Balat, H. & Cahide, O., 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), p. 551–573.

Berg, M., Tymoczko, J. & Stryer, I., 2004. *Bioquímica*. Brasil: GUARNABARA KOOGAN S.A.

Cabral, J., Gama, M. & Aires-Barros, R., 2003. *Engenharia Enzimática*. Lisboa: LIDEL.

Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A. & El-Halwagi, M., 2012. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*, 90(3), p. 189–202.

Coulson, J. M., 1993. *Operações Unitárias: Volume II. Fundação Calouste Gulbenkian*. s.l.:s.n.

Dagnino, E., Chamorro, E., Romano, S. & Felissia, F. A. M., 2012. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, Volume 42, pp. 363-368.

Demirbas, A., 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, pp. 108-117.

Eiras, R., Duarte, A., Fernandes, C. & Guillermo, V. e. S. N., 2011. *Segurança Nacional e Estratégias Energéticas de Portugal e de Espanha (IDN Cadernos, 3ª série; Nº 4)*, Lisboa: Instituto da defesa Nacional.

Energy, s.d. [Online]

Available at: http://www.afdc.energy.gov/fuels/ethanol_production.htm

[Acedido em 14 10 2013].

Eurobserv`ER, 2013. *Biofuels Barometer*, http://www.energies-renouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro216_en.pdf: s.n.

Ferreira, J., 2009. *Extracção de Hemiceluloses com Líquidos Iónicos*, Departamento de Química, Universidade de Aveiro: Dissertação de Mestrado.

Ferreira, W., Lima, N. & Sousa, J., 1998. *Microbiologia*. Lisboa-Porto-Coimbra: LIDEL.

Fonseca, M. M. d. & Teixeira, J. A., 2007. *Reactores Bilógicas, Fundamentos de Aplicações*. s.l.:LIDEL.

Fonseca, M. & Teixeira, J., 2007. *Reactores Bilógicos, Fundamentos e Aplicações*. s.l.:LIDEL.

Hendriks, A. & Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), pp. 10-18.

ICNA, 2013. *Relatório de Agronegócio*, Instituto de CNA: Knowtec.

ICNA, 2013. *Relatório de Agronegócio*, Instituto de CNA: by knowtec.

Klock, P. D. U., s.d. *Química da Madeira*, UFPR/DETF: s.n.

Klock, U., Muñiz, G., Hernandez, J. & Andrade, A., 2005. *Química da Madeira*, Curitiba: UFPR/DETF.

Kuhada, R., Gupta, R., Khasa, Y. & Singh, A. Z. Y.-H., 2011. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 15(9), p. 4950– 4962.

Liang, M., Kim, M., He, Q. & Wang, J., 2013. Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(3), pp. 319-326.

Limayema, A. & Ricke, S. C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, p. 449e467.

Limayem, A. & Ricke, S., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), pp. 449-467.

M. Berg, J., Tymoczko, J. L. & Stryer, I., 2004. *Bioquímica*. Brasil: GUARNABARA KOOGAN S.A.

- Magnus, et al., 2012. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated Arundo donax revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 47(10), p. 1452–1459.
- Mesa, L. et al., 2011. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 175(15), p. 185– 191.
- Moura, R., 2012. *Otimização das etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da drêche cervejeira a açúcares com vista à produção de bioetanol*, Dissertação de Mestrado: ISEP, Porto.
- Mussatto, S., Dragone, G. & Roberto, I., 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics. *Journal of Cereal Science*, 43(1), p. 1–14.
- Neitzel, T., 2013. *Estudo da aplicação de hemicelulases no reaproveitamento do licor de pentoses na produção de etanol de segunda geração*, Universidade Regional de Blumenau: Relatório técnico-científico de Projecto no âmbito do 22º Programa Bolsas de Verão do CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais..
- Nelson, D. & Cox, M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Novacana, s.d. [Online]
Available at: <http://www.novacana.com/etanol>
[Acedido em Outubro 2013].
- NP-1005, 1974. *Cereais e Legumes*. Portugal: Centro de Normalização.
- OECD-FAO, 2010-2019. *OECD-FAO Agricultural Outlook*, s.l.: s.n.
- Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G. & Saddler, J. Z. G., 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, 42(5), p. 834–839.
- Pakarinen, A., 2012. *Evaluation of fresh and preserved herbaceous field crops for biogas and ethanol production*, Department of Agricultural Sciences University of Helsinki Finland: Dissertation.
- Reis, V., 2012. *Modificações genéticas em linhagem industrial de saccharomyces cerevisiae para a fermentação de xilose*, Universidade de Brasília, Brasília: Tese de Doutorado.
- Santos, F. et al., 2012. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, 35(5), pp. 1004-1010.
- Sarkar, N., Ghosh, S., Bannerjee, S. & Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), pp. 19-27.

