



**JULIANA RIBEIRO DO CARMO**

**PRODUÇÃO DE ETANOL E PECTINASE POR  
*Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 UTILIZANDO  
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

**LAVRAS - MG**

**2013**

**JULIANA RIBEIRO DO CARMO**

**PRODUÇÃO DE ETANOL E PECTINASE POR *Kluyveromyces marxianus*  
CCT 4086 UTILIZANDO RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

Coorientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

**LAVRAS-MG**

**2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Carmo, Juliana Ribeiro do.

Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus*  
CCT 4086 utilizando resíduos do processamento de café (*Coffea*  
*arabica* L.) / Juliana Ribeiro do Carmo. – Lavras : UFLA, 2013.  
253 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Bibliografia.

1. Polpa de café. 2. Pré-tratamento alcalino. 3. Leveduras. 4.  
Fermentação. 5. Biomassa lignocelulósica. 6. Hidrólise enzimática.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.28449

**JULIANA RIBEIRO DO CARMO**

**PRODUÇÃO DE ETANOL E PECTINASE POR *Kluyveromyces marxianus*  
CCT 4086 UTILIZANDO RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.

Dra. Deila Magna dos Santos Botelho UFLA

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dra. Sára Maria Chalfoun EPAMIG

Dr. Walclee de Carvalho UFLA

Dr. Carlos José Pimenta  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2013**

### **DEDICO**

A quem foi para mim o exemplo de ser humano, a minha melhor escola,  
quem me ensina cotidianamente valores inestimáveis.

A quem fez dos meus sonhos seus objetivos e lutas, dividiu comigo todas as  
minhas alegrias e também as tristezas.

A quem é o maior amor da minha vida,

De quem eu tenho orgulho diariamente ao chamar de meu Pai, Nildo Rodrigues  
do Carmo.

### **OFEREÇO**

A minha mãe, Janice Aparecida Ribeiro do Carmo,  
quem mais se orgulha das minhas conquistas acadêmicas.

A minha irmã, Fernanda Ribeiro do Carmo Damasceno,  
por compartilhar comigo todas as fases da minha vida.

Aos meus sobrinhos, Matheus, Giovana, Ana Luiza e Amanda,  
pelo carinho sincero de sempre.

“Quando os meus sonhos vi desmoronar  
Me trouxeste outros pra recomeçar  
Quando me esqueci que era alguém na vida  
Teu amor veio me lembrar  
Que Deus me ama  
Que não estou só  
Que Deus cuida de mim  
Quando fala pela tua voz  
E me diz: coragem!”  
(Pe. Fábio de Melo)

## AGRADECIMENTOS

Eu não poderia deixar de agradecer a todos que possibilitaram a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos...

A Deus, por todas as bênçãos concedidas, por ter sido meu par constante em cada caminhada.

Aos meus pais, Nildo Rodrigues do Carmo e Janice Aparecida Ribeiro do Carmo, por tornarem possíveis os meus sonhos, pela minha formação acadêmica, pelo amor, carinho e por servirem de exemplo de vida. AMO VOCÊS!

Aos meus sobrinhos, os quais amo infinitamente e que não aguentam mais a ver a tia estudar tanto... Espero que vocês também estudem muito!

Ao meu namorado, Márcio Gonçalves Murad, pela grande ajuda desde o experimento até a elaboração da versão final da tese. Muito obrigada pelo amor, carinho, compreensão e dedicação durante esse tempo. Você foi fundamental para que este trabalho fosse realizado com tanta paz e serenidade. Com você os caminhos foram bem menos dolorosos. TE AMO!

Ao meu orientador, Carlos José Pimenta, por ser, além de excelente pesquisador, um ótimo orientador; por ter me tratado como profissional desde o mestrado, por ter me dado a oportunidade de crescer e por ser tão acessível. MUITO OBRIGADA!

Ao amigo Evandro Galvão Tavares Menezes, por ter me ensinado tanto a cada etapa do experimento, por me ajudar com as análises estatísticas e por tornar os dias de trabalho tão engraçados; pelo sadio convívio e pela amizade consolidada, MIL VEZES OBRIGADA, DUDU!

Às alunas de iniciação científica Grazy, Aninha, Juliana, Mary e Vanessinha, por cuidarem tão bem do experimento e pela imensa ajuda! Que este trabalho nos traga bons frutos!

Ao professor José Guilherme Lembi Ferreira Alves, por abrir as portas do laboratório, oferecendo toda a infraestrutura necessária a realização deste trabalho e também as portas de sua sala, sanando as minhas dúvidas. Por aceitar prontamente o convite para participação como membro da banca, serei eternamente grata!

A Sára Maria Chalfoun, por acolher o meu projeto ao disponibilizar os laboratórios sob sua coordenação para a realização dos experimentos, por ser parceira das nossas pesquisas e por contribuir tanto quando participa das bancas. Obrigada por dispor do seu tempo e contribuir com este trabalho.

Ao Marcelo Ribeiro Malta, ao professor Walclee de Carvalho Melo, a Deila Magna dos Santos Botelho e a Heloísa Helena de Siqueira Elias, por aceitarem prontamente o convite para participar da banca. Tenho certeza de que este trabalho será bastante enriquecido com os conhecimentos de vocês.

Aos funcionários do DCA: Tina, Creuza, Flávia e Sr. Miguel (*in memoriam*), pela valiosa convivência, pelo incentivo e pelas risadas.

Ao Renato Silva Leal, que tanto me ajudou em todas as etapas deste e de outros trabalhos, por trabalhar tanto e não se deixar abalar com coisas tão pequenas frente ao seu potencial de pesquisador. Muito obrigada, MANO!

A amiga Danielly Mesquita Figueiredo que, mesmo distante, contribui para que eu concretize os meus sonhos, me incentivando sempre.

Ao André Labegalini, pela grande ajuda nas análises cromatográficas.

Ao CNPq e à CAPES, pela concessão da bolsa e à Embrapa-Café, pelo financiamento do projeto.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, que se traduz no meu sonho mais sonhado!

Sou imensamente grata a vocês... e jamais cansarei de dizer: **OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

O café é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, de importância mundialmente reconhecida. A obtenção de uma bebida de qualidade requer um adequado processamento pós-colheita, que pode ser realizado por via seca ou via úmida, em que são gerados os resíduos casca e polpa de café, respectivamente. Direcionar os resíduos do café aplicando-os em processos biotecnológicos pode ser uma alternativa viável, ecológica e economicamente. Partindo desse pressuposto, este trabalho foi realizado com o objetivo verificar a viabilidade científica do uso da polpa de café, gerada durante o processamento por via úmida, na produção de etanol, utilizando-se a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 como agente fermentativo. Nos passos iniciais, a polpa de café foi caracterizada e estudaram-se formas de obtenção de uma fase líquida a partir dessa matéria-prima. A sua composição, rica em carboidratos, classificou esse resíduo como potencial substrato para a obtenção de etanol. Dentre as diferentes formas de extração, a mais eficiente (menor consumo de energia, baixas concentrações de polifenóis e satisfatórios teores de açúcares) foi a trituração a frio, seguida de prensagem. A fase líquida da polpa de café originada foi fermentada por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 como única fonte de carboidrato ou como diluente de caldo ou de melação de cana-de-açúcar. Os resultados evidenciaram que a fase líquida da polpa de café não influenciou a obtenção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, podendo ser utilizada como diluente em meios de cultura destinados a essa finalidade. Esta fase também foi utilizada na elaboração de meios para a produção de poligalacturonase pela levedura em estudo, obtendo-se elevadas concentrações dessa enzima ( $18 \text{ U.g}^{-1}$ ) quando o teor desse material de 80% (v/v) foi utilizado. Pensando na obtenção de etanol a partir da fração lignocelulósica da polpa de café, estudaram-se diferentes maneiras de pré-tratar alcalinamente a fase sólida (proveniente da trituração e prensagem da polpa de café), com o objetivo de remover a lignina e facilitar a hidrólise da celulose em glicose. Para tanto, utilizou-se um delineamento composto central rotacional, a fim de se otimizar o pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café, assumindo como variáveis independentes: concentração de hidróxido de sódio, concentração de hidróxido de cálcio e tempo de pré-tratamento e, como variáveis respostas, a capacidade de hidrólise do material pré-tratado, medida em termos da concentração de glicose e conversão da celulose em glicose. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento utilizando 4% (m/v) de hidróxido de sódio, sem hidróxido de cálcio e tempo de 25 minutos de pré-tratamento a  $121^\circ\text{C}$  proporcionou os melhores resultados. Também foi estudado o pré-tratamento com NaOH 4% e 28% m/v, em 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente, tendo como variáveis respostas as mesmas analisadas no estudo a



quente. Os resultados apontaram que o uso de NaOH 4% m/v, após 30 dias de armazenamento, apresentou bons resultados, o que viabiliza o processo de pré-tratamento, por não necessitar da etapa de aquecimento. A fase sólida da polpa de café pré-tratada alcalinamente foi submetida à hidrólise e à fermentação por três diferentes tipos de processos: hidrólise e fermentação separadas (SHF), hidrólise e fermentação semissimultâneas (SSSF) e hidrólise e fermentação simultâneas (SSF), sendo a hidrólise realizada pelas enzimas celulase,  $\beta$ -glucosidase e xilanase e a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Os processos que produziram maiores concentrações finais de etanol foram os processos SHF (21,77 g.L<sup>-1</sup>) e SSSF (21,66 g. L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos neste trabalho apontam para uma nova aplicabilidade biotecnológica da polpa de café: a obtenção de etanol utilizando sua fração líquida e sólida, tendo como agente fermentativo a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Palavras-chave: Etanol. *Kluyvermyces marxianus* CCT 4086. Polpa de café. Pré-tratamento alcalino.

## GENERAL ABSTRACT

Coffee is one of Brazil's main agricultural products of globally recognized importance. Obtaining a drink requires adequate quality post-harvest processing which may be performed dry or wet, in which the peel and pulp coffee wastes are generated, respectively. Using the coffee waste by applying it in biotechnological processes can be viable, ecological and economical. Based on this assumption, this study was carried out to verify the scientific feasibility of using coffee pulp generated during wet processing, for the production of ethanol using the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 as fermentation agent. In the initial steps, the pulp coffee was characterized and studied in order to obtain a liquid phase from this feedstock. The composition, rich in carbohydrates, classified this residue as a potential substrate for ethanol production. Among the different forms of extraction, the most efficient (less energy consumption, low concentrations of polyphenols and satisfactory sugars) was trituration followed by cold pressing. The liquid phase originated from coffee pulp was fermented by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 as the sole carbohydrate source or as a molasses or cane sugar broth thinner. The results showed that the liquid phase of the coffee pulp did not affect the production of ethanol by *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, and can be used as a diluent in culture media intended for that purpose. This phase was also used in the preparation of media for the production of polygalacturonase by the yeast under study, resulting in high concentrations of this enzyme ( $18 \text{ U.g}^{-1}$ ) where the content of this material of 80% (v/v) was used. Seeking to obtain ethanol from lignocellulosic fraction of coffee pulp, different ways were studied to pre-treat, alkalinely, the solid phase (from the crushing and pressing of coffee pulp), with the goal of removing lignin and facilitate hydrolysis of cellulose to glucose. For this purpose, we used a central composite rotatable design in order to optimize the alkali pretreatment of the solid phase of the coffee pulp, assuming as independent variables: sodium hydroxide concentration, calcium hydroxide concentration and pretreatment time and as response variables, the ability of hydrolysis of pre-treated material, measured in terms of glucose concentration and conversion of cellulose to glucose. The results demonstrated that the pretreatment using 4% (w/v) sodium hydroxide, without calcium hydroxide and a pretreatment time of 25 min at  $121^\circ \text{C}$  gave the best results. We also studied the pretreatment with 4% NaOH and 28% w / v in 30 days storage at room temperature, using the same response variables analyzed in the hot study. The results showed that the use of NaOH 4% m / v after 30 days of storage showed good results, thus justifying the pretreatment for not requiring the heating step. The solid phase of the coffee pulp pretreated alkalinely was subjected to hydrolysis and fermentation by three different processes: separate hydrolysis and

fermentation (SHF), semi-simultaneous saccharification and fermentation (SSSF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF), the hydrolysis being conducted by cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase enzymes and the *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 yeast. The processes that produce higher final concentrations of ethanol were the processes SHF (21.77 g.L<sup>-1</sup>) and SSSF (21.66 g. L<sup>-1</sup>). The results of this study suggest a new biotechnological applicability for coffee pulp: the production of ethanol using its liquid and solid fraction having the yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 as fermentative agent.

Keywords: Ethanol. *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Coffee pulp. Alkaline pretreatment.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1	Fluxograma das etapas realizadas.....	31
Figura 2	Produção de café referente à safra de 2011: participação percentual por Unidade Federativa.....	33
Figura 3	Componentes do fruto do cafeeiro.....	33
Figura 4	Cadeia linear da celulose.....	42
Figura 5	Precusores primários das ligninas álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III).....	44
Figura 6	Reação de saponificação de ligações ésteres em presença de hidróxido de sódio, para obtenção de um sal carboxílico e um álcool.....	52
Figura 7	Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido...	58
Figura 8	Mecanismo de ação das celulasas na hidrólise de celulose.	62

### Capítulo 2

Figura 1	Cinética do consumo de açúcares redutores totais, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meios contendo caldo de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2).....	110
Figura 2	Cinética do consumo de açúcares redutores totais, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meios contendo melão de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4).....	111
Figura 3	Cinética do consumo de açúcares redutores totais, por	

	<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café.....	112
Figura 4	Variação do pH ao longo do tempo de fermentação em meios contendo (A) caldo de cana diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2) e (B) melaço de cana diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4) por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	114
Figura 5	Variação do pH ao longo do tempo de fermentação por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café.....	115
Figura 6	Variação dos teores dos ácidos orgânicos cítrico e succínico produzidos por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 utilizando-se (A) caldo de cana-de-açúcar diluído com água (F1) ou com fase líquida da polpa de café (F2) e (B) melaço de cana-de-açúcar diluído com água (F3) ou com fase líquida da polpa de café (F4).....	117
Figura 7	Variação dos teores dos ácidos orgânicos produzidos por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 utilizando-se com fase líquida da polpa de café.....	118
Figura 8	Variação da concentração de células totais ao longo do tempo de fermentação em meios contendo caldo de cana diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2) por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	120
Figura 9	Variação da concentração de células totais ao longo do tempo de fermentação em meios contendo melaço de cana diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida	

	da polpa de café (F4) por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	121
Figura 10	Variação da concentração e viabilidade celular ao longo do tempo de fermentação por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café.....	122
Figura 11	Produção de etanol, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> , em meios contendo caldo de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2).....	124
Figura 12	Produção de etanol, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meios contendo melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4).....	126
Figura 13	Produção de etanol, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café.....	127
Figura 14	Curvas de contorno para a atividade específica de poligalacturonase produzida por <i>Kluyveromyces marxianus</i> : (A) concentração de fase líquida da polpa de café versus concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , com a temperatura fixada no ponto central (25 °C); (B) concentração de fase líquida da polpa de café versus temperatura, com a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fixada no ponto central (0,5 g.L-1) e (C) concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versus temperatura, sendo a variável concentração de fase líquida da polpa de café com seu valor fixado no ponto central (80mL/100mL).....	137

### Capítulo 3

- Figura 1 Curvas de contorno para a concentração de glicose obtida após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada: (A) [Na(OH)] versus [Ca(OH)<sub>2</sub>], sendo o tempo fixado no ponto central – 25 minutos, (B) [Na(OH)] versus tempo sendo a [Ca(OH)<sub>2</sub>] fixada no ponto central – 4% m/v, (C) [Ca(OH)<sub>2</sub>] versus tempo sendo a [NaOH] fixada no ponto central – 4% m/v e (D) [NaOH] versus tempo para a eficiência do pré-tratamento da polpa de café considerando 0% de Ca(OH)<sub>2</sub>..... 168
- Figura 2 Curvas de contorno para conversão da celulose em glicose obtida da fase sólida da polpa de café pré-tratada após hidrólise enzimática: (A) [Na(OH)] versus [Ca(OH)<sub>2</sub>], sendo o tempo fixado no ponto central – 25 minutos, (B) [Na(OH)] versus tempo sendo a [Ca(OH)<sub>2</sub>] fixada no ponto central – 4 % m/v e (C) [Ca(OH)<sub>2</sub>] versus tempo sendo a [NaOH] fixada no ponto central – 4% m/v..... 170
- Figura 3 Variação do rendimento em massa observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH nas concentrações de 4% m/v ou 28% m/v ao longo de 30 dias de armazenamento, a temperatura ambiente..... 178
- Figura 4 Variação do teor remanescente de hemicelulose observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH nas concentrações de 4% m/v ou 28 % m/v ao longo de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente..... 180
- Figura 5 Variação do teor remanescente de lignina observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH

	nas concentrações de 4% m/v ou 28% m/v ao longo de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente.....	180
Figura 6	Variação da eficiência observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH (4% m/v ou 28% m/v) ao longo de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente.....	181
Figura 7	Variação da concentração de glicose observada após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH (4% m/v ou 28% m/v) ao longo de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente.....	183
Figura 8	Variação da conversão de celulose observada após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH (4% m/v ou 28% m/v) ao longo de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente.....	184
<b>Capítulo 4</b>		
Figura 1	Contagem de células de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 incubadas em diferentes temperaturas ao longo de 16 horas.....	218
Figura 2	Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e glicose, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> , em meios contendo fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada, sendo a hidrólise e a fermentação realizadas separadamente (SHF).....	222
Figura 3	Produção de etanol, por <i>Kluyveromyces marxianus</i> , durante o processo de fermentação (SHF) da fase líquida da polpa de café pré-tratado e hidrolisado.....	223
Figura 4	Variação da concentração de células e viabilidade celular ao longo do tempo de fermentação da fase sólida da polpa	



	de café pré-tratada e hidrolisada (SHF) por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	224
Figura 5	Variação do pH ao longo do tempo de fermentação da fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada (SHF) por <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	225
Figura 6	Consumo de açúcares redutores (AR) e glicose e produção de etanol durante o processo de sacarificação e fermentação semi-simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada utilizando <i>Kluyveromyces marxianus</i> , com pré-hidrólise de 24 horas.....	226
Figura 7	Variação da concentração e viabilidade celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ao longo do tempo da sacarificação e fermentação semi-simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada, com pré-hidrólise de 24 horas.....	229
Figura 8	Variação do potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do tempo do processo de sacarificação e fermentação semi-simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada, com pré-hidrólise de 24 horas, utilizando-se para a fermentação a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	230
Figura 9	Cinéticas do consumo de açúcares redutores (AR) e glicose e da produção de etanol durante o processo de sacarificação e fermentação simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada utilizando <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	231
Figura 10	Variação da concentração e viabilidade celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ao longo do tempo da	

	sacarificação e fermentação simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada.....	233
Figura 11	Varição do potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do tempo do processo de sacarificação e fermentação simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada utilizando-se para a fermentação a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	234