Seader, J. D. H. E. J. R. D., 1998. *Separation Process Principles: Chemical and Biochemical Operations*. 3ª ed. ed. USA: John Wiley & Sons, Inc..

Shahsavarani, H. et al., 2013. Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1), pp. 20-23.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R., 2006. *Fundamentos de Química Analítica, tradução da 8ª edição*. Norte Americana: EDITORA THOMSON.

Skoog, D., West, D., Holler, F. & Crouch, S., 2006. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª edição ed. Norte Americana: Thomson.

Stansfield, W., Colomé, J., Cano, R. & Correia, C., 1998. *Biologia Molecular e Celular*. Lisboa: McGraw-Hill de Portugal.

Unicer, 2010. *Relatório de sustentabilidade*, s.l.: s.n.

Unicer, 2012. *Relatorio de Sustentabilidade*, s.l.: s.n.

Veira, S., 2009. *Produção de bioetanol a partir de um resíduo orgânico proveniente da central de compostagem da LIPOR*, ISEP, Porto: Dissertação de Mestrado.

White, J. S. & Walker, B. K. Y. & G. M., 2008.. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol.

Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P. & Christakopoulos, P., 2008. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*, Volume 99, p. 5427–5435.

Anexo A. Caracterização da Drêche Cervejeira

Os procedimentos e as normas utilizados para a caracterização da drêche cervejeira encontram-se descritos neste capítulo.

Teor de humidade

Nas Tabelas A.1 e A.2 encontram-se os dados obtidos para o cálculo do teor de humidade e do teor dos sólidos na drêche cervejeira. O procedimento (descrito no Standard Methods) consiste na secagem de uma amostra em estufa (Binder) à temperatura de 105 ± 5 °C até peso constante e avaliação do peso da amostra antes e após a secagem.

Tabela A.1 - Determinação de teor de humidade e teor de sólidos na amostra normal

Ensaio	m _{vidroVazio(g)}	m _{drêcheH+vidro rel.(g)}	m _{drêchesecca+vidro rel.(g)}	m _{drêche H(g)}	m _{drêche seca(g)}	% H	%m _{sólidos}
1	24,7	32,2	26,8	7,5	2,1	72	28
2	39	56,4	43,7	17,4	4,7	73	27
3	38,9	60,9	44,9	22	6	72,7	27,3
Média						72,6 ± 0,51	27,4 ± 0,51

Tabela A.2 - Determinação de teor de humidade e teor de sólidos na amostra congelada

Ensaio	m _{vidro Vazio(g)}	m _{drêcheH+vidro rel.(g)}	m _{drêchesecca+vidro rel.(g)}	m _{drêche hum(g)}	m _{drêche seca(g)}	% H	%m _{sólidos}
1	24,9	32,2	25,6	2,5	0,7	71,5	28,5
2	25	56,4	25,7	2,5	0,7	72,3	27,7
3	24,7	60,9	25,6	3,3	0,9	72,2	27,8
Média						72,0 ± 0,42	28,0 ± 0,42

Teor de Cinzas

Os valores da Tabela A.3 foram obtidos para a determinação do teor das cinzas na amostra de drêche cervejeira. Os procedimentos usados encontram-se descritos no *Standard Methods*, tendo sido usada uma Mufla (Nabertherm).

Tabela A.3 - Determinação de teor de cinzas.

Ensaio	m _{drêche seca (g)}	m _{cadinho (g)}	m _{cinzas+cadinho (g)}	m _{cinzas (g)}	Teor cinzas (%)
1	2,6866	28,1021	28,2012	0,0991	3,7
2	2,9856	27,4034	27,5306	0,1272	4,3
3	2,9013	32,5572	32,7056	0,1484	5,1
Média					4,4 ± 0,7

Granulometria

Na Tabela A.4 encontram-se os valores obtidos para a determinação da percentagem de massa retida em cada peneiro.

Tabela A.4 – Determinação da distribuição granulométrica

Granulometria (µm)	m pesada (g)	(%)
>1190	63,6	43,1
]1190;710[40,3	27,3
]710;600[11,4	7,7
]600;500[9,2	6,2
]500;420[5,7	3,9
]420;297[8,8	6
]297;149[7,2	4,9
<149	1,4	0,9
m_{Total final} (g)	147,6	
m_{Total inicial} (g)	150	

Poder Calorífico

Na Tabela A.5 encontram-se os valores obtidos na determinação de poder calorífico da matéria-prima em estudo. Para a determinação do poder calorífico superior foi utilizada a seguinte expressão:

$$\begin{aligned}
 PC_{S_{Total}} \times m_{Total} &= PC_{S_{Ácido}} \times m_{Ácido} + PC_{S_{Amostra}} \times m_{Amostra} \\
 PC_{S_{Amostra}} &= \frac{PC_{S_{Total}} \times m_{Total} - PC_{S_{Ácido}} \times m_{Ácido}}{m_{Amostra}} \quad (A.1)
 \end{aligned}$$

Tabela A.5 – Determinação do poder calorífico da drêche cervejeira (em base seca)

Ensaio	m amostra (g)	m ácido (g)	PCs _{ácido} (Kcal/kg)	PCs _{total} (kcal/kg)	PCs _{amostra} (kcal/kg)	PCs _{amostra} (MJ/kg)
1	0,4479	0,4488	6145,14	5426,46	4706,3	19,7
2	0,4573	0,5539		5516,46	4755	19,9
Média					4730,7	19,8 ± 0,1

Teor de Matéria Gorda

Para a determinação do teor de matéria gorda recorreu-se à norma portuguesa NP-1005: 1974. Na Tabela A.6 encontram-se os valores obtidos experimentalmente.

Tabela A.6 – Determinação do teor de matéria gorda

Ensaio	m balão+óleo (g)	m balão (g)	m óleo (g)	m drêche seca (g)	Teor Lípidos (%)
1	288,2	287,7	0,5	9,5512	5,23
2	292,4	291,9	0,5	9,9612	5,02
3	292,5	291,9	0,6	9,9965	6
Média					5,42 ± 0,5

Teor de Celulose Bruta

De acordo com a norma portuguesa NP-1005 de 1974, foi determinado o teor da celulose, os valores obtidos então representados na Tabela A.7. A equação A.2 é a expressão matemática usada no cálculo do teor de celulose (% cel).

$$\% cel = \frac{(m_1 - m_2) \times [100 - (H + MG)]}{2} \quad (A.2)$$

Tabela A.7 – Determinação de teor de celulose

Ensaio	m ₁ (g)	m ₂ (g)	H %	MG%	Teor celulose (%)
1	28,7986	28,2783	72,04	5,42	5,86
2	26,1157	25,5362			6,53
3	29,5176	28,9971			5,87
Média					6,09 ± 0,38

Teor de Lenhina

O teor de lenhina solúvel foi determinado pela medida da absorvância a um comprimento de onda de 205 nm, em espectrofotómetro de UV-Vis (Shimadzu UV-160^a). Sendo a lenhina total o somatório entre a lenhina de Klason e a lenhina solúvel. Na tabela A.8 encontram-se os valores obtidos para a determinação do teor da lenhina de Klason. Com a ajuda da expressão A.3 foi determinado o teor de lenhina de Klason.

$$\% Len = \frac{m_{Len.}}{m_{total}} \times 100 \quad (A.3)$$

Tabela A.8 – determinação do teor da lenhina de Klason

Ensaio	m drêche (g)	m gobelé (g)	m lenhina + gobelé (g)	m lenhina (g)	Lenhina Klason (%)
1	1,0007	37,092	37,3298	0,2378	23,76
2	1,0057	37,4592	37,7064	0,2472	24,58
3	1,003	39,3335	39,5817	0,2482	24,75
Média					24,36 ± 0,5

Na tabela A.9 estão os valores representativos da lenhina solúvel. Com a ajuda de um espectrofotômetro UV-Vis foi determinado o valor de absorvância, depois calculado o teor de lenhina solúvel. A equação A.4 serviu de base para determinar a lenhina solúvel.

$$\% \text{ Len. Sol} = \frac{A \times V_{\text{filtrado}} \times f}{\epsilon \times m_{\text{drêchesecca}}} \times 100 \quad (\text{A.4})$$

Tabela A.9 – determinação do teor da lenhina solúvel.

Absorvância	V filtrado (L)	f	ε (L/g.cm)	Lenhina Solúvel (%)	Lenhina Total (%)
0,825	0,54	25	110	10,12	33,88
0,754	0,568			9,68	34,26
0,9	0,57			11,62	36,37
Média				10,47 ± 1,02	34,84 ± 1,3

Teor de Carbono Orgânico Total

O teor do Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado de acordo com o procedimento do aparelho Analisador TOC-VSN (Shimadzu) com o módulo de análise de sólidos (Shimadzu, Solidsample Module), existente no Laboratório de Tecnologia, do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior da Engenharia do Porto (ISEP). Na tabela encontram-se os valores da curva de calibração.

Tabela A. 10. Valores auxiliares determinados para traçar a curva de calibração

Área	µg C
308,9	5520
559,5	9960
770,7	13520
1079	18720
1420	24040

A Figura A.1 representa a reta da calibração obtida para a determinação do teor de carbono orgânico total.

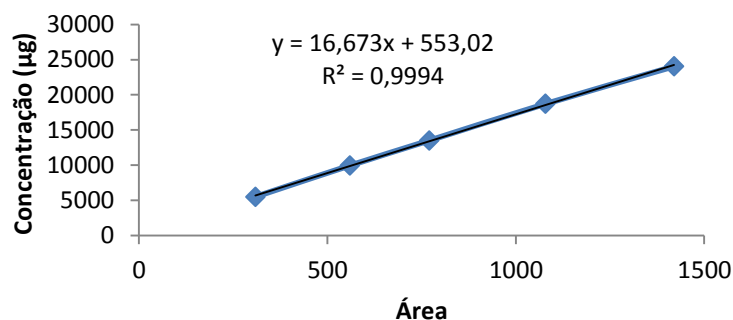


Figura A 1. Reta de calibração

A tabela A.11 – Valores obtidos no cálculo do teor de Carbono Orgânico Total.