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1	Composição da polpa de café.....	36
Tabela 2	Resumo das principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos de materiais lignocelulósico.....	55
Tabela 3	Comparação entre os métodos de hidrólise com ácido concentrado ou diluído.....	59
Tabela 4	Comparação entre a hidrólise da celulose com ácido diluído e com enzimas.....	64

### Capítulo 2

Tabela 1	Composição dos meios quanto ao volume da fonte de carboidrato e do diluente necessários a atingir 18 °Brix*.....	95
Tabela 2	Níveis do fatorial fracionado $2^{4+1}$ para seleção de variáveis para a produção de poligalacturonase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	101
Tabela 3	Níveis do planejamento experimental para otimização da produção de poligalacturonase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	102
Tabela 4	Valores médios para as concentrações de amido, pectina total e solúvel, polifenóis, açúcares totais e redutores presentes na polpa e nas suas fases líquidas...	107
Tabela 5	Contagem de células em placa (UFC.mL <sup>-1</sup> ) para o tempo inicial e tempo final de cada fermentação.....	123
Tabela 6	Valores médios para o fator de conversão do substrato em etanol (Yp/s), eficiência fermentativa (Ef),	

	produtividade em etanol (Qp), fator de conversão do substrato em células (Yx/s), dos processos fermentativos.....	128
Tabela 7	Atividade de poligalacturonase (PG) e concentração de proteínas no extrato enzimático bruto referente aos tratamentos do planejamento fatorial fracionado 2 <sup>4+1</sup> ...	131
Tabela 8	Efeito da concentração de pectina, da concentração de inóculo, da concentração de fase líquida da polpa de café e da temperatura, sobre a produção de poligalacturonase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	132
Tabela 9	Matriz do delineamento composto central rotacional e respostas da atividade de poligalacturonase e proteínas.	134
Tabela 10	Resultados dos coeficientes da equação a atividade de poligalacturonase produzida por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	135
Tabela 11	ANOVA para a atividade de poligalacturonase produzida por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086...	136

### Capítulo 3

Tabela 1	Níveis do planejamento experimental para otimização do pré-tratamento alcalino a quente da fase sólida da polpa de café.....	156
Tabela 2	Composição da polpa de café.....	162
Tabela 3	Teores de açúcares redutores totais, glicose e conversão da celulose em glicose da polpa de café pré-tratada segundo planejamento fatorial DCCR, acrescido de dois ensaios (18 e 19).....	164
Tabela 4	Resultados dos coeficientes da equação sobre a concentração de glicose (g.L <sup>-1</sup> ) e conversão da celulose	

	em glicose (%) após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café.....	166
Tabela 5	Modelos preditos e seus respectivos coeficientes de determinação para as variáveis-respostas: concentração de glicose e conversão da celulose em glicose.....	166
Tabela 6	ANOVA para concentração de glicose e conversão da celulose em glicose.....	167
Tabela 7	Médias dos rendimentos em massa, teores de celulose remanescente, teores de hemicelulose remanescente, teores de lignina remanescente e eficiências dos pré-tratamentos realizados com o reuso do resíduo alcalino por cinco ciclos.....	172
Tabela 8	Médias de potencial hidrogeniônico, demanda química de oxigênio, sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis do resíduo líquido do pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café durante 5 ciclos de reuso.....	175
Tabela 9	Valores médios para os teores remanescentes de celulose (RC), hemicelulose (RH) e lignina (RL), rendimento em massa (Rendmassa), concentração de glicose e conversão da celulose em glicose, para cada concentração de NaOH testada (4 ou 28%), durante os 30 dias de armazenamento.....	177
	<b>Capítulo 4</b>	
Tabela 1	Composição da polpa de café.....	196
Tabela 2	Composição dos meios de cultura YM e YMA.....	203
Tabela 3	Características da fase sólida da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio ou com água destilada.	214

Tabela 4	Teores de açúcares redutores, glicose e porcentagem de conversão da celulose em glicose após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% ou água destilada.....	216
Tabela 5	Contagem de células em placa (UFC/mL) para o tempo inicial e tempo final de cada fermentação.....	220
Tabela 6	Valores médios e desvios-padrão para a concentração final de etanol, produtividade volumétrica de etanol (Qp), fator de conversão da celulose em etanol (YE/C), fator de conversão da glicose em etanol (YE/G), e eficiência fermentativa (Ef) dos diferentes processos de sacarificação e fermentação da fase sólida da polpa de café pré-tratada.....	235

## LISTA DE SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional de Gás, Petróleo e Biocombustíveis
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry
AR	Açúcares redutores
ART	Açúcares redutores totais
BOD	Biochemistry oxygen demand
C(%)	Porcentagem de celulose
CCT	Coleção de Cultura Tropical
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DQO	Demanda química de oxigênio
E1	Extração controle à temperatura ambiente
E2	Extração mecânica à temperatura ambiente
E3	Extração termomecânica a 60 °C
E4	Extração termomecânica a 121 °C
Ef	Eficiência fermentativa
F cal	F calculado
F1	Meio fermentativo 1
F2	Meio fermentativo 2
F3	Meio fermentativo 3
F4	Meio fermentativo 4
F5	Meio fermentativo 5
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
GL	Graus de liberdade
HC (%)	Porcentagem de hemicelulose
NREL	National Renewable Energy Laboratory
p	Probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
QM	Quadrado médio
Qp	Produtividade em etanol
RC	Teor remanescente de celulose
Rend <sub>massa</sub>	Rendimento em massa
RH	Teor remanescente de hemicelulose
RL	Teor remanescente de lignina
SHF	Hidrólise e fermentação separadas
SQ	Soma de quadrados
SSF	Hidrólise e fermentação simultâneas
SSSF	Hidrólise e fermentação semissimultâneas

$Y_{E/C}$	Conversão de celulose em etanol
$Y_{E/G}$	Conversão de glicose em etanol
YM	Meio de cultura (extrato de levedura-extrato de malte)
YMA	Meio de cultura (extrato de levedura-extrato de malte-ágar)
Yp/s	Fator de conversão do substrato em etanol



## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1: Introdução Geral.....</b>	<b>29</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1</b>	<b>Café: composição, tipos de processamento e resíduos gerados.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2</b>	<b>Potencial biotecnológico dos resíduos de café.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Etanol.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Obtenção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2.2.1</b>	<b>Composição da biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.3.1</b>	<b>Pré-tratamentos físicos.....</b>	<b>47</b>
<b>2.2.3.2</b>	<b>Pré-tratamentos físico-químicos.....</b>	<b>48</b>
<b>2.2.3.3</b>	<b>Pré-tratamentos químicos.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.3.4</b>	<b>Pré-tratamentos biológicos.....</b>	<b>53</b>
<b>2.2.3.5</b>	<b>Pré-tratamento elétrico (campo elétrico pulsado).....</b>	<b>54</b>
<b>2.2.3.6</b>	<b>Principais vantagens e desvantagens dos diferentes pré-tratamentos.....</b>	<b>54</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Hidrólise (sacarificação) da celulose.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Processos de fermentação e hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica.....</b>	<b>65</b>
<b>2.2.5.1</b>	<b>Hidrólise e fermentação separadas (SHF).....</b>	<b>65</b>
<b>2.2.5.2</b>	<b>Fermentação e hidrólise simultâneas (SSF).....</b>	<b>66</b>
<b>2.2.5.3</b>	<b>Fermentação e hidrólise semi-simultâneas (SSSF).....</b>	<b>66</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Uso de leveduras termotolerantes na produção de etanol</b>	<b>67</b>
<b>2.2.7</b>	<b>A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> e suas aplicações biotecnológicas.....</b>	<b>68</b>
<b>2.2.7.1</b>	<b>Produção de enzimas pectinases.....</b>	<b>70</b>
<b>2.2.7.2</b>	<b>Produção de etanol.....</b>	<b>71</b>
<b>2.3</b>	<b>Obtenção de etanol a partir de resíduos de café.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FASE LÍQUIDA DA POLPA DE CAFÉ (<i>Coffea arabica</i> L.) POR <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT4086 ...</b>	<b>84</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>90</b>
<b>2.1</b>	<b>Matéria-prima e obtenção da fase líquida da polpa de café.....</b>	<b>90</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Análises da polpa de café e de suas fases líquidas.....</b>	<b>91</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>92</b>

2.2	Obtenção do etanol por fermentação da fase líquida da polpa de café.....	92
2.2.1	Microrganismo utilizado e preparo do inóculo para fermentação.....	92
2.2.2	Meios de fermentação.....	93
2.2.3	Processos fermentativos.....	95
2.2.3.1	Açúcares Redutores Totais (ART).....	96
2.2.3.2	Potencial hidrogeniônico e ácidos orgânicos.....	96
2.2.3.3	Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer e contagem total das unidades formadoras de colônias em placa.....	97
2.2.3.4	Concentração de etanol.....	98
2.2.3.5	Parâmetros fermentativos.....	98
2.2.4	Análise estatística.....	100
2.3	Produção de pectinase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	100
2.3.1	Obtenção do extrato enzimático bruto e determinação da atividade das pectinases.....	103
2.3.1.1	Determinação da atividade de poligalacturonase.....	103
2.3.1.2	Determinação da atividade de pectinametilsterase (PME).....	104
2.3.1.3	Determinação da atividade de pectina liase (PL).....	105
2.3.1.4	Determinação das proteínas totais e atividades enzimáticas específicas.....	105
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
3.1	Extração dos componentes solúveis presentes na polpa do café para obtenção da fase líquida da polpa de café	107
3.2	Processos fermentativos.....	110
3.2.1	Cinética de consumo de açúcares redutores totais.....	110
3.2.2	Potencial Hidrogeniônico (pH) e perfil de ácidos orgânicos.....	113
3.2.3	Contagem total de células e viabilidade celular.....	119
3.2.4	Produção de etanol e parâmetros fermentativos.....	124
3.3	Produção de poligalacturonase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 utilizando fase líquida da polpa de café.....	130
3.3.1	Otimização da produção de poligalacturonase por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	133
4	CONCLUSÃO.....	139
	REFERÊNCIAS.....	140
	<b>CAPÍTULO 3: PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FASE SÓLIDA DA</b>	

	<b>POLPA DE CAFÉ (<i>Coffea arabica</i> L.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS..</b>	145
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	147
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	150
<b>2.1</b>	<b>Matéria-prima e obtenção da fase sólida da polpa de café.....</b>	150
<b>2.2</b>	<b>Análises químicas e físico-químicas da fase sólida da polpa de café.....</b>	150
<b>2.2.1</b>	<b>Potencial hidrogeniônico (pH).....</b>	150
<b>2.2.2</b>	<b>Umidade.....</b>	151
<b>2.2.3</b>	<b>Extrato etéreo.....</b>	151
<b>2.2.4</b>	<b>Proteína bruta.....</b>	151
<b>2.2.5</b>	<b>Cinzas.....</b>	151
<b>2.2.6</b>	<b>Fibra bruta.....</b>	152
<b>2.2.7</b>	<b>Extrato não nitrogenado.....</b>	152
<b>2.2.8</b>	<b>Celulose, Hemicelulose e Lignina.....</b>	152
<b>2.2.9</b>	<b>Extrativos.....</b>	153
<b>2.3</b>	<b>Pré-tratamento alcalino a quente da fase sólida da polpa de café.....</b>	153
<b>2.3.1</b>	<b>Determinação do teor remanescente de celulose, hemicelulose e lignina após os pré-tratamentos alcalinos</b>	154
<b>2.3.2</b>	<b>Obtenção do rendimento em massa.....</b>	155
<b>2.3.3</b>	<b>Eficiência do pré-tratamento.....</b>	155
<b>2.4</b>	<b>Hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré- tratada a quente.....</b>	155
<b>2.4.1</b>	<b>Determinação de açúcares redutores totais (ART).....</b>	158
<b>2.4.2</b>	<b>Quantificação da glicose.....</b>	158
<b>2.4.3</b>	<b>Conversão da celulose do material pré-tratado em glicose após hidrólise enzimática.....</b>	159
<b>2.5</b>	<b>Estudo do reuso da solução alcalina no pré-tratamento da fase sólida da polpa de café.....</b>	159
<b>2.5.1</b>	<b>Análises dos resíduos líquidos gerados após cada etapa de reuso.....</b>	160
<b>2.6</b>	<b>Pré-tratamentos alcalinos a temperatura ambiente da fase sólida da polpa de café.....</b>	161
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	162
<b>3.1</b>	<b>Caracterização da polpa de café.....</b>	162
<b>3.2</b>	<b>Hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café após alicação dos pré-tratamentos alcalinos.....</b>	163
<b>3.3</b>	<b>Reuso da solução de hidróxido de sódio 4% em ciclos de deslignificação.....</b>	172
<b>3.4</b>	<b>Pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café</b>	

	a temperatura ambiente.....	176
4	CONCLUSÃO.....	185
	REFERÊNCIAS.....	186
	<b>CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO DE ETANOL POR</b> <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086 UTILIZANDO FASE SÓLIDA DA POLPA DE CAFÉ ( <i>Coffea arabica</i> L.) POR PROCESSOS DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SEPARADAS, SIMULTÂNEAS E SEMI-SIMULTÂNEAS.....	190
1	INTRODUÇÃO.....	193
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	196
2.1	Substrato e pré-tratamento alcalino a quente.....	196
2.1.1	Metodologias analíticas.....	198
2.1.2	Umidade.....	198
2.1.2.1	Celulose, hemicelulose e lignina.....	198
2.1.2.2	Cinzas.....	199
2.1.2.3	Rendimento em massa.....	199
2.1.2.4	Determinação do teor remanescente de celulose, hemicelulose e lignina após os pré-tratamentos.....	200
2.2	Enzimas e hidrólise enzimática (sacarificação).....	200
2.3	Processos fermentativos.....	202
2.3.1	Microrganismo utilizado e preparo do inóculo.....	202
2.3.2	Testes de termotolerância da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 4086.....	203
2.3.2.1	Análise estatística do teste de termotolerância.....	204
2.3.3	Tipos de processos.....	204
2.3.3.1	Sacarificação e fermentação e separadas (SHF).....	205
2.3.3.2	Sarificação e fermentação semi-simultâneas (SSSF).....	206
2.3.3.3	Sacarificação e fermentação simultâneas.....	207
2.3.4	Parâmetros fermentativos.....	208
2.3.4.1	Produtividade em etanol (Qp).....	208
2.3.4.2	Conversão de celulose em etanol.....	209
2.3.4.3	Conversão de glicose em etanol.....	209
2.3.4.4	Eficiência fermentativa.....	210
2.3.4.5	Análises estatísticas.....	210
2.3.5	Metodologias analíticas.....	210
2.3.5.1	Açúcares redutores.....	210
2.3.5.2	Glicose .....	211
2.3.5.3	Conversão da celulose em glicose.....	211
2.3.5.4	Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer.....	212
2.3.5.5	Contagem total em placa.....	212

2.3.5.6	Potencial hidrogeniônico.....	213
2.3.5.7	Etanol.....	213
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	214
3.1	Características fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrólise enzimática.....	214
3.2	Avaliação termotolerância da <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT4086.....	217
3.3	Processos fermentativos.....	221
3.3.1	Sacarificação e fermentação separadas (SHF).....	221
3.3.2	Sacarificação e fermentação semi-simultâneas (SSSF)...	225
3.3.3	Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).....	230
3.3.4	Parâmetros fermentativos.....	234
4	CONCLUSÃO.....	238
	REFERÊNCIAS.....	239
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	243
	APÊNDICE.....	245

## **CAPÍTULO 1: Introdução Geral**

### **1 INTRODUÇÃO**

O café é um dos principais produtos agrícolas do Brasil e o estado de Minas Gerais destaca-se como o maior produtor nacional. A planta do cafeeiro pertence ao gênero *Coffea*, sendo as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner as de maior relevância no mercado.

A quarta estimativa (realizada em dezembro de 2012) de produção de café para a safra 2012 indica que o país deverá colher 50,83 milhões de sacas de 60 kg do produto beneficiado, o que resulta em um crescimento de 16,9% em relação ao ano agrícola anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2012).

A quantidade de resíduos produzidos cresce concomitantemente à produção de café, sobretudo em virtude do processamento pós-colheita, fundamental para a obtenção de uma bebida de boa qualidade.

No Brasil, dois tipos de processamentos pós-colheita são utilizados: por via seca e por via úmida. O processo por via seca, em que se obtém o café em coco, consiste na derriça de frutos da planta, que são levados ao terreiro ou ao secador, podendo, antes, passar pelo lavador. Já no processo por via úmida, os frutos são descascados/lavados, despulpados ou desmucilados (PIMENTA, 2003). Os sólidos residuais obtidos são denominados polpa, para designar os resíduos provenientes do processamento por via úmida e casca, para denominar os resíduos oriundos do processamento do café por via seca (PANDEY et al., 2000).

Estima-se que, para cada tonelada de grãos de café produzida, a mesma quantidade de casca seja gerada durante o processamento por via seca, enquanto

o processamento por via úmida gera aproximadamente o dobro de resíduos em relação à quantidade de material processado (SAENGER et al., 2001).

Os resíduos oriundos do processamento pós-colheita do café são ricos em materiais orgânicos e inorgânicos e, se forem lançados ao meio ambiente, sem tratamento prévio, podem poluir os recursos naturais. As ricas composições desses resíduos os tornam potenciais substratos para processos biotecnológicos (PANDEY et al., 2000), o que diminui o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado e confere valor econômico ao resíduo.

Uma maneira interessante de agregar valor à polpa de café e diminuir a poluição ambiental decorrente do seu descarte seria o seu uso na produção de etanol, haja vista sua composição em carboidratos, tanto na fração líquida quanto na fração fibrosa.

As leveduras da espécie *Kluyveromyces marxianus* têm sido amplamente utilizadas na obtenção de etanol a partir de resíduos da indústria de alimentos, desde resíduos líquidos, como o soro de leite, até sólidos, como bagaço de cana-de-açúcar (COSTA, 2011), pelo fato de esse microrganismo possuir características importantes, como a alta conversão do substrato em biomassa e a ampla faixa de temperatura na qual pode crescer.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a viabilidade científica do emprego da polpa de café, na forma de suas fases líquida e sólida, para a obtenção de etanol, como produto principal, utilizando-se *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Esta tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro capítulo refere-se à revisão bibliográfica, na qual se relaciona um selecionado referencial teórico que embasou o estudo. No segundo contempla-se a utilização da fase líquida da polpa de café para a produção de etanol e de poligalacturonase em processos independentes. No terceiro capítulo estuda-se a otimização do pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café e, no quarto, emprega-se a fase sólida da

polpa de café pré-tratada em diferentes processos de obtenção de etanol lignocelulósico. As etapas de realização deste trabalho estão sumarizadas na Figura 1.