Ensaio	m amostra (mg)	Área	mg C	Carbono Total (%)
1	10,2	563,3	9,9	97,5
2	11,7	656,3	11,5	98,3
Média				97,9 ± 0,5

Teor de Hemiceluloses

Tabela A 12 – Determinação do teor de hemiceluloses.

Ensaio	m amostra (g)	m cadinho (g)	m hemi+cadinho(g)	Teor hemiceluloses (%)
1	1,0034	23,5092	23,905	39,45
2	1,0653	27,4006	27,8259	39,92
3	1,0019	18,3767	18,7739	39,64
Média				39,7 ± 0,2

Anexo B: Curvas de Calibração para os Açúcares Simples, Quantificados por HPLC, Usadas para Avaliação da Eficiência do Processo de Produção de Bioetanol

Para avaliar a eficiência do processo de produção de bioetanol a partir da drêche cervejeira, houve a necessidade de efetuar a calibração da resposta do equipamento (HPLC) aos vários açúcares presentes na amostra de licor, recorrendo à solução padrão dos açúcares com concentrações conhecidas. A tabela B1 apresenta os valores auxiliares obtidos para determinação da curva de calibração de arabinose, xilose e ribose.

Tabela B 1 – Valores auxiliares usados para determinar a curva de calibração de arabinose, ribose e xilose.

Concentração (g/L)			Tempos de retenção (min)			A _{pico} (min.g/L)		
Ribose	Xilose	Arabinose	Ribose	Xilose	Arabinose	Ribose	Xilose	Arabinose
14,898	3,062	8,802	14,415	18,017	21,052	12959459	7972612	15797230
10,23	1,914	5,501	14,415	17,958	21,007	8034521	3238803	5938679
6,975	1,531	4,401	14,447	17,873	21,13	5058703	1639014	3053290
4,65	1,392	4,001	14,487	17,862	20,938	2223080	1095737	1660401
3,487	-----	-----	14,422	-----	-----	1282927	-----	-----
2,79	-----	-----	14,422	-----	-----	731560	-----	-----

A figura B1 representa a relação entre a área dos picos dos açúcares padrão e as respectivas concentrações para a arabinose, xilose e ribose.

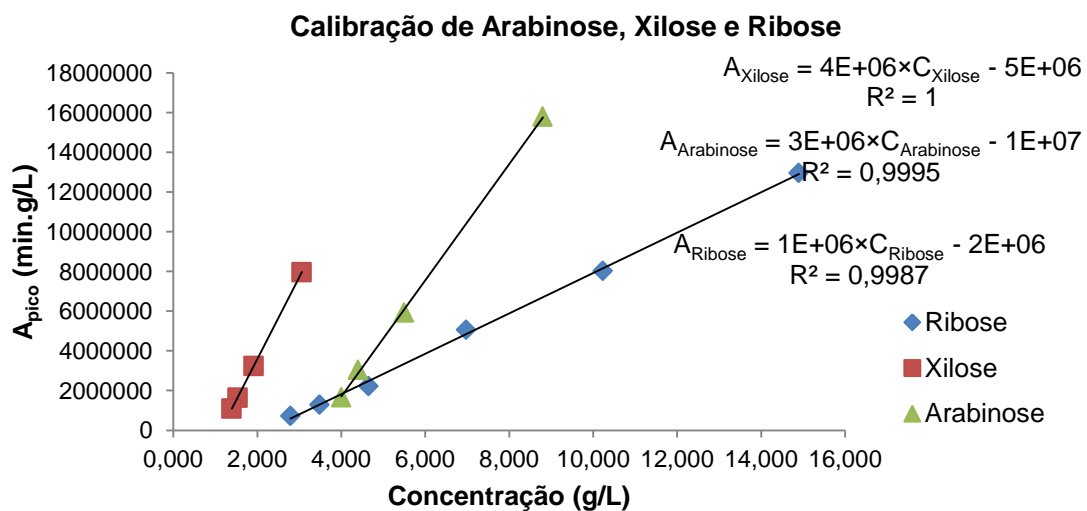


Figura B1 – Curva de calibração para a arabinose, ribose e xilose

Tabela B 2 – Valores auxiliares usados para determinar a curva de calibração de glucose e maltose.

Concentração (g/L)		Tempo de retenção (min)		A _{pico} (min.g/L)	
Maltose	Glucose	Maltose	Glucose	Maltose	Glucose
6,999	2,118	25,903	31,265	26316668	16032230
5,052	1,324	27,912	31,267	18063541	6711998
2,625	1,059	27,298	31,222	9854324	3441286
1,75	0,963	26,43	30,908	4466060	2528875
1,05	-----	27,075	-----	3265742	-----

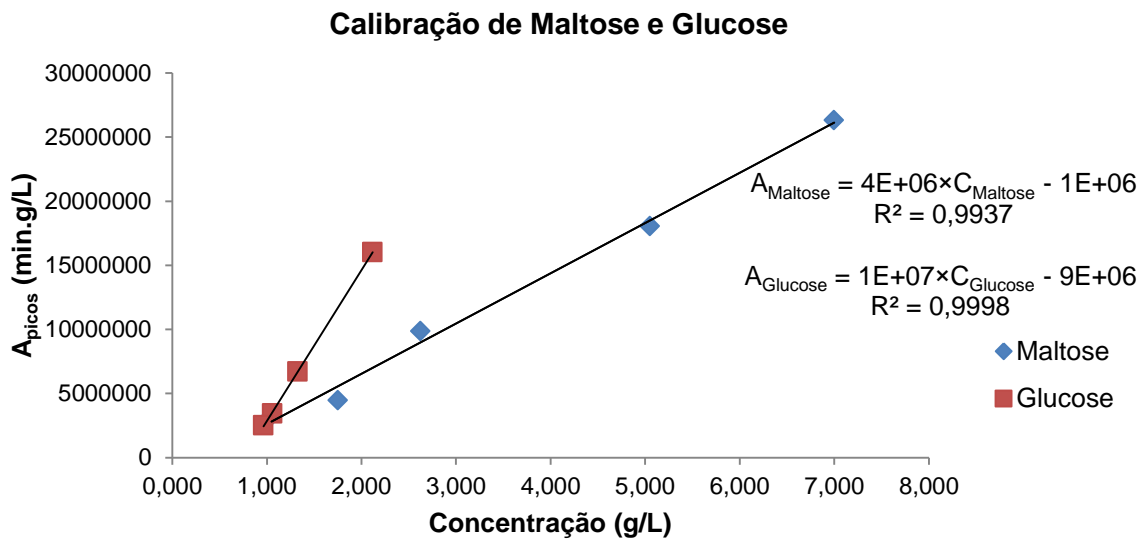


Figura B2 – Curva de calibração para a maltose e glucose

Anexo B I: Avaliação da Eficiência do Processo de Produção de Bioetanol

A eficiência do processo de fermentação usando as leveduras *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*, encontra-se nas Tabelas BI.1 a BI.14 A inoculação foi efectuada com um volume de cerca de 10% (v/v) de inóculo preparado conforme referido na seção 3.

Tabela BI 1 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura *Pichia stipitis*.

Tempo de Fermentação (h)	m _{Ribose} (g)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	12,886	15,806	9,688	8,293	12,456	59,129	85,59	0,000
5	6,214	12,384	5,146	7,031	7,902	38,677		10,459
10	3,579	6,681	4,583	4,896	3,948	23,686		18,126
24	2,883	5,232	4,318	2,168	2,715	17,316		21,384
29	2,426	3,749	4,144	1,728	1,656	13,704		23,231
34	2,104	3,282	4,071	1,472	1,167	12,095		24,054
48	1,793	2,139	3,918	1,373	0,911	10,134		25,057
58	1,740	1,372	3,862	1,340	0,955	9,275		25,497
72	1,676	1,340	3,235	1,331	0,936	8,518		25,884

Tabela BI 2 – Réplica do Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura *Pichia stipitis*.

Tempo de Fermentação (h)	m _{Ribose} (g)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	12,886	15,806	9,688	8,293	12,456	59,129	81,63	0,000
15	5,725	8,890	7,385	2,105	3,693	27,799		16,023
21	4,954	4,646	6,824	1,718	3,064	21,205		19,395
26	4,786	4,384	6,471	1,546	2,957	20,143		19,938
38	3,797	2,841	5,349	1,491	2,536	16,015		22,050
47.3	3,473	2,356	4,908	1,425	1,808	13,968		23,096
55.3	3,334	1,482	4,725	1,362	1,535	12,437		23,873
72	2,959	1,357	4,651	1,328	0,566	10,861		24,685

Tabela BI 3 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Tempo de Fermentação (h)	m _{Ribose} (g)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	12,886	15,806	9,688	8,293	12,4563	59,129	83,64	0,000
5	10,043	10,420	7,344	7,661	9,9400	45,408		7,893
10	7,762	6,715	6,584	4,371	5,0087	30,441		14,254
24	4,524	3,824	6,609	1,576	1,8152	18,348		18,996
29	4,143	2,873	5,870	1,453	1,0961	15,435		20,801
34	2,953	1,486	5,055	1,354	0,9643	11,812		23,020
48	2,544	1,386	5,344	1,351	0,9320	11,556		23,001
58	2,4332	1,3558	5,001	1,331	0,9312	11,0517		23,425
72	2,3325	1,3527	4,662	1,329	0,9301	9,6753		23,825

Tabela BI 4 – Réplica do consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em meio sintético pela levedura *Kluyveromyces marxianus*.