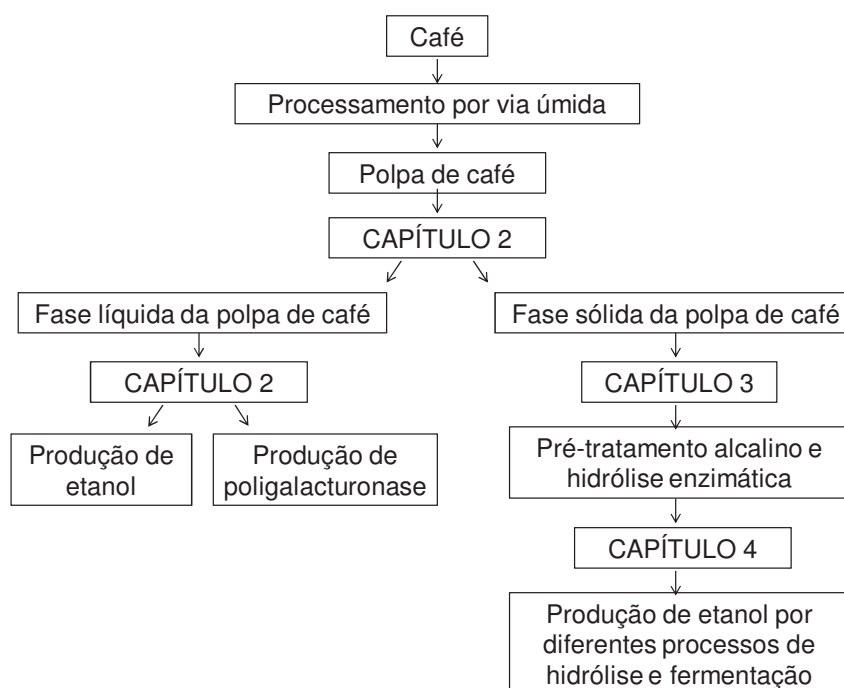


Figura 1 Fluxograma das etapas realizadas



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O café é um alimento de importância mundialmente reconhecida, sendo um dos produtos agrícolas mais importantes do Brasil, responsável por proporcionar grande retorno econômico, em virtude das exportações, da industrialização e dos empregos gerados em toda a sua cadeia produtiva. O Brasil destaca-se por ser o maior produtor e exportador mundial de café.

### 2.1 Café: composição, tipos de processamento e resíduos gerados

A planta cafeeiro pertence ao gênero *Coffea* e à família *Rubiaceae*. Das cem espécies descritas no gênero *Coffea*, somente duas produzem frutos que têm importância econômica no mercado internacional, sendo *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Seus produtos são designados como café arábica e café robusta, respectivamente, sendo o primeiro mais explorado internacionalmente (PIMENTA, 2003). Na Figura 2 ilustra-se a produção de café referente à safra de 2011, sendo possível verificar que o estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional de café, seguido pelo Espírito Santo.

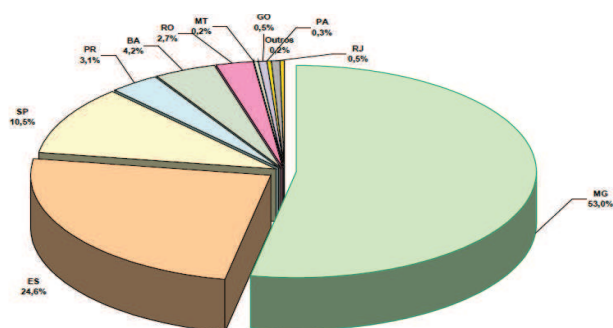


Figura 2 Produção de café referente à safra de 2011: participação percentual por Unidade Federativa  
 Fonte: CONAB (2012)

O fruto do cafeeiro é composto, da parte externa para a parte interna, por uma casca resistente denominada pericarpo, que recobre o mesocarpo externo (polpa). Após a polpa encontra-se a mucilagem, seguida pelo pergaminho (endocarpo) e pela película prateada que, finalmente, recobre o grão de café (ESQUIVEL; JIMENÉZ, 2012). O fruto do cafeeiro e seus componentes estão esquematicamente representados na Figura 3.

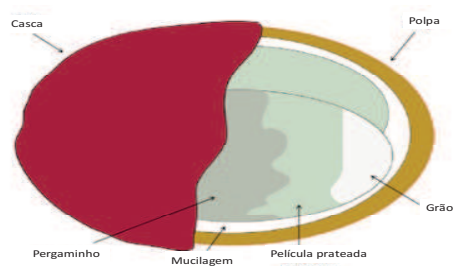


Figura 3 Componentes do fruto do cafeeiro  
 Fonte: Esquivel e Jimenéz (2012)

O estágio cereja representa o ponto ótimo de maturação do café, em que toda composição química dos frutos encontra em seu valor máximo, principalmente açúcares e pectinas, que se encontram presentes na casca, mucilagem e sementes e podem contribuir para uma melhor qualidade do produto. Após a colheita, o café passa por um beneficiamento que pode ser realizado por via seca ou por via úmida (PIMENTA, 2003). No processamento por via seca, o café é lavado e submetido a um processo de secagem. O fruto é processado integralmente (PIMENTA, 2003). Quando processados por via úmida, os frutos do cafeeiro podem originar os cafés descascados, despulpados ou desmucilados. Na obtenção do café cereja descascado, os frutos são descascados por processos mecânicos e parte da mucilagem ainda permanece aderida ao pergaminho dos frutos. Na obtenção do café despulpado, após o descascamento, a parte da mucilagem que ainda estava aderida aos frutos é removida em tanques de fermentação biológica. Se a remoção desta mucilagem remanescente for realizada mecanicamente, tem-se, então, o café desmucilado (MALTA, 2010).

Em virtude do método de processamento do café cereja, os sólidos residuais obtidos têm diferentes terminologias, sendo polpa o termo empregado para denominar os resíduos provenientes do processamento por via úmida e casca o nome atribuído aos resíduos oriundos do processamento do café por via seca (PANDEY et al., 2000).

A casca de café é oriunda da limpeza do café em coco (café processado por via seca), composta de epicarpo (casca), mesocarpo (polpa ou mucilagem), endocarpo (pergaminho) e película prateada (MATIELLO, 1991; BARCELOS et al., 2002). A fim de se evitar complicações oriundas da mesma denominação, faz-se necessário destacar a diferença entre a polpa, que faz parte da constituição do fruto (Figura 3) e quanto ao resíduo polpa de café. Polpa como parte do fruto, refere-se ao mesocarpo externo do fruto, conforme citado anteriormente

(ESQUIVEL; JIMENÉZ, 2012) e polpa como resíduo do processamento por via úmida do café cereja, é composta por epicarpo e parte do mesocarpo. Dessa maneira, as diferenças existentes entre casca e polpa de café são que a casca é obtida seca e contém pergaminho e a polpa é úmida e não contém pergaminho, o qual fica preso como forma de proteger o grão (MATIELLO, 1991; BARCELOS et al., 2002).

## **2.2 Potencial biotecnológico dos resíduos de café**

Os resíduos gerados durante o processamento do café são ricos em materiais orgânicos e inorgânicos e, se forem lançados ao ambiente sem tratamento prévio, podem causar poluição. Todavia, a rica composição em matéria orgânica torna esse substrato ideal para processos microbiológicos no intuito de obter produtos de valor agregado (PANDEY et al., 2000).

A composição da polpa de café, substrato utilizado para a realização deste trabalho, relatada por diferentes autores, encontra-se sumarizada na Tabela 1. Por meio dos dados podem ser percebidas diferenças existentes entre os valores relatados na literatura para a mesma variável em análise. Essas diferenças podem ser decorrentes do tipo de processamento, das diferentes variedades e cultivares e das condições de cultura, entre outros fatores.

Tabela 1 Composição da polpa de café.

Variável (%MS)	Referências consultadas		
	Bressani (1978)	Barcelos et al. (2002)	Ulloa-Rojas et al. (2002)
Extrato etéreo	2,5	2,47 a 2,65	2,9
Proteína	10	12,58 a 13,60	8
Cinzas	8	8,42 a 8,56	8,9
Fibras	21	-	-
FDA	-	53,64 a 55,33	-
FDN	-	77,84 a 78,33	-
Hemicelulose	-	23,01 a 24,42	-
Celulose	27,65	36,39 a 36,77	28,6
Lignina	17,5	-	-
Taninos	1,8 a 8,56	-	0,7
Polifenóis	-	-	2,0
Pectinas	6,52	-	-
Carboidratos	50	-	-
AR	12,4	-	-
AnR	2,02	-	-
Cafeína	1,3	-	-

Abreviaturas utilizadas: MS = matéria seca; FDA = fibra em detergente ácido; FDN = fibra em detergente neutro; AR = açúcares redutores; AnR = açúcares não redutores.  
- Não analisado.

Tradicionalmente, a casca e a polpa de café obtiveram apenas aplicações limitadas como fertilizantes, ração animal, biocompostagem, etc. Essas aplicações utilizam apenas uma fração da quantidade disponível e não foram tecnicamente muito eficientes. Estudos recentes focaram suas aplicações como substratos em bioprocessos (PANDEY et al., 2000).

Soares et al. (2000) estudaram a produção de compostos aromáticos frutais por *Ceratocystis fimbriata*, por meio de fermentação em estado sólido utilizando casca de café tratada com vapor e suplementada com glucose (20% a 46%). Foi observada a formação de aroma de abacaxi e de banana, resultante da

produção de vários álcoois, aldeídos e ésteres (acetaldeído, etanol, isopropanol, acetato de etila, isobutirato de etila, acetato de isobutila e acetato de isoamila).

Prata e Oliveira (2007) utilizaram cascas de café frescas como fonte de antocianinas (pigmentos naturais utilizados na indústria de alimentos). Tais autores identificaram a cianidina-3-rutinosida como a antocianina predominante nesse tipo de resíduo e indicaram a casca de café fresca como fonte econômica desse pigmento.

Com base no exposto, fica evidente o potencial dos resíduos de café, com ênfase na casca e na polpa, para a aplicação em processos biotecnológicos, com a obtenção de produtos com alto valor agregado, oferecendo melhores oportunidades para o aproveitamento econômico desses resíduos (PANDEY et al., 2000).

### **2.2.1 Etanol**

O etanol é o mais comum dentre os alcoóis. Contém, em sua estrutura molecular, um grupo hidroxila ligado a um átomo de carbono, com a fórmula  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  ou, de maneira simplificada,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ . É muito utilizado em bebidas alcoólicas, como solvente, aromatizante, como combustível para veículos e na produção elétrica, constituindo um importante produto químico industrial (MOUCO, 2011). Quando é obtido de produtos agrícolas, é denominado bioetanol.

O etanol pode ser obtido por via destilatória, por via sintética (a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, oriundos de gases de petróleo e da hulha) e por via fermentativa, sendo esta última a maneira mais importante para a produção de etanol no Brasil (LIMA et al., 2001).

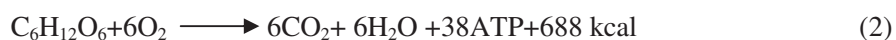
O termo fermentação, de maneira geral, denota a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos, para se obter energia na forma de adenosina trifosfato, ou ATP (LEHNINGER et al., 2006).

A glicose é o principal combustível da maioria dos organismos e tem papel central no metabolismo. Sua oxidação é conhecida por glicólise, realizada por dez reações sequenciais catalisadas por enzimas específicas (conhecidas como enzimas glicolíticas) e resulta em duas moléculas de piruvato, que podem ter três destinos principais: em microrganismos aeróbios é oxidado a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e energia (ATP) (ciclo do ácido tricarboxílico, ciclo de Krebs), em processos anaeróbios pode ser reduzido a lactato (via de fermentação do ácido láctico) e, também, em condições anaeróbias pode ser convertido a etanol, CO<sub>2</sub> e energia (ATP), no processo conhecido como fermentação alcoólica (LEHNINGER et al., 2006). Dessa maneira, a fermentação alcoólica envolve 12 reações em sequência, cada qual catalisada por uma enzima específica, localizadas no citoplasma celular (LIMA et al., 2001).

Os principais microrganismos envolvidos na produção de etanol por via fermentativa são as leveduras. Esses microrganismos são fungos unicelulares e caracterizam-se pela forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação, sendo que em algumas leveduras a divisão celular ocorre sexuadamente por meio da formação de esporos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Podem ser classificadas em aeróbias, aeróbias facultativas e fermentativas, dependendo de sua via de utilização do oxigênio (LANE; MORRISSEY, 2010).

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (as mais empregadas na obtenção de etanol) e as da espécie *Kluyveromyces marxianus* (utilizadas nesse trabalho) são aeróbias facultativas. Nessas leveduras, em ausência de oxigênio, há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato Descarboxilase e Alcooldehidrogenase, produzindo etanol e água a partir do piruvato, sendo a

etapa global representada pela equação de Gay-Lussac (Equação 1). Todavia, em presença de oxigênio, parte do ácido pirúvico pode ser deslocada para o ciclo do ácido tricarboxílico (o ciclo de Krebs) (Equação 2), em que será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água, sendo essa oxidação realizada na mitocôndria (LIMA et al., 2001; LEHNINGER et al., 2006; LANE; MORRISSEY, 2010).



A partir da equação de Gay-Lussac é possível calcular o rendimento estequiométrico da produção de etanol (rendimento teórico) a partir de glicose, de acordo com a Equação 3 (LEHNINGER et al., 2006).

$$\eta = \frac{92 \text{ g de etanol}}{180 \text{ g de glicose}} = 0,511 \text{ g de etanol. g de glicose}^{-1} \quad (3)$$

As matérias-primas utilizadas para a produção de etanol podem ser classificadas em três classes: (I) matérias-primas açucaradas (ou contendo sacarose), tais como beterraba, cana-de-açúcar, mel, sorgo sacarino, entre outras; (II) matérias-primas amiláceas, como, por exemplo, trigo, milho, cevada, etc. e (III) matérias-primas lignocelulósicas, como, por exemplo, madeira, palha, gramíneas e resíduos agrícolas (BALAT; BALAT; OZ, 2008).

De acordo com o último anuário estatístico da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, a produção brasileira de etanol anidro e hidratado foi de  $2,8 \times 10^7 \text{ m}^3$ , em 2010 (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, ANP, 2011). O etanol é produzido, principalmente, a partir da cana-de-açúcar e do milho, dependendo das condições climáticas e locais de



produção. Em áreas tropicais, como no Brasil e na Colômbia, o etanol é produzido, principalmente, da cana-de-açúcar. Entretanto, em outras áreas, como nos Estados Unidos, União Europeia e China, a predominância da produção de etanol é a partir do milho (JAY; GOVINDA, 2011).

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil tem sido amplamente discutida, em termos da sua sustentabilidade. Segundo Andrade e Diniz (2007), a produção de cana traz consigo: (I) redução da biodiversidade, causada pelo desmatamento e pela implantação de monocultura; (II) contaminação das águas superficiais e subterrâneas e do solo, por meio da prática excessiva de adubação química, corretivos minerais e aplicação de herbicidas e defensivos agrícolas; (III) compactação do solo, pelo tráfego de máquinas pesadas, durante o plantio, tratos culturais e colheita; (IV) assoreamento de corpos d'água, devido à erosão do solo em áreas de reforma; (V) emissão de fuligem e gases de efeito estufa, na queima, ao ar livre, de palha, durante o período de colheita; (VI) danos à flora e à fauna, causados por incêndios descontrolados e (VII) consumo intenso de óleo diesel, nas etapas de plantio, colheita e transporte.

As pesquisas de produção do etanol tendem a buscar pela utilização de resíduos agroindústrias, tais como resíduos de beterraba, cevada, aveia, batata, milho, arroz, mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros, sendo interessante a incorporação da polpa de café entre esses resíduos. O etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos, também chamado de etanol de segunda geração, é apresentado como uma alternativa à produção de etanol de primeira geração.

### **2.2.2 Obtenção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas**

Para a conversão de biomassas lignocelulósicas a etanol, são requeridos alguns passos principais, que são: escolha de biomassa lignocelulósica adequada, uso de um pré-tratamento eficaz, uso de enzimas hidrolíticas, como celulases e hemicelulases, juntamente com as enzimas acessórias, fermentação de hexoses e pentoses originadas na etapa hidrolítica e tratamento dos materiais produzidos (MENON; RAO, 2012).

Resumidamente, essa conversão inclui a hidrólise de diversos componentes dos materiais lignocelulósicos para transformá-los em açúcares fermentescíveis que, posteriormente, serão fermentados a etanol. O pré-tratamento é necessário para se obter uma eficiente hidrólise da celulose em seus açúcares constituintes, por facilitar o acesso do agente hidrolítico ao substrato celulose. Esta hidrólise é catalisada por ácidos ou enzimas e a fermentação é realizada por bactérias e leveduras (KUMMAR; WYMAN, 2009).

#### **2.2.2.1 Composição da biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica é formada, principalmente, por três polímeros principais: celulose (30% a 50% m/m), hemicelulose (19% a 45% m/m) e lignina (15% a 35% m/m) e por constituintes em menores proporções, como os extraíveis (álcoois, ésteres, entre outros) e compostos inorgânicos ou minerais (sulfatos, oxalatos, potássio, magnésio, entre outros). A proporção de cada polímero é variável em diferentes matérias-primas, espécies e tecidos de vegetais (PEDERSEN; MEYER, 2010).

### a) Celulose

A celulose é uma molécula orgânica polimérica linear, formada por moléculas de D-glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007). O tamanho da molécula de celulose é dado, normalmente, em termos de seu grau de polimerização, que se refere ao número de unidades de glicose anidra presentes em uma cadeia, podendo variar de 1.000 a 15.000 unidades de glicose (FENGEL; WEGENER, 1984). Todavia, por meio da análise conformacional da molécula de celulose, verifica-se que a celobiose é a sua unidade de repetição (RAMOS, 2003), conforme pode ser visto na Figura 4.

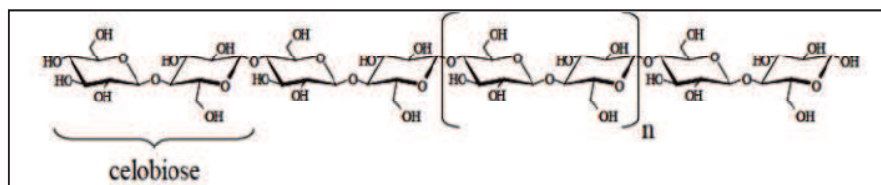


Figura 4 Cadeia linear da celulose  
Fonte: Timar-Balázsy e Eastop (1998)

A celobiose é um dissacarídeo formado pela união de duas moléculas de glicose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4 (AGBOR et al., 2011), com perda de uma molécula de água. Contém seis grupamentos hidroxila (-OH), responsáveis por estabelecerem ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Tais ligações acarretam forte tendência de formação de cristais de celulose, fazendo com que essas moléculas apresentem insolubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos (SILVA et al., 2009). Dessa maneira, a celulose contém partes formadas por estruturas cristalinas (organizadas) e partes com regiões amorfas, nas quais as estruturas não são suficientemente organizadas (HENDRIKS;

ZEEMAN, 2009). As cadeias de celulose são agrupadas, formando as microfibrilas que se empacotam e formam as fibras de celulose. Essas fibras são majoritariamente independentes e ligadas por meio de ligações de hidrogênio (AGBOR et al., 2011).

#### **b) Hemicelulose**

A hemicelulose é um polímero formado por vários monossacarídeos, como pentoses (por exemplo: xilose e arabinose) e hexoses (galactose, glicose e manose), além de conter ácido 4-o-metilglucurônico e resíduos de ácido galacturônico (SILVA et al., 2009). Os componentes da hemicelulose podem ser classificados, de modo geral, em: (I) cadeias não ramificadas, como as ligações (1,4) de xilanas ou mananas; (II) cadeias helicoidais, como as ligações (1,3) de xilanas; (III) cadeias ramificadas, como as ligações (1,4) de galactoglicomananas e (IV) substâncias pécticas, como as polirramnogalacturonanas (RAMOS, 2003). Além disso, hemiceluloses podem conter algum grau de acetilação, como em heteroxilanos, por exemplo (KUMMAR; WYMAN, 2009).

As hemiceluloses são estruturalmente mais relacionadas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em uma fase anterior à lignificação (RAMOS, 2003). Em contraste com a celulose, os polímeros presentes nas hemiceluloses são mais facilmente hidrolisáveis e não se agregam, mesmo quando cocristalizam com a celulose (KUMMAR; WYMAN, 2009).

#### **c) Lignina**

A lignina é um heteropolímero amorfo, insolúvel em água, com estrutura tridimensional ramificada, podendo ser classificada como pertencente à classe dos polifenóis (SILVA et al., 2009). É a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose, formada por fenilpropano (unidades C9), tendo

como precursores três álcoois cinamílicos, conhecidos como monolignóis: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1984), cujas fórmulas estruturais estão ilustradas na Figura 5. Ligações éter alquila-arila, alquila-alquila e arila-arila mantêm esses monômeros fenólicos juntos (KUMMAR; WYMAN, 2009). A lignina é um importante composto que atua no transporte de nutrientes e de metabólitos nos vegetais, além de ser responsável pela resistência mecânica e pela proteção contra o ataque de microrganismos (FENGEL; WEGENER, 1984).

Por estar estritamente associada às microfibrilas de celulose, a lignina tem sido identificada como um dos principais impedimentos para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (AGBOR et al., 2011).

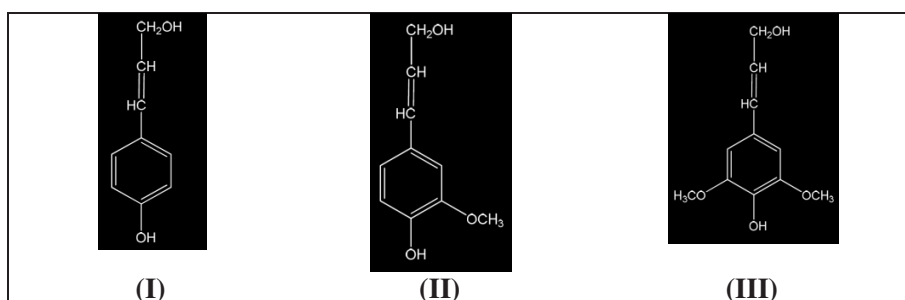


Figura 5 Precursores primários das ligninas álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III)

Fonte: Marabezi (2009)

#### d) Extrativos

Os extrativos são materiais solúveis que não são parte integrante da estrutura celular, como os açúcares não estruturais, materiais nitrogenados, clorofila e ceras, entre outros (KUMMAR; WYMAN, 2009). Podem ser extraídos utilizando-se diferentes solventes (polares ou apolares) e, algumas

vezes, são classificados baseando-se no tipo de solvente empregada na sua extração.

### **2.2.3 Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos**

A hidrólise de materiais lignocelulósicos em monossacarídeos ainda é tecnicamente problemática, uma vez que a digestibilidade da celulose é impedida por muitos fatores físico-químicos, estruturais e composicionais. A presença de lignina e hemicelulose dificulta o acesso das enzimas celulasas ao seu substrato (celulose), reduzindo assim, a eficiência da hidrólise. Por essa razão, a etapa de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é um passo essencial para a obtenção de açúcares fermentescíveis.

O processo responsável por transformar qualquer biomassa lignocelulósica de sua forma nativa para uma forma que favoreça a hidrólise enzimática é denominado pré-tratamento (LYND et al., 2002), o qual objetiva quebrar a estrutura de lignina e da hemicelulose, além de reduzir a cristalinidade da celulose, ações essas que aumentam a acessibilidade das enzimas celulasas à celulose, durante a hidrólise (MOSIER et al., 2005; KUMMAR; WYMAN, 2009; ALVIRA et al., 2010), sem que haja perdas de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os passos subsequentes, em especial a fermentação (SUN; CHENG, 2002).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa de grande importância na conversão de materiais lignocelulósicos a etanol, pois tem impacto em todos os outros passos, tais como a hidrólise enzimática, a fermentação e nos resíduos gerados após o processo (GALBE; ZACCHI, 2012).

A escolha do pré-tratamento ideal depende, além do tipo de matéria-prima que será utilizada, da avaliação do impacto ambiental e econômico do processo a ser empregado. Cada tipo de pré-tratamento tem vantagens e

desvantagens intrínsecas (MENON; RAO, 2012), que serão relatadas nos próximos itens deste trabalho.

Na teoria, um processo de pré-tratamento, para ser considerado ideal, teria que produzir um substrato com facilidade de ser hidrolisado e evitar a formação de produtos da degradação de açúcares e inibidores da fermentação (AGBOR et al., 2011). De acordo com Sun e Cheng (2002), o pré-tratamento deve satisfazer, além dos requisitos mencionados anteriormente, mais uma exigência: ser economicamente viável. Galbe e Zacchi (2012) acrescentam que o pré-tratamento deve resultar em uma alta concentração de sólidos e exigir baixa demanda energética.

Os pré-tratamentos podem ser avaliados de diferentes maneiras: (I) por análise dos açúcares presentes na fração líquida e do teor de carboidratos presentes nos sólidos insolúveis, permitindo o cálculo do valor total de carboidratos recuperados; (II) pela hidrólise enzimática do material pré-tratado (lavado ou não); (III) por meio da fermentação da fração líquida do material pré-tratado, visando à avaliação de sua fermentabilidade direta ou diluída, a fim de não se atingir a concentração de inibição dos microrganismos; (IV) pela fermentação da fração sólida para a produção de biocombustíveis e (V) verificando-se o potencial biotecnológico das frações pré-tratadas para a obtenção de subprodutos com alto valor agregado (AGBOR et al., 2011).

Diferentes tecnologias de pré-tratamento têm sido sugeridas na literatura, entretanto, a proposta de um processo universal é extremamente difícil, em virtude da diversidade de diferentes fontes de biomassas. Dependendo do tipo de forças envolvidas ou das energias consumidas no processo (ALVIRA et al., 2010), os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos, biológicos e elétricos ou, ainda, uma combinação desses (KUMMAR ; WYMAN, 2009). Nos itens seguintes serão abordados os pré-tratamentos relatados na literatura com maior frequência.

### 2.2.3.1 Pré-tratamentos físicos

#### a) Pré-tratamento térmico

Neste tipo de pré-tratamento, o material lignocelulósico é aquecido. Em temperaturas de 150 a 180 °C, as partes da biomassa lignocelulósica, primeiro a hemicelulose e depois a lignina, começam a se solubilizar. Parte da hemicelulose se transforma em ácidos que atuam quebrando a hemicelulose, originando um processo autocatalítico. A lignina, por sua vez, libera compostos fenólicos que podem inibir as leveduras utilizadas para a fermentação. A partir de 250 °C, reações indesejáveis, como a pirólise, começam a acontecer, sendo indicado o uso de temperaturas abaixo desse valor (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

#### b) Pré-tratamento por fragmentação

A redução de tamanho de materiais lignocelulósicos por trituração, moagem e quebra em lascas, entre outros, pode ser aplicada para aumentar a área superficial específica e reduzir a cristalinidade de celulose, facilitando a hidrólise da biomassa (SUN; CHENG, 2002). A função da cominuição dos materiais lignocelulósicos é reduzir as limitações de transferência de calor e de massa (AGBOR et al., 2011). O tamanho final dos materiais é, geralmente, de 10 a 30 mm depois de ser quebrado em lascas e de 0,2 a 2 mm após moagem (KUMMAR; WYMAN, 2009). O tempo de duração da moagem e o tipo de biomassa determinam o aumento da área superficial específica, o grau de polimerização final e a redução líquida na cristalinidade da celulose (AGBOR et al., 2011).

#### c) Pré-tratamento por pirólise

Outro tipo de pré-tratamento físico que pode ser utilizado é a pirólise. Quando os materiais são tratados a temperaturas superiores a 300 °C, a celulose



é decomposta rapidamente em produtos gasosos e material carbonizado residual. A decomposição é muito mais lenta e menos produtos voláteis são formados a temperaturas mais baixas, utilizando-se catalisadores ácidos, por exemplo (SUN; CHENG, 2002; KUMMAR; WYMAN, 2009).

#### **d) Pré-tratamento por extrusão**

O processo de extrusão é um processo inovador e recente. Nele, a biomassa lignocelulósica é submetida ao aquecimento, mistura e corte, resultando em alterações físicas e químicas durante a passagem pela máquina extrusora. Acredita-se que a velocidade do parafuso e a temperatura do barril acarretam desfibrilação, fibrilação e encurtamento das fibras de lignina, perturbando sua estrutura e provocando maior acessibilidade das celulasas ao seu substrato (KARUNANITHY; MUTHUKUMARAPPAN; JULSON, 2008; ALVIRA et al., 2010).

### **2.2.3.2 Pré-tratamentos físico-químicos**

#### **a) Pré-tratamento por explosão a vapor**

Neste tipo de pré-tratamento, a biomassa é tratada com vapor saturado a alta pressão e, em seguida, a pressão é rapidamente reduzida, o que faz com que a biomassa em pré-tratamento seja submetida a uma descompressão explosiva. A explosão a vapor inicia-se, normalmente, a temperaturas na faixa de 160 a 260 °C (valores correspondentes às pressões de 0,69 e 4,83 MPa), por alguns segundos ou minutos, antes que o material seja exposto à pressão atmosférica (MENON; RAO, 2012). O processo de explosão provoca a degradação da hemicelulose e a transformação de lignina, devido à alta temperatura, facilitando a hidrólise da celulose. Esse processo consome menos energia, quando comparado à cominuição mecânica (SUN; CHENG, 2002).

**b) Pré-tratamento por explosão de fibras com amônia**

Esse método opera em pressões elevadas, utilizando amônia em vez de água, em contraste com o pré-tratamento a vapor. O material é tratado, por cerca de 10 a 60 minutos, em temperaturas iguais ou inferiores a 100 °C. Esse tipo de pré-tratamento resulta em descristalização da celulose, depolimerização parcial da hemicelulose por remoção dos grupos acetila e clivagem da hemicelulose e da lignina (GALBE; ZACCHI, 2012; MENON; RAO, 2012).

**c) Pré-tratamento com água líquida quente**

Este tipo de processo emprega água líquida quente em vez de vapor. A principal função da água quente é solubilizar a hemicelulose, disponibilizando a celulose para o ataque de celulases. O pH deve ser mantido entre 4 e 7, para evitar a formação de compostos inibitórios (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). O tratamento com água quente é ajudado e prejudicado pela ruptura das ligações dos ácidos o-acetil e urônico, substituintes da hemicelulose, para gerar ácido acético e outros ácidos orgânicos. É ajudado porque tais ácidos catalisam a formação e a remoção de oligossacarídeos e é prejudicado porque os polissacarídeos, principalmente a hemicelulose, podem ser parcialmente degradados em aldeídos inibidores (furfural e 5-hidroximetilfurfural), quando os ácidos são utilizados (MOSIER et al., 2005).

**d) Pré-tratamento por oxidação úmida**

A oxidação úmida utiliza a combinação de água e oxigênio (ar), na faixa de temperatura de 120 a 200 °C. Uma parte do conteúdo de lignina do material pré-tratado é oxidada e solubilizada, sendo o efeito aumentado pela catálise por bases (GALBE; ZACCHI, 2012).

### 2.2.3.3 Pré-tratamentos químicos

#### a) Ozonólise

O ozônio é um oxidante potente, altamente eficiente na deslignificação (SUN; CHENG, 2002), que pode ser utilizado à temperatura ambiente. A degradação em compostos lignocelulósicos é quase limitada à lignina, sendo a hemicelulose pouco perturbada e a celulose praticamente não afetada. O ozônio é facilmente degradado por catálise ou aumentando-se a temperatura, o que minimiza a poluição originada de sua emissão ao ambiente (KUMMAR; WYMAN, 2009).

#### b) Pré-tratamento organossolve

No pré-tratamento organossolve ocorre uma pré-hidrólise simultaneamente à deslignificação. Utiliza-se uma mistura de solvente e de um catalisador ácido para romper a estrutura interna da lignina e quebrar as ligações da hemicelulose. Diversos solventes podem ser utilizados em solução com água (etanol, acetona ou glicóis), sendo necessária a remoção dos mesmos após o pré-tratamento, por serem inibidores de processos fermentativos, o que aumenta o consumo de energia do processo (MEJÍA; GUTIÉRREZ; EL-HALWAGI, 2012).

#### c) Pré-tratamento por líquidos iônicos

Os líquidos iônicos são compostos por grandes cátions orgânicos e pequenos ânions inorgânicos (por exemplo, cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio) encontrados no estado líquido à temperatura ambiente ou até em temperaturas mais baixas. Por não formarem gases tóxicos, são denominados “solventes verdes” (ALVIRA et al., 2010). O mecanismo de ação dos líquidos iônicos envolve a ruptura das ligações entre celulose, hemicelulose e lignina,

dissolvendo essas macromoléculas sem muita formação de compostos inibidores (MEJÍA; GUTIÉRREZ; EL-HALWAGI, 2012).

#### **d) Pré-tratamento oxidativo**

O processo oxidativo envolve a deslignificação causada pela oxidação da lignina submetida à ação de agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio. Durante o pré-tratamento oxidativo, ocorrem várias reações, tais como substituição eletrofílica, deslocamento de cadeias laterais, clivagem de ligações éter (alquilo-arilo) ou quebra oxidativa de anéis aromáticos. Caso o agente oxidante não seja seletivo, perdas de celulose e hemicelulose podem acontecer. Existe um alto risco de formação de inibidores, entretanto, inibidores como furfural e hidroximetilfurfural não foram observados após deslignificação utilizando o tratamento oxidativo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009, KUMMAR ; WYMAN, 2009; KULOYO, 2012).

#### **e) Pré-tratamento ácido**

O pré-tratamento ácido tem como principal objetivo a dissolução da hemicelulose, o que aumenta a acessibilidade da celulase à celulose (MOSIER et al., 2005). O pré-tratamento pode ser realizado com ácidos diluídos ou concentrados. O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempos de reação de segundos a minutos (KULOYO, 2012). Nos pré-tratamentos com ácidos concentrados, as condições (temperatura e pressão) são mais brandas. Neste tipo de pré-tratamento, a lignina é solubilizada e rapidamente condensada, formando um precipitado. A solubilização da hemicelulose e a precipitação da lignina são mais efetivas nos pré-tratamentos que utilizam ácidos concentrados (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Em processos ácidos forma-se, entre outros produtos de degradação, o 5-

hidroximetilfurfural, oriundo da oxidação da glicose proveniente da decomposição da celulose (MOSIER et al., 2005; KUMAR; WYMAN, 2009).

#### f) Pré-tratamento alcalino

Um dos principais tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos é o alcalino, particularmente por dissolver de forma muito eficiente a lignina, além de remover grupos acetila e vários substituintes dos ácidos urônicos que, quando presentes na biomassa, diminuem a susceptibilidade da celulose e hemicelulose à hidrólise enzimática (WAN; ZHOU; LI, 2011). Além de aumentar a solubilização da lignina, o tratamento alcalino ocasiona o inchaço da celulose, aumentando a sua porosidade (NLEWEM; THARASH JR., 2010) e facilitando a hidrólise enzimática.

O pré-tratamento alcalino, além de dissolver a lignina também causa a saponificação de ligações ésteres intermoleculares, de vários componentes da biomassa (SUN; CHENG, 2002). Na Figura 6 consta um esquema da reação de saponificação das ligações ésteres, indicando seus reagentes e produtos.

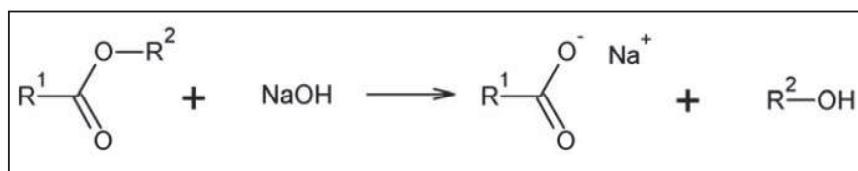


Figura 6 Reação de saponificação de ligações ésteres em presença de hidróxido de sódio, para a obtenção de um sal carboxílico e um álcool

Fonte: Pedersen e Meyer (2010)

Diversos tipos hidróxidos vêm sendo empregados no pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, como hidróxido de sódio, de cálcio e de amônio entre outros. As bases fracas, como o hidróxido de amônio, leva a longos tempos

de pré-tratamento, até que se quebre de forma efetiva a estrutura da lignocelulose, sobretudo em temperaturas amenas. O hidróxido de sódio, uma base forte, tem se mostrado eficiente para quebrar as estruturas da lignocelulose em temperaturas moderadas (XU et al., 2010).

Devido ao seu custo mais elevado, em relação ao hidróxido de cálcio, foi proposta, por autores como Xu e Cheng (2011), a combinação do hidróxido de sódio (NaOH) com o hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$ , sendo este último, além de mais barato, menos solúvel em relação ao NaOH, capaz de proporcionar uma massa sólida que pode ser consumida gradualmente ao longo do pré-tratamento. Outro ponto positivo do  $Ca(OH)_2$  em relação ao NaOH é a presença do íon cálcio divalente, do qual se espera a realização de ligações no interior da biomassa (com grupos carboxílicos negativamente carregados em pH alcalino) que impeçam a perda grave de sólidos, observada comumente em tratamentos com NaOH (XU et al., 2010; XU; CHENG, 2011).