Tempo de Fermentação (h)	m _{Ribose} (g)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{etanol} (g)
0	12,8855	15,806	9,688	8,293	12,456	59,129	83,85	0
15	6,9440	9,134	4,170	2,218	1,287	23,754		16,784
21	5,6775	7,340	3,843	2,099	1,248	20,207		18,624
26	4,0337	6,060	3,753	1,503	1,031	16,378		20,663
38	3,8035	3,356	3,378	1,454	0,999	12,990		22,615
44	3,1689	2,288	2,917	1,383	0,934	10,691		23,804
47.3	2,9033	2,136	2,828	1,361	0,933	10,162		24,120
72	2,6064	1,939	2,736	1,336	0,932	9,551		25,832

Exemplo de cálculo para determinação da eficiência total de fermentação.

$$\eta = \frac{m_{total\ inicial} - m_{total\ final}}{m_{total\ inicial}} \times 100 = \frac{59,129 - 8,518}{59,129} \times 100 = 85,6\%$$

Tabela BI 5 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de *Pichia stipitis*.

Tempo de fermentação (h)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	4,9078	3,1044	3,7309	1,0070	12,7501	51,34	0,0000
6	4,7469	2,9695	3,1117	0,9742	11,8023		0,4847
22	3,5363	2,7211	2,6466	0,8645	9,7685		1,5249
32	2,9212	2,5649	2,2471	0,7652	8,4984		2,1744
48	2,4467	2,3523	2,1556	0,7194	7,6739		2,5961
54	2,1186	2,3385	1,9407	0,6940	7,0918		2,8938
72	1,9248	2,2652	1,3318	0,6820	6,2038		3,3479

Tabela BI 6 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de *Pichia stipitis* (réplica).

Tempo de fermentação (h)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	5,2349	2,9931	3,3745	1,0239	12,6264	50,05	0
16	4,4300	2,8036	2,3497	0,9105	10,4938		1,090658
26	3,9266	2,7375	2,2478	0,8606	9,7726		1,459511
48	3,3820	2,5747	2,1649	0,7311	8,8527		1,929967
64	2,4026	2,3175	1,7156	0,7086	7,1444		2,803632
72	1,9157	2,2309	1,4845	0,6754	6,3065		3,232138

Tabela BI 7 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de *Kluyveromyces marxianus*.

Tempo de fermentação (h)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	5,0540	2,5890	3,6252	0,8875	12,1557	36,93	0,0000
6	4,2981	2,5506	2,8993	0,6995	10,4474		0,8737
22	3,8388	2,4363	2,7077	0,6633	9,6462		1,2834
32	3,7017	2,4181	2,5993	0,6315	9,3504		1,4347
48	3,4415	2,3647	2,5154	0,6191	8,9407		1,6442
54	3,2084	2,3381	2,1835	0,6113	8,3413		1,9508
72	2,7300	2,2763	2,0657	0,5940	7,6660		2,2961

Tabela BI 8 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de *Kluyveromyces marxianus* (réplica).

Tempo de fermentação (h)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	%η	m _{Etanol} (g)
0	4,7759	2,7423	3,0733	0,9275	11,5191	38,88	0,0000
16	4,0433	2,6088	2,7942	0,8505	10,2968		0,5217
26	3,4766	2,5139	2,1606	0,8207	8,9718		0,8906
48	3,2209	2,4228	2,1050	0,6266	8,3753		1,2665
64	2,7674	2,3230	1,9638	0,5968	7,6509		1,5800
72	2,2652	2,2467	1,9492	0,5800	7,0410		1,8930

Tabela BI 9 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de *Pichia stipitis* (réplica II).

Tempo de fermentação (h)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	4,7242	3,0800	3,2136	0,7783	11,7960	39,47	0,0000
4	4,5443	2,7798	3,1005	0,7568	11,1814		0,3143
16	4,3110	2,7059	2,9943	0,7430	10,7542		0,5328
24	3,8143	2,5391	2,7740	0,7377	9,8650		0,9876
40	2,8099	2,2864	2,3662	0,6925	8,1550		1,8621
64	2,4318	2,2268	2,3110	0,6271	7,5967		2,1476
72	2,2106	2,1777	2,1363	0,6157	7,1403		2,3811