#### **2.2.3.4 Pré-tratamentos biológicos**

Os tratamentos biológicos utilizam diversos fungos, tais como fungos da podridão-marrom, branca ou mole, sendo um método seguro (inclusive ao meio ambiente), além de não requerer elevado consumo de energia para remover a lignina (SUN; CHENG, 2002; KUMMAR; WYMAN, 2009). Os fungos da podridão-marrom atacam a celulose e os fungos da podridão-branca e macia atacam tanto a celulose quanto a lignina, sendo os da podridão-branca os mais efetivos neste tipo de pré-tratamento.

A degradação da lignina por esses fungos da podridão-branca acontece por meio de ações enzimáticas, como, por exemplo, das enzimas peroxidases e lacases (KULOYO, 2012). A despolimerização da lignina realizada por tais fungos tem um grande tempo de duração (semanas), até que se consigam bons

resultados, mas podem ser muito seletivos e eficientes (AGBOR et al., 2011). Hatakka et al. (1994), citados por Agbor et al. (2011), relatam uma deslignificação efetiva pelos fungos da podridão branca: *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Dichmitus squalens*, *Rigidosporus lignosus* e *Jungua separabilima*, tendo como substrato madeira e palha de trigo.

#### **2.2.3.5 Pré-tratamento elétrico (campo elétrico pulsado)**

No pré-tratamento por campo elétrico pulsado, aplica-se uma alta tensão com uma pequena explosão de uma amostra colocada entre dois eletrodos. Este pré-tratamento facilita a exposição da celulose, podendo criar poros permanentes na membrana celular de vegetais, facilitando a entrada de ácidos e enzimas, que irão quebrar a celulose em seus monômeros constituintes. O pré-tratamento é realizado à temperatura ambiente e o consumo de energia é baixo, uma vez que os pulsos elétricos são curtos (com tempos da ordem de 100  $\mu$ s) (KUMMAR; WYMAN, 2009).

#### **2.3.3.6 Principais vantagens e desvantagens dos diferentes pré-tratamentos**

Os pré-tratamentos têm sido comparados segundo diversos fatores, desde o ponto de vista econômico, como dos compostos inibitórios formados, do tempo e da temperatura de duração, entre outros. Na Tabela 2 estão sumarizadas as principais vantagens e desvantagens, relatadas na literatura, dos pré-tratamentos abordados anteriormente.

Tabela 2 Resumo das principais vantagens e desvantagens dos pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens	Referência
Físicos			
Fragmentação	Reduz a cristalinidade da celulose	Elevado consumo de energia.	Kummar e Wyman (2009)
Pirólise	Produz gás e produtos líquidos.	Emprego de altas temperaturas e produção de cinzas	Kummar e Wyman (2009)
Extrusão	É adequado para diversas biomassas, pode ser contínuo e é facilmente adaptável à escala industrial, além de não produzir efluentes.	Demanda elevado consumo energético e ainda está em fase de desenvolvimento.	Quilhó (2011)
Físico-químicos			
Explosão a vapor	Causa transformações na lignina e solubilização da celulose.	Degradada parcialmente a hemicelulose e gera compostos tóxicos.	Alvira et al. (2010)
Explosão com amônia	Aumenta a área superficial específica e tem baixa formação de inibidores.	Não é eficiente para materiais com altos teores de lignina.	Alvira et al. (2010)
Água líquida quente	Remoção de hemicelulose.	Longo tempo de tratamento e presença de lignina residual.	Menon e Rao (2012)
Oxidação úmida	Remoção eficiente de lignina, baixa formação de inibidores	Alto custo dispensado aos catalisadores (oxigênio e álcalis)	Alvira et al. (2010)
Pré-tratamento Químicos			
Ozonólise	Reduz o conteúdo de lignina e não produz compostos tóxicos.	Alto custo, devido ao uso de ozônio.	Alvira et al. (2010)
Organossolve	Hidrolisa lignina e hemicelulose.	Alto custo.	Alvira et al. (2010)



Tabela 2, continuação

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens	Referência
<b>Químicos</b>			
Líquidos iônicos	Dissolução da celulose.	Ainda em estudos iniciais.	Menon e Rao (2012)
Ácido	Concentrado: alta recuperação de glicose e o processo é realizado em temperatura ambiente.	Concentrado: alto custo, problemas de corrosão de reatores, necessidade de tratamento do solvente aos uso e formação de compostos inibidores.	Alvira et al. (2010)
	Diluído: baixo problema de corrosão e baixa formação de inibidores.	Diluído: baixa concentração de açúcares finais e produtos de degradação são gerados.	Alvira et al. 2010
alcalino	Remove hemicelulose e lignina e aumenta a área superficial para o ataque enzimático.	Longos tempos são necessários. Há formação de sais irrecuperáveis, que são incorporados à biomassa.	Kummar e Wyman (2009)
Biológico	Degradação da lignina e da hemicelulose com baixo consumo energético.	Taxa de hidrólise baixa.	Alvira et al. (2010)
Campo elétrico pulsado	Realizado sob condições ambientais e com equipamentos simples.	Processo precisa de mais estudos.	Kummar e Wyman (2009)

#### 2.2.4 Hidrólise (sacarificação) da celulose

A hidrólise da celulose em glicose é chamada de sacarificação e consiste na quebra das suas ligações glicosídicas, reduzindo-a aos monômeros de glicose que são, posteriormente, fermentados a etanol. Essa hidrólise pode acontecer via métodos químicos (ácidos) ou enzimáticos.

Na hidrólise química, os materiais lignocelulósicos são expostos a um reagente químico, sobretudo ácidos, por um tempo determinado e temperatura específica, resultando na formação de monômeros de açúcares oriundos dos polímeros de celulose e hemicelulose. O ácido mais citado na literatura, e utilizado industrialmente para esse tipo de hidrólise, é o ácido sulfúrico, mas outros também têm sido citados, como o ácido clorídrico (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a). A hidrólise ácida pode ser dividida em (I) hidrólise com ácido concentrado e (II) hidrólise com ácido diluído.

O método de hidrólise com ácido concentrado utiliza, normalmente, ácido sulfúrico concentrado diluído em água, em concentrações de 30% a 70% v/v (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a), para dissolver e hidrolisar os polímeros de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis.

Dos métodos químicos, a hidrólise com ácido diluído é o mais comumente aplicado. O uso de concentrações abaixo de 1% v/v de ácido acarreta na necessidade de altas temperaturas, na faixa de 180 a 230 °C, a fim de se encontrar boas taxas de hidrólise da celulose (OGEDA; PETRI, 2010). O principal inconveniente desse tratamento é a formação de compostos indesejáveis nas fases iniciais da hidrólise, como 5-hidroximetilfurural (TAHERZADEH; KARIMI, 2007a).

O mecanismo geral da hidrólise ácida da celulose está ilustrado na Figura 7. O processo é iniciado com protonação do oxigênio glicosídico, que resulta em quebra da ligação C1–O (a). Forma-se um carbocátion, que é

estabilizado pelo deslocamento do par eletrônico existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C1 (b). Na etapa (c) ocorre o ataque nucleofílico da água sobre C1, regenerando-se ácido (d, e) e assim se encerra a etapa de despolimerização. Caso essa hidrólise aconteça no interior da cadeia de celulose, gera novos terminais e, quando a reação hidrolítica acontece diretamente nos terminais, ocorre produção de glicose. A hidrólise ácida da hemicelulose é muito semelhante à da celulose. Todavia, como a hemicelulose é amorfa (em contraste com a celulose que contém regiões cristalinas), condições menos drásticas são necessárias para liberar os açúcares deste polímero (OGEDA; PETRI, 2010).

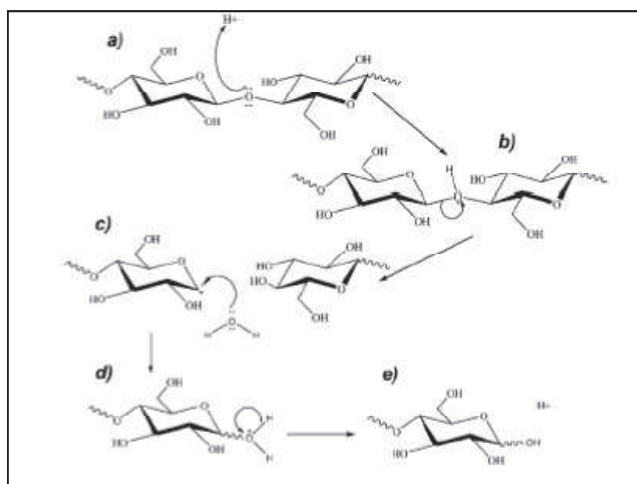


Figura 7 Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido  
Fonte: Adaptado de Daniel (1994) por Ogeda e Petri (2010)

As vantagens e as desvantagens de cada tipo de hidrólise ácida encontram-se sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 Comparação entre os métodos de hidrólise com ácido concentrado ou diluído.

Processo	Vantagens	Desvantagens
Ácido concentrado	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Opera em baixas temperaturas.</li> <li>- Alta produção de açúcar.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevado consumo de ácido.</li> <li>- Corrosão de equipamentos.</li> <li>- Alto consumo de energia para recuperar o ácido.</li> <li>- Longo tempo de duração (2 a 6 horas).</li> </ul>
Ácido diluído	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixo consumo de ácidos.</li> <li>- Curto tempo de tratamento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Opera em alta temperatura.</li> <li>- Baixa produção de açúcar.</li> <li>- Corrosão de equipamentos.</li> <li>- Formação de subprodutos indesejáveis.</li> </ul>

Fonte: Taherzadeh e Karimi (2007a)

A hidrólise enzimática da celulose presente em materiais lignocelulósicos é catalisada por enzimas celulasas. Essas enzimas fazem parte de um complexo com habilidade de hidrolisar materiais celulósicos. São biocatalisadores com alta especificidade que atuam em sinergia com o objetivo de liberar açúcares, dos quais a glicose é o de maior interesse industrial, pensando-se na obtenção de produtos de alto valor agregado, como o etanol (CASTRO, PEREIRA JR., 2010).

A principal fonte microbiológica de celulase são os fungos *Trichoderma reesei* (MENON; RAO, 2012). Entretanto, outros microrganismos são citados na literatura, tais como *Fusarium oxysporum*, *Thermoascus aurantiacus*, *Penicillium decumbens*, *Aspergillus terreus* e *Bacillus* sp., entre outros (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010).

De maneira resumida, a hidrólise da celulose envolve a adsorção da celulase em sua superfície, seguida da biodegradação desse polímero em açúcares fermentescíveis e, finalmente, a dessorção da enzima celulase (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

As enzimas do complexo celulolítico são classificadas como pertencentes à classe das hidrolases, as quais atuam na clivagem das ligações *O*-glicosídicas. São classificadas, pela *Enzyme Commission* (EC), pelo código 3.2.1.x, em que o valor de x varia com a celulase avaliada (CASTRO, PEREIRA Jr., 2010). Três tipos de celulases são requeridos na hidrólise de celulose, a fim de transformá-la em glicose: endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, que trabalham sinergeticamente para hidrolisar a celulose ao criarem novas localizações acessíveis umas as outras (QUILHÓ, 2011).

As endoglucanases (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, EC 3.2.1.4) são as enzimas do complexo celulolítico, responsáveis por iniciarem a hidrólise da celulose. Tais enzimas hidrolisam ligações internas do tipo  $\beta$ -1,4, tendo preferência por regiões amorfas (que são mais suscetíveis). A atuação desse tipo de enzima reduz o grau de polimerização do substrato, originando terminais reduzidos e não reduzidos (CASTRO, PEREIRA JR., 2010). Ao atuarem sobre a celulose, as endoglucanases proporcionam uma exposição das microfibrilas desse carboidrato, tornando-as disponíveis ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglucanases (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005).

As exoglucanases (celobiohidrolase ou exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, EC 3.2.1.91) degradam a cadeia de açúcar, removendo unidades de celobiose (dímeros de glicose) a partir das extremidades terminais da cadeia (TAHERZADEH; KARIMI, 2007b).

Dessa maneira, no mecanismo sinérgico entre as enzimas endoglucanases e exoglucanases, as endoglucanases clivam aleatoriamente as

cadeias na superfície da celulose, originando vários sítios adicionais para o ataque das celobiohidrolases, ou seja, cada hidrólise catalisada pela endoglucanase resulta em novos sítios para a ação das celobiohidrolases (OGEDA; PETRI, 2010).

As  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -glicosídeo gluco-hidrolase ou celobiase, EC 3.2.1.21) constituem o terceiro e o último grupo do complexo enzimático das celulases. Tais enzimas hidrolisam a celobiose e os oligossacarídeos solúveis (aqueles com grau de polimerização menor que 7) em glicose (CASTRO, PEREIRA Jr., 2010).

O mecanismo de ação das celulases sugerido por Arantes e Saddler (2010) está ilustrado na Figura 8. As celulases são adsorvidas na superfície insolúvel da celulose. O substrato é, então, afrouxado, a fim de aumentar a desordem molecular das regiões mais empacotadas da rede fibrosa da celulose, expondo-se as cadeias de celulose presentes no interior das miofibrilas (A). Começa a ação das endoglucanases que, em sinergismo com as exoglucanases, fragmentam as moléculas de celulose, originando oligossacarídeos solúveis (B) e celobiose (C).  $\beta$ -glicosidases realizam a quebra da celobiose em glicose (D) (ARANTES; SADDLER, 2010).

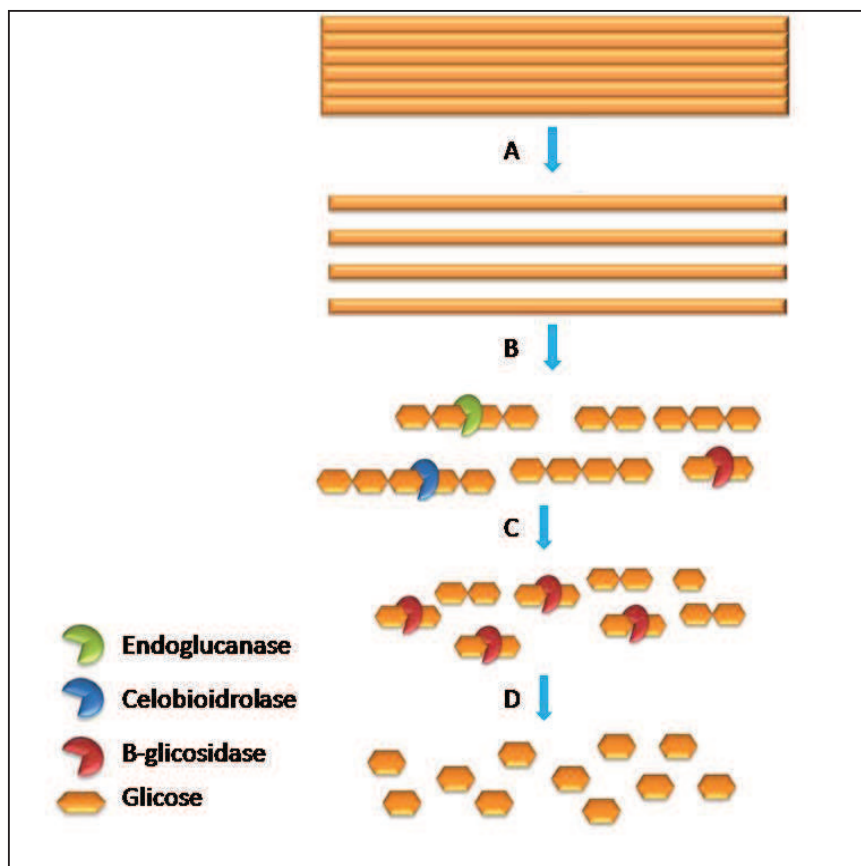


Figura 8 Mecanismo de ação das celulasas na hidrólise de celulose  
Fonte Arantes e Saddler (2010), adaptado de Coughlan (1985)

A conversão da celulose em glicose por via enzimática pode ser afetada por diversos fatores que podem ser separados em dois grupos (embora muitos estejam relacionados): (I) aqueles referentes à composição da biomassa, ou seja, os fatores relacionados ao substrato e (II) fatores relacionados à enzima (ALVIRA et al., 2010).

Entre os fatores relacionados ao substrato, como já foi discutido anteriormente, a estrutura do substrato, responsável pela acessibilidade e a

susceptibilidade ao ataque enzimático, é determinada pelo tipo e pelas condições de pré-tratamento utilizados (GARCÍA-APARÍCIO, 2007). Alvira et al. (2010) listaram os principais fatores relacionados ao substrato (biomassa lignocelulósica) que interferem na hidrólise enzimática. Entre eles estão:

- a) cristalinidade e grau de polimerização da celulose (celulases agem preferencialmente em regiões amorfas da celulose);
- b) área superficial disponível ao ataque enzimático (acessibilidade das enzimas);
- c) barreira de lignina (age como barreira física e liga-se à enzima celulase);
- d) presença de hemicelulose (a remoção de hemicelulose aumenta o tamanho dos poros e os grupos acetilados desse carboidrato se ligam à lignina, dificultando a hidrólise);
- e) porosidade – relação do tamanho do poro com o tamanho das enzimas (as celulases podem ficar presas se os poros tiverem menor área em relação a elas).

A hidrólise da hemicelulose é essencial para facilitar a degradação da celulose (GARCÍA-APARÍCIO, 2007). A hemicelulose contém uma composição mais variada, quando comparada à celulose, requerendo maior número de enzimas para degradá-la com eficiência. Essas enzimas podem ser divididas em dois grupos: as que despolimerizam e clivam a espinha dorsal e as que removem os grupos substituintes, que podem provocar o impedimento estérico à despolimerização (DYK; PLETSHEKE, 2012). Como a xilana (polímeros de xilose) é o principal componente da hemicelulose de vários materiais lignocelulósicos, a hidrólise de xilana por xilanase proporciona a degradação da hemicelulose com a produção de xilooligômeros e xilose (GARCÍA-APARÍCIO, 2007), facilitando a hidrólise catalisada pela celulase.



As enzimas que degradam o xilano são produzidas por uma grande variedade de fungos e bactérias, tais como *Aspergillus niger*, *Hemicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *T. reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *T. koningii* e *Bacillus* sp. (MENON, RAO, 2012).

Os complexos celulolíticos comercializados contêm baixos níveis de  $\beta$ -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos, sendo as enzimas celulasas inibidas, em maior medida, por celobiose e glicose. Dessa maneira, deve-se suplementar o meio com  $\beta$ -glicosidases, evitando-se a inibição pelo produto final (SUN; CHENG, 2002; ARANTES; SADDLER, 2010). O uso de outras enzimas, denominadas enzimas acessórias, como hemicelulasas, lignases e pectinases, poderia aumentar a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos (GARCÍA-APARÍCIO, 2007; DYK; PLETSHEKE, 2012), entretanto, elas tornam o processo mais oneroso.

Na Tabela 4 faz-se uma comparação entre a hidrólise ácida (com ácido diluído) e a enzimática da celulose. A hidrólise enzimática é realizada em condições mais brandas.

Tabela 4 Comparação entre a hidrólise da celulose com ácido diluído e com enzimas.

Variável em comparação	Hidrólise com ácido diluído	Hidrólise enzimática
Condições de hidrólise moderadas	Não	Sim
Rendimentos hidrolíticos elevados	Não	Sim
Produção de inibidores durante a hidrólise	Não	Sim
Formação de subprodutos inibidores	Sim	Não
Baixo custo de hidrólise	Sim	Não
Curto tempo de hidrólise	Sim	Não

Fonte: Taherzadeh e Karimi (2007b)

Com relação ao custo do processo enzimático, é importante ressaltar que as pesquisas têm se concentrado na hidrólise enzimática como a chave para a produção de etanol de segunda geração, a um custo competitivo a longo prazo (ALVIRA et al., 2010).

### **2.2.5 Processos de fermentação e hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica**

Após o pré-tratamento e a hidrólise da biomassa lignocelulósica, o passo seguinte envolve a fermentação dos açúcares presentes no hidrolisado a etanol, utilizando, normalmente, leveduras. O etanol produzido é, então, recuperado a partir do caldo de cultura por destilação (KULOYO, 2012). Entretanto, existem diferentes processos envolvendo as etapas de hidrólise e fermentação, como processos em que as etapas ocorrem separadamente, processos em que ambas as etapas ocorrem simultaneamente e, ainda, processos em que tais etapas acontecem de modo semissimultâneo. Cada um dos tipos de processos está descrito nos itens seguintes.

#### **2.2.5.1 Hidrólise e fermentação separadas (SHF)**

No processo de hidrólise e fermentação separadas, para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, elas ocorrem em dois reatores diferentes. Dessa maneira, a fração rica em celulose é primeiramente hidrolisada a glicose, que será, na sequência, fermentada a etanol. A principal vantagem desse método é que cada etapa pode ser realizada em suas condições ótimas (KULOYO, 2012). Entretanto, o acúmulo de glicose e celobiose no meio pode inibir as enzimas celulasas, utilizadas na etapa de hidrólise, acarretando baixo rendimento de sacarificação (SUN; CHENG, 2002). De acordo com Taherzadeh e Karimi (2007a), outra desvantagem do processo SHF é a possibilidade de

contaminação. Como o tempo envolvido na etapa de hidrólise é muito longo, a solução de glicídios torna-se uma fonte disponível para os microrganismos indesejados.

#### **2.2.5.2 Fermentação e hidrólise simultâneas (SSF)**

Na hidrólise e na fermentação simultâneas, as duas etapas acontecem concomitantemente, em um mesmo reator. Em contraste com o processo SHF, o risco de inibição do produto é minimizado, uma vez que os açúcares originados da atuação das celulases são simultaneamente consumidos pelo microrganismo fermentaivo para a produção a etanol. O processo SSF reduz o custo de capital (apenas um reator é necessário). O equilíbrio das reações enzimáticas é deslocado no sentido de formação de mais produto, visto que a glicose é concomitantemente consumida, além de reduzir o risco de contaminação (TOMÁS-PEJO et al., 2009 ; KULOYO, 2012).

Todavia, esse tipo de processo também apresenta desvantagens: cada etapa tem um pH ótimo e condições diferentes de temperatura. O pH ótimo para a hidrólise enzimática é em torno de 4,8 e o da fermentação varia com o tipo de microrganismo empregado (geralmente 5 ou acima). A sacarificação tem temperatura ótima por volta de 50 °C e a maioria das leveduras tem temperaturas ótimas entre 30 e 37 °C (TOMÁS-PEJO et al., 2009). Uma alternativa interessante para se contornar esse problema é o uso de leveduras termotolerantes (conforme discorrido no item seguinte).

#### **2.2.5.3 Fermentação e hidrólise semissimultâneas (SSSF)**

Historicamente, existem dois processos de produção de etanol a partir de biomassa: hidrólise e fermentação separadas (SHF) e hidrólise e fermentação

simultâneas (SSF). Entretanto, se uma pré-hidrólise é aplicada antes do início do processo SSF, em condições ótimas de atuação da celulase (50°C) e se o substrato não é removido antes de iniciar a fermentação, o processo adquire vantagens dos dois tipos (SHF e SSF). Este processo misto é denominado sacarificação e hidrólise semissimultâneas (SSSF) (TOMÁS-PEJÓ, 2009; SHEN; AGBLEVOR, 2011), que é dividido em duas fases: a pré-hidrólise, em que, inicialmente, é adicionada apenas enzima ao substrato e a mistura é incubada por um período de tempo a uma temperatura ideal para hidrólise e, posteriormente, a temperatura é abaixada e adiciona-se mais enzima e também leveduras, iniciando-se o processo de fermentação e sacarificação simultâneas.

#### **2.2.6 Uso de leveduras termotolerantes na produção de etanol**

Uma forma interessante de se controlar o impasse proveniente das diferentes faixas de temperatura necessárias aos processos de hidrólise e fermentação, para que esses passos possam ser realizados simultaneamente (SSF), seria o uso de leveduras termotolerantes, aquelas que crescem e produzem etanol eficientemente a altas temperaturas. Além do uso em processos de sacarificação e fermentação simultâneas, o uso de leveduras termotolerantes também apresenta vantagens em processos de produção de etanol, pois pode proporcionar aumento da produtividade, minimização dos riscos de contaminação e maior facilidade de recuperação do produto (remoção contínua do etanol) (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009; COSTA, 2011).

Dentre as leveduras termotolerantes, as pertencentes à espécie *Kluyveromyces marxianus* têm sido relatadas como boas produtoras de etanol, em temperaturas acima de 40 °C e crescimento até 47 °C (FONSECA et al., 2008). De acordo com Ballesteros et al. (2004), um processo SSF com leveduras *Kluyveromyces marxianus* é, normalmente, realizado a 42 °C, com um tamanho

de inóculo no intervalo 0,3 a 1,2 g/L, concentração do substrato variando de 5% a 10% (p/v) e carga enzimática de 15 FPU/g celulose.

### **2.2.7 A levedura *Kluyveromyces marxianus* e suas aplicações biotecnológicas**

*Kluyveromyces marxianus* (Figura 9) é um microrganismo unicelular, nucleado, sem motilidade, homotático, pertencente à subclasse dos hemiascomicetos (LANE; MORRISSEY, 2010). Foi descrito, pela primeira vez, em 1888, por E. C. Hansen e foi chamado, na época, de *Saccharomyces marxianus*, em atribuição ao nome Marx, que o isolou, primeiramente, a partir de uvas (FONSECA et al. 2008). Devido às diferenças da morfologia dos esporos e dos ascos na capacidade de oxidação e fermentação de diferentes açúcares e na ocorrência de hibridação entre cepas, em comparação às leveduras *Saccharomyces* verdadeiras, houve necessidade de realizar a sua reclassificação taxonômica (FONSECA et al., 2008). Na edição de 1998 do livro “As leveduras, um estudo taxonômico” (KURTZMAN; FELL, 1998), no capítulo referente ao gênero *Kluyveromyces*, estão incluídas 15 espécies (FONSECA et al., 2008), dentre as quais as mais citadas na literatura são *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* e a capacidade comum a ambas é a assimilação de lactose como fonte de carbono.

*Kluyveromyces marxianus*, assim como a *Saccharomyces cerevisiae*, é uma levedura respiro-fermentativo (aeróbia facultativa) e pode obter energia tanto pelo ciclo do ácido tricarboxílico (fosforilação oxidativa) como por fermentação etanólica. No caso de *Saccharomyces cerevisiae*, quando a concentração de açúcar é alta, a reação segue o sentido da fermentação, o que significa que a célula dirige, preferencialmente, piruvato para a produção de etanol, mesmo obtendo menor rendimento energético. Este fenômeno é chamado de efeito Crabtree e oferece vantagens a alguns nichos ecológicos. A levedura

*Kluyveromyces marxianus* é, geralmente, classificada como Crabtree negativa e direciona o metabolismo preferencialmente para o ciclo do ácido tricarbóxico e a geração ótima de energia. Entretanto, é capaz de realizar, simultaneamente, fermentação e respiração e o equilíbrio exato entre essas duas vias é específico de cada cepa. Esse efeito é caracterizado pela fermentação alcoólica em aerobiose em elevadas concentrações de carboidratos ou cultivos com alta taxa de crescimento. A intensidade desse efeito varia dentro da espécie, o que explica a razão de algumas cepas, mas não todas, serem boas produtoras de etanol (LANE; MORRISSEY, 2010).

Essa levedura tem sido amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas, por apresentar algumas vantagens, tais como habilidade em crescer sobre ampla variedade de substratos e termotolerância (capacidade de crescimento de até 52 ° C), capacidade de assimilação de açúcares essenciais, como a lactose e a inulina, taxa de crescimento extremamente rápido, com tempos de geração típicos de 70 minutos e alta capacidade secretória (FONSECA et al., 2008; LANE; MORRISSEY, 2010).

Muitas aplicações biotecnológicas têm sido investigadas para essa levedura, como produção de enzimas ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase e poligalacturonases, entre outros), de proteína para alimentação animal ou humana, de compostos de aroma e de etanol (incluindo processos SSF a temperaturas superiores a 37 °C), redução do teor de lactose em alimentos, produção de bioingredientes de soro de queijo, biorremediação, como um agente anticolesterolêmico e como um vetor para a produção de proteína heteróloga (FONSECA et al., 2008; COSTA, 2011). Existem poucas restrições à sua utilização e a sua longa história de associação segura com produtos alimentícios está resultando na sua classificação “geralmente considerado como seguro”, ou GRAS e “presunção qualificada de segurança”, ou QPS, o que tem aumentado

ainda mais seu uso em diferentes processos (LANE; MORRISSEY, 2010; KULOYO, 2012).

### 2.2.7.1 Produção de enzimas pectinases

*Kluyveromyces marxianus* tem a habilidade natural de secretar enzimas. Esta é uma propriedade desejada para produzir enzimas com baixos custos (FONSECA et al., 2008). Foram reportadas diferentes enzimas produzidas por esse microrganismo, como inulinasas,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -xilosidase e celulase.

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pectínicas, pertencentes à família das polissacaridasas. São amplamente distribuídas em plantas superiores, onde atuam modificando as substâncias pectínicas durante os processos naturais de amadurecimento de algumas frutas. Além de serem produzidas por plantas, também são produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras (UENOJO; PASTORE, 2007), insetos e nematódeos (SEMENOVA, 2003). Jayani, Saxena e Gupta (2005) classificaram as pectinases em três grupos: (I) protopectinases: degradam a protopectina, originando polímeros de pectina altamente solúveis; (II) pectinametilesterase (desesterificante ou desmetoxilante): catalisa a desesterificação da pectina pela remoção dos grupos metoxila, originando ácido pectico e metanol e (III) despolimerizantes (hidrolases e liases): realizam a clivagem das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, responsáveis por unir os ácidos galacturônicos nas substâncias pectínicas.

Existem casos em que apenas um tipo de enzima pectinolítica é necessário, como, por exemplo, para a estabilização de suco de laranja. A enzima poligalacturonase pura é pretendida quando se pretende manter o carácter encorpado dos sucos, reduzindo-se o tamanho da cadeia de pectina, sem

reduzir a esterificação (BARNBY, 1987). Schwan e Rose (1994) verificaram que duas estirpes de *K. marxianus*, isoladas da fermentação do cacau, eram capazes de produzir a enzima endopoligalacturonase.

#### **2.2.7.2 Produção de etanol**

As leveduras *Kluyveromyces marxianus* têm se destacado na produção de etanol, sendo a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura relacionados à produção desse álcool a partir de soro de leite (pois essas leveduras possuem as enzimas necessárias à conversão da lactose em etanol) e de materiais lignocelulósicos (principalmente por serem termotolerantes).

Têm também recebido bastante destaque na produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos, principalmente no processo de sacarificação (transformação de açúcares não fermentescíveis em fermentescíveis, normalmente realizada por enzimas) e fermentação (transformação de açúcar em etanol) simultâneo, em que os dois processos ocorrem em uma única etapa. A sacarificação enzimática exige uma temperatura em torno de 50 °C e a maioria das leveduras fermentativas tem temperatura ideal entre 30 e 37 °C (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009). Dessa forma, é extremamente vantajoso o uso de *Kluyveromyces marxianus*, que é capaz de crescer e fermentar, com bons rendimentos, em temperaturas acima de 40 °C (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009).

Costa (2011), estudando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, concluíram que *S. cerevisiae* é mais tolerante ao etanol, enquanto as linhagens de *K. marxianus* são mais termotolerantes. Entretanto, o pré-tratamento da levedura *K. marxianus* com etanol, almejando sua adaptação a essa substância, tem sido amplamente estudado.



Tomás-Pejó et al. (2009) estudaram os efeitos das celulasas comerciais no crescimento e na produção de etanol de *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, quando essa levedura foi utilizada em processos de sacarificação e fermentação simultâneas. Testes preliminares realizados em glicose ( $50 \text{ g. L}^{-1}$ ) demonstraram que altas quantidades da enzima ( $2,5\text{-}3,5 \text{ FPU/mL}$ ) poderiam causar um efeito negativo sobre a taxa de crescimento de *K. marxianus* e no número de células viáveis, mas a produção de etanol não foi afetada e cerca de 86% do máximo teórico ( $22 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram alcançados em todos os casos, independentemente da dosagem de enzimas. Em experimentos de SSF, a produção de etanol também não foi afetada pela quantidade de celulase.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi a escolhida para o trabalho, em virtude da pouca disponibilidade de dados referentes à produção de etanol a partir desse microrganismo, utilizando biomassa lignocelulósica. Costa (2011) investigou a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em processos de sacarificação e fermentação simultâneas de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento ácido/básico, obtendo  $21,48 \text{ g de etanol.L}^{-1}$  e  $13,30 \text{ g de etanol.L}^{-1}$ , em temperaturas de fermentação de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, indicando a primeira como a ideal para a produção de etanol por essa levedura.

### **2.3 Obtenção de etanol a partir de resíduos de café**

Estudos recentes indicam um excelente potencial para a utilização de resíduos de café na produção de etanol.

Gouvea et al. (2009) avaliaram a produção de etanol a partir da casca de café inteira, moída e do extrato aquoso da casca de café, utilizando, como microrganismo fermentativo, *Saccharomyces cerevisiae* (os meios foram compostos por  $13 \text{ g de substrato/100 mL de água}$ ). Os autores apontaram a

casca de café inteira como melhor substrato para a produção de etanol, tendo, com a concentração de 3 g de levedura/L e temperatura 30 °C, proporcionado a produção de 13,6 g de etanol.L<sup>-1</sup>.

Shenoy et al. (2011) utilizaram polpa de café seca e úmida na obtenção de etanol, utilizando hidrólise ácida a quente (ácido sulfúrico a 2% v/v, temperatura de 120 °C, por 10 minutos, em autoclave, seguida de aquecimento, a 90 °C, por 90 minutos, à pressão ambiente), originando filtrados com teores de açúcares redutores de 0,71 e 0,23 g/100 mL de hidrolisado, para polpa seca e úmida, respectivamente, que, após neutralização, serviram de meio de cultura para a *Saccharomyces cerevisiae* produzir, ao final de 48 horas de fermentação, 0,48 g de etanol/g de açúcar, para ambos os materiais (polpa seca e úmida). Tais autores ressaltam que a produção de etanol a partir desses resíduos, além de diminuir a poluição oriunda do descarte, pode agregar créditos de carbono ao país, por ser uma fonte renovável de energia, caso seja empregado como combustível.

Como se observa nos relatos feitos até aqui, os trabalhos utilizando resíduos de café são muito recentes e utilizam (em quase sua totalidade) pré-tratamentos ácidos e, como agente de fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Menezes (2012), cujas diversas etapas do trabalho foram realizadas concomitantemente às etapas da presente pesquisa, utilizou polpa de café pré-tratada com NaOH 4% m/v, por 25 minutos, a 121 °C, em autoclave e hidrolisada enzimaticamente (celulases e celobiasas), na produção de etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, obtendo, após 24 horas de fermentação, 25,63 g etanol.L<sup>-1</sup>.

Mussato et al. (2012) variaram o tipo de microrganismo empregado. Eles investigaram a produção de etanol por três diferentes cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces fragilis*), utilizando

película prateada ou borra de café, pré-tratadas com ácido sulfúrico, a 163-170 °C, por 45 minutos. Os resultados mais satisfatórios, em termos da produção de etanol, foram obtidos ao utilizarem a borra de café (que continha maior teor de açúcar em relação à película prateada) e *S. cerevisiae* (11,7 g.L<sup>-1</sup>), seguida da fermentação com *P. stipitis*, que produziu concentrações de etanol semelhantes às de *S. cerevisiae*, mas necessitou de maior tempo para atingi-la. A produção de etanol por *K. fragilis* foi baixa, durante todo o tempo de fermentação (na faixa de 1g de etanol.L<sup>-1</sup>).

Não foram encontrados, na literatura, dados sobre a produção de etanol utilizando resíduos de café e, como agente fermentativo, a levedura da espécie *Kluyveromyces marxianus*, o que enaltece a pesquisa realizada neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 6, p. 675–685, Nov./Dec. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. 2011. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=57890>>. Acesso em: 9 jul. 2012.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, July 2010.

ANDRADE, J. M. F.; DINIZ, K. M. **Impactos ambientais da agroindústria de cana-de açúcar**: subsídios para a gestão. 2007. 187 f. Monografia (Especialização em Gerenciamento Ambiental)-Universidade Federal de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, Athens, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.

ARO, N. N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 551–573, Oct. 2008.

BALLESTEROS, M. et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with

*Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 39, p. 1843–1848, 2004.

BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros Bromatológicos da casca e polpa desidratada de café em diferentes períodos. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, jul./ago. 2002.

BARNBY, F. M. **An investigation of the pectinolytic system of *Kluyveromyces marxianus***. 1987. PhD Thesis. University of Reading, United Kingdom, 1987.

BRESSANI, R. Potencial uses coffee-berry-by-products In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Coffee Pulp: composition, technology and utilization**. Ottawa: International Development Research Centre, 1978. p. 17–24. (Publication 108e). Disponível em: < <http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/6006/1/34042.pdf> >. Acesso em: 10 dez. 2012.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café- safra 2012: quarta estimativa, dezembro/2012**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 4 jan. 2013.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

DYK, J. S. van.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-- factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, Nov. 2012.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, p. 488–495, 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York : Waster & Grugter, 1984. 613 p.

FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339–354, June 2008.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 46, p. 70-78, Nov. 2012.

GARCÍA-APARICIO, M. P. et al. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 136–140, n. 1-12, p. 353-365, Apr. 2007.