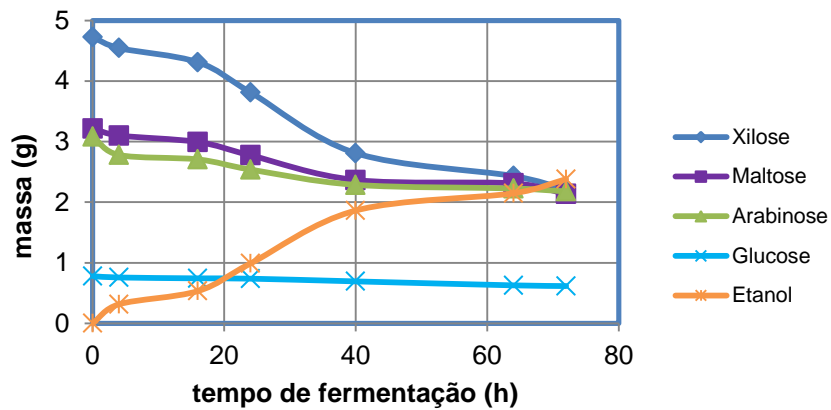


Figura BI 1 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por *Pichia stipitis* (réplica II).

Tabela BI 10 – Consumo dos açúcares e a quantidade de etanol produzido em hidrolisado da drêche pela levedura de *Kluyveromyces marxianus* (réplica II).

Tempo de fermentação (h)	m _{Xilose} (g)	m _{Arbinose} (g)	m _{Maltose} (g)	m _{Glucose} (g)	m _{Total} (g)	% η	m _{Etanol} (g)
0	3,9429	2,9341	3,8386	0,7158	11,4315	34,71	0,0000
4	3,8452	2,8967	3,7351	0,7160	11,1930		0,1219
16	3,8088	2,8909	3,3368	0,6944	10,7309		0,3583
24	3,6054	2,6389	2,8510	0,6898	9,7852		0,8419
40	3,1403	2,5888	2,3970	0,6680	8,7940		1,3489
64	2,6223	2,5434	2,2650	0,6448	8,0755		1,7163
72	2,3337	2,4675	2,1199	0,6319	7,5529		1,9836

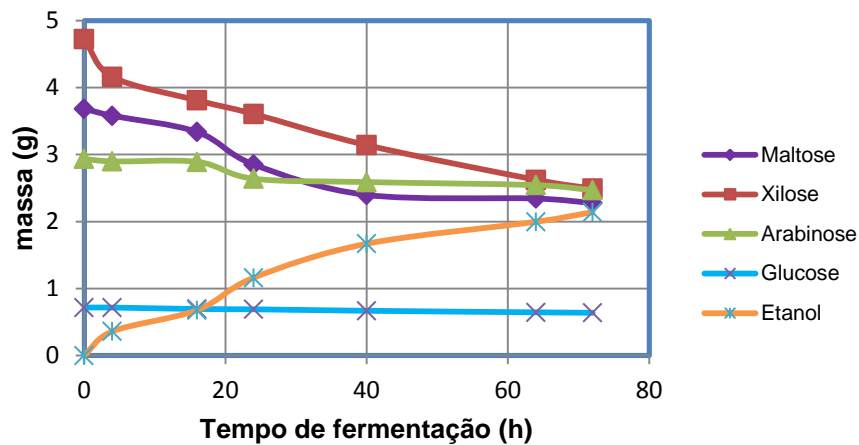


Figura BI 2 – Consumo dos açúcares em hidrolisado da drêche cervejeira fermentado por *Kluyveromyces marxianus* (réplica II).

Exemplo de cálculo para determinação da eficiência de fermentação de cada um dos açúcares.

$$\eta = \frac{m_{\text{composto inicial}} - m_{\text{composto final}}}{m_{\text{composto inicial}}} \times 100 = \frac{15,806 - 1,340}{15,806} \times 100 = 91,5\%$$

Exemplo de cálculo para determinação da massa do etanol teórico.

Pela estequiometria da reação 2.3 e 2.4 pode-se observar que por cada mole de glucose se forma 2 moles de etanol e por cada 3 moles de pentoses forma-se 5 moles de etanol.

Exemplo de cálculo de massa teórica do etanol para xilose

$$m_{\text{consumida}} = m_{\text{composto inicial}} - m_{\text{composto final}} = 15,806 - 1,340 = 14,466 \text{ g xilose}$$

$$n_{\text{consumido}} = \frac{m_{\text{consumida}}}{Mr} = \frac{14,466}{150} = 0,090 \text{ moles de xilose}$$

$$n_{\text{etanol}} = \frac{5}{3} \times n_{\text{xilose}} = \frac{5}{3} \times 0,090 = 0,15 \text{ moles}$$

$$m_{\text{etanol}} = n_{\text{etanol}} M_{\text{etanol}} = 0,15 \times 46,068 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 6,9102 \text{ g}$$

Exemplo de cálculo de massa teórica do etanol para glucose

$$m_{\text{consumida}} = m_{\text{compostoinicial}} - m_{\text{composto final}} = 12,456 - 0,936 = 11,52 \text{ g glucose}$$

$$n_{\text{consumido}} = \frac{m_{\text{consumida}}}{Mr} = \frac{11,52}{180} = 0,064 \text{ moles de glucose}$$

$$n_{\text{etanol}} = 2 \times n_{\text{xilose}} = 2 \times 0,064 = 0,128 \text{ moles}$$

$$m_{\text{etanol}} = n_{\text{etanol}} M_{\text{etanol}} = 0,128 \times 46,068 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 5,8868 \text{ g}$$

Determinação do volume, da massa e do rendimento de álcool em 12,3 g de açúcar totais/100 g da drêche seca. Massa volúmica do etanol é de 789 g/L.