GOUVEA, B. M. et al. Feasibility of ethanol production from coffee husks. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, n. 9, p. 1315–1319, Sept. 2009.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, v. 13, n. 2-3, p. 125–135, Mar. 1994.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 1, p. 10–18, Jan. 2009.

JAY, J. C.; GOVINDA, R. T. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12. p. 3541-3549, Dec. 2011.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, Sept. 2005.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulosic into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KARUNANITHY, C.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J. L. Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. **Annual International Meeting**, St. Joseph, June/July 2008.

KULOYO, O. O. **Ethanol production by yeast fermentation of an *Opuntia ficus-indica* biomass hydrolysate**. 2012. 174 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos)-University of the Free State, Bloemfontein, 2012.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4203–4213, Sept. 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. 4<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, 2010.

LEHNINGER, A. L. et al. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. xxviii, 1202 p.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 3.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 739, Sept. 2002.

MALTA, M. R. **Colheita e processamento do café**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2010. 3 p. (Circular Técnica, 92).

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158p. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química)-Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MATIELLO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991. 320 p. (Coleção do Agricultor. Grãos).

MEJÍA, C. C.; GUTIÉRREZ, A.J.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, n. 3, p. 189-202, May 2012.

MENEZES, E. G. T. **Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café**. 2012. 236 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 522-550, Aug. 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 3, p. 673–686, Apr. 2005.



MOUCO, J. T. **Mudanças climáticas de biocombustíveis: a experiência brasileira do etanol como recurso energético alternativo**. 2011. 134 p. Dissertação (Mestrado em Relações Internacionais)-Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

MUSSATO, S. I. et al. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. **Applied Energy**, London, v. 92, p. 763–768, 2012.

NLEWEM, K. C.; THARASH Jr., M. E. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 14, p. 5426–5430, July 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1-10, 2010.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PEDERSEN, A.; MEYER, A. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, Barcelona, v. 27, n. 6, p. 740-748, Dec. 2010.

PELCZAR, JR. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.

PIMENTA, C. J. **Qualidade de café**. Lavras: Editora UFLA, 2003. 304 p.

PRATA, E. R. B. A.; OLIVEIRA, L. S. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. **LWT: food science and technology**, v. 40, n. 9, p. 1555–1560, Nov. 2007.

QUILHÓ, L. F. T. L. **Produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos de sorgo sacarino**: revisão bibliográfica. 88 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia)-Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, Nov./Dec. 2003.

SAENGER, M. et al. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 103-121, May 2001.

SEMENOVA, M. V. et al. Isolation and Properties of Pectinases from the Fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry**, Moscow, v. 68, n. 5, p. 559-569, May 2003.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyeromyces marxianus*: Effect of medium composition. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Jan. 1994.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 1, p. 33-34, Jan. 2011.

SHENOY, D. et al. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 4107-4111, Oct. 2011.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SOARES, M. et al. Fruit flavor production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 35, p. 857-861, 2000.

SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, Essex, v. 2, n. 3, p.472-499, 2007a.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, Essex, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007b.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Oxford: Butterworth-Heimann, 1998.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, London, v. 88, n. 11, p. 2142–2147, Nov. 2009.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2 **Biotechnology Advances**, p. 388-394, 2007.

ULLOA-ROJAS, J. B. et al. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 195–204, Aug. 2002.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, May 2011.

XU, J.; CHENG, J. J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 4, p. 3861–3868, Feb. 2011.

XU, J. et al. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 8, 2900–2903, Apr. 2010.

## CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FASE LÍQUIDA DA POLPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR *Kluyveromyces marxianus* CCT4086

### RESUMO

O café é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. O processamento por via úmida, além de originar uma bebida de boa qualidade, gera grande quantidade de resíduo sólido, conhecido como polpa de café. Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar diferentes formas de obtenção da fase líquida da polpa de café e o seu uso como diluente de caldo e de melaço de cana-de-açúcar, visando à produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, bem como estudar a produção de poligalacturonase por essa levedura em meios contendo fase líquida da polpa de café, em experimento independente ao da produção de etanol. Foram testadas quatro formas de obtenção da fase líquida da polpa de café: prensagem, trituração e prensagem, aquecimento a 60 °C, com posterior trituração e prensagem e aquecimento a 121 °C, seguidos de trituração e prensagem. Escolhida a forma de extração, analisando-se a composição, procedeu-se à fermentação por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em cinco tipos de meio de cultura, contendo as seguintes fontes de carboidrato: caldo de cana diluído com água destilada (F1), caldo de cana diluído com fase líquida da polpa de café (F2), melaço de cana diluído com água destilada (F3), melaço de cana diluído com fase líquida da polpa de café (F4) e fase líquida da polpa de café (F5). Avaliaram-se o consumo de açúcares redutores totais, a variação do pH, a concentração de etanol, as células totais, a viabilidade celular e os ácidos orgânicos. O processo de trituração e prensagem sem aquecimento foi escolhido por originar uma fase líquida da polpa de café com boa concentração de açúcares redutores totais e baixa concentração de polifenóis. Ao final das fermentações, foram observadas as seguintes concentrações de etanol de 37,18; 38,59; 27,51; 26,80 e 9,80 g.L<sup>-1</sup>, para F1, F2, F3, F4 e F5, respectivamente. Os meios com adição de fase líquida da polpa de café não apresentaram diferenças quanto aos parâmetros analisados, quando comparados aos que não continham esse componente. Os resultados evidenciaram que a fase líquida da polpa de café não influenciou a obtenção de etanol por *Kluyveromyces marxianus*, podendo ser utilizado como diluente em meios de cultura destinados a essa finalidade. Com relação à utilização para a produção de poligalacturonase, obtiveram-se elevadas concentrações dessa enzima ao se utilizar 80 mL/100 mL desse resíduo na composição do meio de

cultura, apontando mais uma aplicação biotecnológica da fase líquida da polpa de café.

Palavras-chave: Etanol. Fase líquida da polpa de café. *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

## ABSTRACT

Coffee is one of the main agricultural products from Brazil. The wet processing of coffee, gives a good quality drink and generates large amounts of solid waste, known as coffee pulp. The objective of this study was to evaluate different ways of obtaining the liquid phase of the coffee pulp and its use as broth and sugar cane molasses diluent from, for the production of ethanol by *Kluyvermyces marxianus* CCT 4086, as well as studying polygalacturonase production by this yeast by media containing liquid phase coffee pulp, in an independent experiment for ethanol production. We tested four ways of obtaining the coffee pulp liquid phase: pressing, trituration and pressing, heating at 60° C with subsequent trituration and pressing and heating at 121° C followed by trituration and pressing. Having chosen the extraction form and analyzing the composition, we proceeded to the fermentation by *Kluyvermyces marxianus* CCT 4086 in 5 types of culture medium containing the following carbohydrate sources: sugarcane juice diluted with distilled water (F1), sugarcane juice diluted with the liquid phase of coffee pulp (F2), cane molasses diluted with distilled water (F3), cane molasses diluted with the liquid phase of the coffee pulp (F4) and the liquid phase of coffee pulp (F5). We evaluated the consumption of total reducing sugars, variation of pH, ethanol concentration, total cells, cell viability and organic acids. The trituration process of grinding and pressing without heating was chosen for originating a coffee pulp liquid phase with good concentration of total reducing sugars and low concentrations of polyphenols. At the end of fermentation we observed the following ethanol concentrations of 37.18, 38.59, 27.51, 26.80 and 9.80 gL<sup>-1</sup> for F1, F2, F3, F4 and F5, respectively. Media with added coffee pulp liquid phase showed no differences in the analyzed parameters when compared to those not containing this component. The results showed that the liquid phase of the coffee pulp did not affect the production of ethanol by *Kluyvermyces marxianus*, and may be used as diluent in culture media for this purpose. Regarding the use of the coffee pulp liquid phase for polygalacturonase production, we obtained high concentrations of this enzyme when using 80 mL/100 mL of residue in the composition of the culture medium, indicating a further biotechnological application of the coffee pulp liquid phase.

Keywords: Ethanol. Liquid phase of coffee pulp. *Kluyvermyces marxianus* CCT 4086.

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um alimento de importância mundialmente reconhecida, sendo um dos produtos agrícolas mais importantes do Brasil, responsável por proporcionar grande retorno econômico, em virtude das exportações, da industrialização e dos empregos gerados em toda a sua cadeia produtiva.

O Brasil destaca-se por ser o maior produtor de café e, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), continua aumentando o consumo interno desse produto. No período compreendido entre novembro de 2010 e outubro de 2011, foi registrado o consumo de 19,72 milhões de sacas, representando um acréscimo de 3,11% em relação ao período anterior (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, ABIC, 2011).

A obtenção de uma boa bebida requer adequado procedimento pós-colheita, sendo este capaz de agregar alto valor ao produto e atuar na melhoria de sua qualidade. O beneficiamento do café pode ser feito por via seca ou úmida. No processamento por via seca, o café é lavado e submetido a um processo de secagem e o fruto é processado integralmente. Quando processados por via úmida, os frutos do cafeeiro podem originar os cafés descascados, despulpados ou desmucilados. Na obtenção do café cereja descascado, os frutos são descascados por processos mecânicos e parte da mucilagem ainda permanece aderida ao pergaminho dos frutos. Na obtenção do café despulpado, após o descascamento, a parte da mucilagem que ainda estava aderida aos frutos é removida, em tanques de fermentação biológica. Se a remoção desta mucilagem remanescente for realizada mecanicamente, tem-se, então, o café desmucilado (MALTA, 2010).

O principal subproduto gerado pelos processamentos por via úmida é a polpa de café, um material com elevado potencial poluidor, em virtude de sua rica composição em matéria orgânica e inorgânica, contendo certa quantidade de



cafeína e taninos, o que a torna tóxica à natureza (PANDEY et al., 2000), exigindo adequada disposição final.

Novos olhares estão sendo lançados para a utilização da polpa de café, almejando-se, sobretudo, a obtenção produtos com alto valor agregado e a minimização dos impactos ambientais decorrentes do lançamento desses rejeitos aos recursos naturais, sem tratamento adequado. São relatados diversos usos e aplicações biotecnológicas da polpa de café, tais com compostagem, uso em rações animais, produção de fertilizantes orgânicos, proteína unicelular, biogás, cogumelos comestíveis, enzimas, ácidos orgânicos, compostos de sabor e aroma (PANDEY et al., 2000).

Uma maneira interessante de agregar valor à polpa de café e diminuir a poluição ambiental oriunda do seu descarte seria o seu emprego na produção de etanol, haja vista sua farta composição em carboidratos, tanto na fração líquida quanto na fração fibrosa. Os altos custos do petróleo, as mudanças climáticas e as necessidades estratégicas de produção de energia estimulam a busca por combustíveis alternativos provenientes de fontes renováveis (COSTA, 2011). Além disso, a utilização de resíduos agrícolas para a obtenção de etanol não compete com a produção de alimentos, como acontece com a cultura de cana-de-açúcar.

As leveduras da espécie *Kluyveromyces marxianus* têm sido amplamente utilizadas na obtenção de etanol a partir de resíduos da indústria de alimentos, tanto líquidos, como o soro de leite e extrato de açúcar de beterraba quanto sólidos, como bagaço de cana-de-açúcar, pelo fato de esse microrganismo possuir características importantes, como alta conversão do substrato em biomassa e ampla faixa de temperatura na qual pode crescer. Além disso, esse microrganismo têm sido estudado para produção de compostos de aroma e de proteína unicelular, produção de enzimas inulinase, pectinase,  $\beta$ -galactosidase, entre outras (BELLAVAR et al.; 2004).

Portanto, a presente pesquisa foi realizada com os objetivos de avaliar diferentes formas de obtenção da fase líquida da polpa de café e o seu emprego como diluente de melaço e de caldo de cana-de-açúcar, visando à produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, bem como estudar a produção de poligalacturonase por essa levedura, em meios contendo fase líquida da polpa de café, em experimento independente ao da produção de etanol.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima e obtenção da fase líquida da polpa de café

A polpa de café cereja (*Coffea arabica* L.) fresca, oriunda do beneficiamento por via úmida, foi cedida por produtores da região rural de Lavras, MG. As amostras, logo após o descascamento, foram colocadas em saco plástico e transportadas para o Laboratório Central de Análises, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram congeladas e armazenadas, em freezer, a  $-5\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

A fim de se aproveitar o potencial nutritivo da polpa de café em um meio líquido para a fermentação, foram estudados quatro processos de extração dos componentes solúveis da polpa de café. Para tanto, cerca de 8 kg de polpa de café foram descongelados, homogeneizados aos líquidos exsudados durante o descongelamento e separados em quatro partes iguais.

Os processos de extração empregados foram:

- a) extração 1 (E1) – tratamento Controle: 2 kg de polpa de café foram prensados em prensa manual;
- b) extração 2 (E2) – tratamento mecânico à temperatura ambiente: 2 kg de polpa de café foram triturados em liquidificador industrial;
- c) extração 3 (E3) – tratamento termomecânico com aquecimento em banho-maria: 2 kg de polpa de café aquecidos em banho-maria, a  $60^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos e, em seguida, foram triturados em liquidificador industrial;
- d) extração 4 (E4) – tratamento termomecânico com aquecimento em autoclave: 4 erlenmeyes de 1 L contendo 500 g de polpa de café cada, foram autoclavados, a  $121^{\circ}\text{C}$ , por 15 minutos e, em seguida, foram triturados em liquidificador industrial.

Em cada processo de extração, a parte líquida resultante da trituração em liquidificador foi separada por filtração em organza e a parte sólida foi prensada em prensa manual. Os líquidos resultantes da filtração e da prensagem, de cada processo extrativo, foram misturados e congelados até o momento das análises. Esses líquidos foram denominados fases líquidas da polpa de café.

### **2.1.1 Análises da polpa de café e de suas fases líquidas**

A polpa de café e suas fases líquidas foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros:

- a) amido: foi determinado pela técnica de Somogyi adaptada por Nelson (1944). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 510 nm, com sistema computadorizado. Os resultados foram expressos em porcentagem (g de amido/100 g de polpa de café ou de fase líquida);
- b) açúcares totais e redutores: foram extraídos pela metodologia proposta por Lane-Enyon, citada pela Association of Official Agricultural Chemists, AOAC (1990) e dosados pela técnica de Somogyi adaptada por Nelson (1944). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 510 nm, com sistema computadorizado. Os resultados foram expressos em porcentagem (g de açúcar/100 g de polpa de café ou de fase líquida);
- c) pectina total e solúvel: foram extraídas segundo a técnica padronizada por McCready e McComb (1952) e o doseamento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Bitter e Muir (1962). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 530 nm, com sistema computadorizado. Os resultados foram expressos em mg de ácido poligalacturônico/100 g de polpa de café ou de fase líquida;
- d) polifenóis: os polifenóis foram extraídos e dosados segundo a técnica de Goldstein e Swain (1963), com algumas modificações. Foram feitas três

extrações sucessivas em metanol 80%. Para a determinação, foi utilizada a metodologia de Folin-Denis, conforme a AOAC (1990). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 760 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (g de polifenóis/100 g de polpa de café ou de fase líquida);

e) pH: o potencial hidrogeniônico foi determinado por potenciômetro digital, modelo QUIMIS, tipo Q-400 A.

### **2.1.2 Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas em cinco repetições. Os dados referentes à polpa de café e às suas fases líquidas foram submetidos à análise de variância, por meio do programa SISVAR 5.1<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011). Para comparação de médias entre os diferentes tratamentos (polpa, E1, E2, E3 e E4), foi utilizado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## **2.2 Obtenção do etanol por fermentação da fase líquida da polpa de café**

Após ter sido selecionado o método mais viável de extração da polpa de café, procedeu-se ao processo fermentativo, utilizando-se a fase líquida da polpa pura ou como diluente do melaço de cana-de-açúcar ou do caldo de cana-de-açúcar.

### **2.2.1 Microrganismo utilizado e preparo do inóculo para fermentação**

Para os experimentos de fermentação foi utilizado o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, pertencente à Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello, armazenado sob a forma liofilizada.

A reativação da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi realizada suspendendo-se as células por meio da adição de 0,2 mL de água destilada a cerca de 0,05 g da cultura liofilizada, contidos em uma ampola, deixando-se reidratar por 15 minutos. Após a etapa de reidratação, transferiu-se o conteúdo da ampola para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de meio de cultura YM (extrato de levedura-extrato de malte), sendo essa etapa seguida por incubação à temperatura de 28 °C, em incubadora *biochemistry oxygen demand* (BOD), por 48 horas. O microrganismo foi repicado para tubos de ensaio contendo meio de cultura YMA (extrato de levedura - extrato de malte - ágar) inclinado, os quais foram incubados, à temperatura de 28 °C, em incubadora BOD, por 48 horas. As colônias foram cobertas com óleo mineral esterilizado e armazenadas em geladeira (temperatura média de 4 °C), até o momento do uso, não excedendo o período de um mês de armazenamento. Todas as etapas descritas foram seguidas em concordância com o manual elaborado pela Fundação André Tosello.

Os microrganismos armazenados foram transferidos para 3 erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura YM, utilizando uma alça de platina. Após a repicagem, os erlenmeyers foram incubados em BOD, à temperatura de 28 °C, por 48 horas. Após o período de incubação, atingiu-se uma população de  $10^8$  células viáveis. mL<sup>-1</sup>, originando o inóculo utilizado no processo fermentativo subsequente.

### **2.2.2 Meios de fermentação**

Após a seleção do processo de extração, a fase líquida da polpa de café foi utilizada como meio de fermentação, na sua forma pura ou como diluente de melação ou de caldo de cana-de-açúcar.

O caldo de cana-de-açúcar foi adquirido de produtores rurais da cidade de Lavras, MG e o melaço de cana-de-açúcar utilizado foi gentilmente cedido pela Usina Luciania, de Lagoa da Prata, MG. O caldo utilizado apresentou 21 °Brix de sólidos solúveis totais, pH de 4,8 e 205 g de açúcares redutores totais/L de caldo de cana-de-açúcar, e o melaço de cana-de-açúcar apresentou 70 °Brix de sólidos solúveis totais, pH de 5,2 e 689 g de açúcares redutores totais/L de melaço.

Para o estudo da produção de etanol foram elaborados cinco tipos de meio de fermentação, conforme descrito a seguir:

- a) meio de fermentação 1 (F1): preparado com caldo de cana-de-açúcar diluído com água destilada, a um teor de sólidos solúveis totais de 18 °Brix, com volume final de 700 mL de meio;
- b) meio de fermentação 2 (F2): preparado com caldo de cana-de-açúcar diluído com fase líquida da polpa de café, a um teor de sólidos solúveis totais de 18 °Brix, com volume final de 700 mL de meio;
- c) meio de fermentação 3 (F3): preparado com melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada, a um teor de sólidos solúveis totais de 18 °Brix, com volume final de 700 mL de meio;
- d) meio de fermentação 4 (F4): preparado com melaço de cana-de-açúcar diluído com fase líquida da polpa de café, a um teor de sólidos solúveis totais de 18 °Brix, com volume final de 700 mL de meio;
- e) meio de fermentação 5 (F5): preparado com 700 mL fase líquida da polpa de café, com teor de sólidos solúveis totais de 5 °Brix.