- *Pichia stipitis* é de 0,22% (v/v).

$$V_{\text{álcool}} = \frac{0,22 \text{ mL}}{100 \text{ mL}_{\text{solução}}} \times 600 \text{ mL} = 1,32 \text{ mL}$$

$$m_{\text{álcool}} = V_{\text{álcool}} \times \rho_{\text{álcool}} = 1,32 \times 10^{-3} \text{ L} \times 789 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 1,054 \text{ g}$$

$$\text{rendimento} = \frac{m_{\text{álcool}}}{m_{\text{total de açúcar}}} = \frac{1,054 \text{ g}}{12,3 \text{ g}} = 0,0856 \frac{\text{g de álcool}}{\text{g de açúcartotais}}$$

- *Kluyveromyces marxianus* (0,08% (v/v))

$$V_{\text{álcool}} = \frac{0,08 \text{ mL}}{100 \text{ mL}_{\text{solução}}} \times 600 \text{ mL} = 0,48 \text{ mL}$$

$$m_{\text{álcool}} = V_{\text{álcool}} \times \rho_{\text{álcool}} = 0,48 \times 10^{-3} \text{ L} \times 789 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,378 \text{ g}$$

$$\text{rendimento} = \frac{m_{\text{álcool}}}{m_{\text{total de açúcar}}} = \frac{0,378\text{g}}{12,3\text{g}} = 0,0308 \frac{\text{g de álcool}}{\text{g de açúcartotais}}$$

 Tabela BI 11 – Eficiência de fermentação em hidrolisado da drêche pela levedura de *Pichia stipitis*.

Ensaio	% η_{Xilose}	% $\eta_{\text{Arabinose}}$	% η_{Maltose}	% η_{Glucose}	% η_{Total}
AI	60,78	27,03	64,30	32,27	51,34
AII	63,40	25,47	56,01	34,04	50,05
AIII	53,21	29,29	33,52	20,89	39,47
Média	59,13	27,26	51,28	29,07	46,95
σ	5,30	1,93	15,93	7,14	6,52
Resultado	58,0 \pm 12,35	22,8 \pm 6,02	55 \pm 9,80	26,0 \pm 12,41	45,1 \pm 9,70

 Tabela BI 12 – Eficiência de fermentação em hidrolisado da drêche pela levedura de *Kluyveromyces marxianus*.

Ensaio	% η_{Xilose}	% $\eta_{\text{Arabinose}}$	% η_{Maltose}	% η_{Glucose}	% η_{Total}
BI	45,98	12,08	43,02	33,07	36,93
BII	52,57	18,07	36,58	37,47	38,88
BIII	40,81	15,90	44,77	11,72	33,93
Média	46,46	15,35	41,46	27,42	36,58
σ	5,89	3,04	4,32	13,77	2,49
Resultado	46,46 \pm 5,98	15,35 \pm 3,04	41,46 \pm 4,32	27,42 \pm 13,77	36,58 \pm 2,49

 Tabela BI 13 – Eficiência de fermentação em amostra sintético pela levedura de *Pichia stipitis*.

Ensaio	% η_{Ribose}	% η_{Xilose}	% $\eta_{\text{Arabinose}}$	% η_{Maltose}	% η_{Glucose}	% η_{Total}
AI	86,99	91,52	66,61	83,95	92,49	85,59
AII	77,034	91,42	51,99	83,98	95,46	81,63
Média	82,01	91,47	59,30	83,97	93,97	83,61
σ	7,04	0,07	10,33	0,02	2,10	2,80
Resultado	82,01 \pm 7,04	91,47 \pm 0,07	59,30 \pm 10,33	83,97 \pm 0,02	93,97 \pm 2,10	83,61 \pm 2,80

 Tabela BI 14 – Eficiência de fermentação em sintético pela levedura de *Kluyveromyces marxianus*.

Ensaio	% η_{Ribose}	% η_{Xilose}	% $\eta_{\text{Arabinose}}$	% η_{Maltose}	% η_{Glucose}	% η_{Total}
BI	81,90	91,44	51,88	83,98	92,53	83,64
BII	79,77	87,73	71,76	83,89	92,51	83,85
Média	80,84	89,59	61,82	83,93	92,52	83,74
σ	1,50	2,62	14,05	0,07	0,01	0,15
Resultado	80,84 \pm 1,50	89,59 \pm 2,62	61,82 \pm 14,05	83,93 \pm 0,07	92,52 \pm 0,01	83,74 \pm 0,15