Na Tabela 1 é possível observar as quantidades de cada componente (caldo ou melaço-de cana de açúcar) e dos diluentes (fase líquida da polpa de café ou água destilada) utilizados nos meios.

Tabela 1 Composição dos meios quanto ao volume da fonte de carboidrato e do diluente necessários para atingir 18 °Brix\*.

Tratamento	Caldo de cana (mL)	Melaço de cana (mL)	Água destilada (mL)	Fase líquida da polpa (mL)
F1	600	-	100	-
F2	560	-	-	140
F3	-	180	520	-
F4	-	131,25	-	568,75
F5	-	-	-	700

\* Com exceção do meio F5, em que foi utilizado o teor de sólidos solúveis da fase líquida da polpa de café (5 °Brix), sem adição de outra fonte de carboidratos.

Todos os meios de fermentação foram suplementados com sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), fosfato dibásico de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ), de acordo com Tomas-Pejó et al. (2009) e esterilizados em autoclave, a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos.

### 2.2.3 Processos fermentativos

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 1 L, contendo 700 mL de cada meio de cultura descrito no item 2.2.2, com três repetições de cada meio, utilizando a proporção de inóculo de 10% (v/v), em incubadora regulada à temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , sem agitação.

O estudo cinético do processo fermentativo com base no consumo de açúcares redutores totais dos meios contendo caldo de cana-de-açúcar (F1 e F2) foi realizado por um período total de 72 horas (LIMTONG; SRINGIEW; YONGMANITICHAI, 2007), com amostragens nos tempos 0, 6, 12, 18, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 e 72 horas. Para os meios contendo melaço de cana-de-açúcar (F3 e F4), o período total de fermentação foi de 120 horas (com base no



acompanhamento da concentração de sólidos solúveis) e as amostragens ocorreram nos tempos de 0, 12, 24, 30, 48, 54, 60, 72, 96 e 120 horas. No meio controle (F5), contendo apenas fase líquida da polpa de café, o estudo cinético procedeu-se por 60 horas, com amostragens nos tempos 0, 6, 12, 36, 48 e 60 horas. A adoção de diferentes tempos de fermentação aconteceu em virtude da observação do consumo de açúcar que, no caso dos meios contendo melaço, foi mais lento.

Foram analisados os seguintes parâmetros: açúcares redutores totais, pH e ácidos orgânicos, contagem de células em câmara de Neubauer, contagem total de unidades formadoras de colônias em placa e concentração de etanol.

### **2.2.3.1 Açúcares redutores totais (ART)**

Os açúcares redutores totais foram quantificados pela metodologia de DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico), desenvolvida por Miller (1959). As amostras retiradas de cada tempo de fermentação foram diluídas. Os resultados foram expressos em g de açúcares redutores totais.L<sup>-1</sup>.

### **2.2.3.2 Potencial hidrogeniônico e ácidos orgânicos**

O potencial hidrogeniônico foi determinado por potenciômetro digital, modelo QUIMIS, tipo Q-400 A.

As concentrações de ácidos orgânicos nos meios fermentativos foram mensuradas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio de um cromatógrafo da marca Shimadzu<sup>®</sup>. Para tanto, os meios fermentativos foram centrifugados e diluídos em água milliQ<sup>®</sup> (na proporção de 1: 2 – meio : água). Após diluição, as amostras foram filtradas em membrana Millipore (45µm). O volume injetado da amostra foi de 20 µL. A separação dos analitos

foi realizada utilizando, como fase estacionária, duas colunas em série (SHIM-PAK SPR-H, 250 mm x 7,8 mm), precedidas de uma pré-coluna (SHIM-PAK SPR-HG, 50 mm x 7,8 mm) e, como fase móvel, as soluções: (A) ácido p-tolueno sulfônico (4mM) e (B) tampão (composto por 16mM Bis-Tris, 4mM ácido p-tolueno sulfônico e 100µM EDTA), em um fluxo de 0,8 mL/min e temperatura de 45 °C. Utilizou-se um detector condutividade (Shimadzu®, modelo CDD-6A), com polaridade positiva e resposta baixa. Os picos correspondentes a cada ácido foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção dos padrões. Para a quantificação dos teores de ácidos orgânicos nas amostras, foi realizada uma calibração com base em padrões externos dos ácidos cítrico, málico, tartárico, oxálico, succínico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico e butírico (padrão analítico da Sigma Aldrich®).

### **2.2.3.3 Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer e contagem total das unidades formadoras de colônias em placa**

A contagem e a viabilidade de células em câmara de Neubauer foram realizadas, no início e no final do processo de fermentação, utilizando-se a coloração com azul de metileno, após as diluições adequadas, de acordo com a metodologia proposta por Lee, Robinson e Wang (1981).

Para a contagem total em placa, foi utilizado o meio YMA extrato de levedura-malte-ágar (*yeast malt agar*) constituído por glicose (10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3 g.L<sup>-1</sup>), extrato de malte (3 g.L<sup>-1</sup>), peptona bacteriológica (5 g.L<sup>-1</sup>) e ágar (20 g.L<sup>-1</sup>). Aproximadamente 20 mL do meio YMA (por placa) foram fundidos, a 40 °C, utilizando aparelho de micro-ondas, e, logo em seguida, foram vertidos em placas de Petri esterilizadas, deixadas em repouso sob luz UV em capela de fluxo laminar, até a solidificação do meio (cerca de 15 minutos). Para o plaqueamento foram utilizadas as seguintes diluições: 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup>.

<sup>8</sup>, incubando-se 100 µL com três repetições para cada diluição (plaqueamento em superfície). As placas foram armazenadas em estufa do tipo BOD, à temperatura de 28 °C, por 72 horas. Transcorrido o tempo de incubação fez-se a contagem do número de colônias, tirando-se a média aritmética de cada diluição e multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **2.2.3.4 Concentração de etanol**

O etanol produzido foi quantificado por meio da análise de cromatografia gasosa, em aparelho Shimadzu CG 17A, com detector de ionização em chama (FID), utilizando-se coluna capilar Carbowax 20M (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: o injetor automático trabalhou no modo “splitless”, utilizando o hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 33 cm.s<sup>-1</sup>. Foi injetado 1 µL de amostra, sendo o tempo de corrida de 15 minutos. Foi utilizado um gradiente de temperatura em que a coluna permaneceu, inicialmente, à temperatura de 40 °C, por 4 minutos, aquecendo até 220 °C e permanecendo por 2 minutos nessa temperatura, por meio de uma rampa de aquecimento de 25 °C.min<sup>-1</sup>. A temperatura do detector foi de 300 °C. Para a quantificação dos teores de etanol nas amostras, foi realizada uma calibração, com base no padrão externo etanol (padrão analítico da Merck).

#### **2.2.3.5 Parâmetros fermentativos**

Foram avaliados os parâmetros fermentativos de conversão do substrato em etanol, eficiência fermentativa e produtividade em etanol.

O fator de conversão do substrato em etanol ( $Y_{p/s}$ ) foi calculado em grama de etanol produzido por grama de açúcares redutores totais consumidos, empregando-se a Equação 1.

$$Y_{p/s} = P / (S_0 - S) \quad (1)$$

em que

P = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol.L<sup>-1</sup>);

S<sub>0</sub> = concentração de açúcares redutores totais no início da fermentação (g ART.L<sup>-1</sup>);

S = concentração de açúcares redutores totais no fim da fermentação (g ART.L<sup>-1</sup>).

A eficiência fermentativa ( $E_f$ ) corresponde à fração do açúcar metabolizado que se converteu em etanol. Esse parâmetro foi calculado pela relação entre o rendimento do etanol observado no processo e o rendimento teórico (Equação 2).

$$E_f = \left( \frac{Y_{p/s}}{0,511} \right) \times 100 \quad (2)$$

A produtividade em etanol ( $Q_p$ ) expressa o teor produzido em etanol em certo intervalo de tempo e foi calculada empregando-se a Equação 3:

$$Q_p = P / t_f \quad (3)$$

em que

P = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

$t_f$  = tempo total da fermentação (horas).

#### **2.2.4 Análise estatística**

Os ensaios fermentativos seguiram um delineamento inteiramente casualizado, sendo o tipo de fermentação a variável analisada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo programa SISVAR 5.1<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Tukey, a 5% de probabilidade. O tempo de fermentação não foi incluído como fonte de variação na ANOVA, por se tratar de estudo cinético, no qual o tempo se comporta como mais uma resposta.

#### **2.3 Produção de pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086**

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pectínicas e são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, principalmente na clarificação de sucos, na qual atuam despolimerizando e quebrando a pectina, aumentando o rendimento e diminuindo a viscosidade e a turbidez.

Foi observada uma clarificação dos meios utilizados para a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, quando foi adicionada a fase líquida da polpa de café. Por esse motivo decidiu-se estudar o emprego desta fase na produção dessas enzimas, o que aponta uma nova aplicação biotecnológica para a polpa de café na fase líquida, além de minimizar os gastos dispensados ao meio de cultura para a produção dessas enzimas.

Utilizou-se um fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , com 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Foram avaliadas 4 variáveis independentes: concentração de pectina (g/100 mL), concentração de inóculo (g/100 mL), concentração de fase líquida da polpa de café (g/100 mL) e temperatura (°C),

cujos valores dos níveis máximo (+1) e mínimo (-1) para cada variável encontram-se na Tabela 2. O meio de cultura foi suplementado com sulfato de amônio, na concentração de 0,5 g/L, agitação de 150 rpm, concentração de sólidos solúveis do melaço de cana de açúcar de 12 °Brix e tempo de fermentação de 48 horas, de acordo Bravo et al. (2000). Os níveis para cada variável foram estabelecidos baseando-se também no trabalho de Bravo et al. (2000).

Esse tipo de planejamento é utilizado para a seleção de variáveis utilizando-se um número reduzido de tratamentos. A variável resposta analisada foi atividade específica de poligalacturonase (cuja metodologia encontra-se descrita nos itens 2.3.1.1 e 2.3.1.4). Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software Statistica 8.0 (STATISTICA, 2008), a 10% de probabilidade.

Tabela 2 Níveis do fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , para seleção de variáveis para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.

Variável	Unidade	Nível (-1)	Nível (+1)
[Pectina]	g/100 mL	0	1
[Inóculo]	mL/100 mL	5	15
[Fase líquida da polpa de café]	mL/100 mL	0	70
Temperatura	°C	25	45

O uso de colchetes simboliza concentração.

Após a seleção das variáveis que influenciaram a produção de poligalacturonase para a otimização das condições, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), em esquema de fatorial completo  $2^3$ , com

6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, resultando em 17 ensaios. Foram avaliadas três variáveis independentes, duas selecionadas a partir do fatorial fracionado, sendo elas concentração de fase líquida da polpa de café (g/100 mL) e temperatura (°C), e uma adicionada após a ausência de efeito (ou efeito negativo) das outras variáveis analisadas no fatorial, a concentração de sulfato de amônio. Essa última variável foi escolhida baseando-se em trabalhos de Bravo et al. (2000) que otimizaram a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para a produção de poligalacturonase em meio contendo como fonte de carboidrato caldo de cana-de-açúcar. Como no meio utilizado nesta pesquisa utilizou-se melão de cana-de-açúcar e fase líquida da polpa de café, a pesquisa sobre a necessidade ou não de sulfato de amônio no meio de cultura, ao se utilizar outras fontes de carboidrato, tornou-se necessária. A concentração de inóculo utilizada foi de 5% v/v (ou seja, 5 mL de inóculo/100 mL de meio de cultura), baseando-se nos resultados do fatorial fracionado. Os valores codificados e reais para as variáveis independentes encontram-se na Tabela 3, sendo o tempo de fermentação fixado em 48 horas e agitação de 150 rpm (BRAVO et al., 2000).

Tabela 3 Níveis do planejamento experimental para otimização da produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.

Variável independente	Nível				
	-1,6818	-1	0	1	1,6818
[Fase líquida da polpa de café] (mL/100 mL)	70	74	80	86	90
$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (g/L)	0	0,3	0,5	0,8	1
Temperatura (°C)	20	22	25	28	30

O uso de colchetes simboliza concentração.

A variável resposta analisada foi a atividade específica de poligalacturonase. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software Statistica 8.0 (STATISTICA, 2008), com nível de significância de 10%.

### **2.3.1 Obtenção do extrato enzimático bruto e determinação da atividade das pectinases**

Terminado o tempo de 48 horas de fermentação, os meios foram filtrados em papel filtro (Whatman n°1), sendo o filtrado posteriormente centrifugado, a 7.840 g, por 10 minutos, a 5 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos com pipetas de Pasteur e chamados de extrato enzimático bruto.

Nos extratos enzimáticos brutos oriundos dos experimentos referentes ao fatorial fracionado, dosou-se, além da atividade da poligalacturonase, a atividade de outras pectinases, a saber, pectinaliase e pectinametilesterase. Conforme será discutido posteriormente, não foi detectada atividade para essas duas últimas pectinases e, por essa razão, nos tratamentos referentes ao DCCR, dosou-se apenas a atividade da enzima poligalacturonase.

#### **2.3.1.1 Determinação da atividade de poligalacturonase**

A atividade da poligalacturonase foi mensurada pelo método viscosimétrico de Tuttobello e Mill (1961), descrito por Teixeira, Lima-Filho e Durán (2000), utilizando as seguintes condições: 250 µL de solução enzimática foram adicionados a 5,5 mL de pectina cítrica a 0,2% (m/v) em de tampão de acetato (0,025M, pH 5,0 contendo 1,0 mM EDTA). A mistura reacional foi incubada, a 50 °C, por 10 minutos. Para a determinação da viscosidade das amostras, do branco (obtidos conforme descrito anteriormente, substituindo-se a amostra enzimática por água destilada) e da água deionizada, foi utilizado um viscosímetro de Ostwald tamanho 200 e os valores obtidos foram aplicados nas



Equações 4 e 5, descritas a seguir. A atividade enzimática de poligalacturonase foi determinada em UV/mL, em que uma unidade viscosimétrica (UV) é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir a viscosidade inicial em 50% por minuto, sob as condições definidas.

$$\% \text{ Redução da viscosidade} = \frac{t_{\text{branco}} - t_{\text{amostra}}}{t_{\text{branco}} - t_{\text{água deionizada}}} \quad (4)$$

em que

$t_{\text{branco}}$  = tempo de escoamento do branco (s);

$t_{\text{amostra}}$  = tempo de escoamento da amostra (s);

$t_{\text{água deionizada}}$  = tempo de escoamento da água deionizada (s).

$$UV/mL = (\% \text{ de redução da viscosidade}/50) \times 4/10 \quad (5)$$

em que

$UV/mL$  = unidade viscosimétrica por mL;

$\% \text{ de redução da viscosidade}$  = porcentagem de redução da viscosidade.

### 2.3.1.2 Determinação da atividade de pectinametilsterase (PME)

Para a determinação da atividade da pectinametilsterase, utilizou-se a metodologia titulométrica proposta por Schwan e Rose (1994). O método baseia-se na variação do pH de 20 mL de uma solução de pectina cítrica (1% m/v), em NaCl 0,1 M, durante 30 minutos, após a adição de 3 mL da solução de enzimas. O álcali hidróxido de sódio (NaOH 0,5M) foi adicionado para manter o pH em 7,5, durante o tempo pré-estabelecido. A atividade de PME foi dada de acordo com o volume de NaOH gasto na titulação e expressa em

microequivalentes de ácido pécico liberado por  $\text{mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Uma unidade de pectinametilsterase (U) foi definida como a quantidade de enzima responsável por liberar um microequivalente de ácido pécico por hora de reação.

### **2.3.1.3 Determinação da atividade de pectina liase (PL)**

A atividade da pectina liase foi determinada de acordo com o método proposto por Pitt (1988), conforme Kashyap et al. (2000). De maneira resumida, 1 mL da amostra de enzima foi adicionado a 5,0 mL de pectina solução (1% p/v). O volume das amostras de ensaio foi completado para 10,0 mL, com água destilada. As amostras foram incubadas, a 40 °C, por 2 horas. Na sequência, adicionaram-se sulfato de zinco (0,6 mL, 9,0% p/v) e hidróxido de sódio (0,6 mL, 0,5 M). As amostras foram centrifugadas (3.000 g, 10 minutos) e adicionaram-se 5,0 mL do sobrenadante a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3,0 mL, 0,04 M), HCl (2,5 mL, 0,1 M) e água destilada (0,5 mL). Aqueceu-se a mistura em banho-maria termostatizado, em temperatura de ebulição, por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância da solução colorida a 550 nm. Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima responsável por causar mudança de absorvância de 0,01 na condição do ensaio.

### **2.3.1.4 Determinação das proteínas totais e atividades enzimáticas específicas**

A determinação das atividades enzimáticas específicas foi calculada dividindo-se a atividade enzimática ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) pelo valor de proteínas totais ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) presentes na amostra, obtendo-se a atividade a atividade enzimática (U) por mg de proteínas ( $\text{U.mg}^{-1}$ ). O teor de proteínas totais em cada amostra foi mensurado por meio do método espectrofotométrico proposto por Bradford

(1976) (microanálise), utilizando soroalbumina bovina como padrão e o reagente de Bradford (Comassie Blue G-250) como substância cromófora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda regulado a 595 nm.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Extração dos componentes solúveis presentes na polpa do café para a obtenção da fase líquida da polpa de café

Os valores médios e os respectivos coeficientes de variação para os componentes presentes na polpa de café e nas fases líquidas oriundas dos diferentes métodos de extração encontram-se dispostos na Tabela 4 e o resumo da ANOVA, nas Tabelas 1A a 6A.

Tabela 4 Valores médios para as concentrações de amido, pectina total e solúvel, polifenóis, açúcares totais e redutores presentes na polpa e nas suas fases líquidas.

Tratamento	Amido (%)	Pectina total <sup>1</sup>	Pectina solúvel <sup>1</sup>	Polifenóis (%)	ART (%)	AR (%)
Polpa	2,60 <sup>a</sup> (14)	0,69 <sup>a</sup> (3,83)	0,25 <sup>a</sup> (1,39)	0,30 <sup>a</sup> (1,67)	2,17 <sup>c</sup> (12)	1,85 <sup>c</sup> (10,2)
E1	0,10 <sup>d</sup>	0,18 <sup>c</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,08 <sup>d</sup>	4,69 <sup>b</sup>	4,01 <sup>b</sup>
E2	0,42 <sup>cd</sup>	0,18 <sup>c</sup>	0,09 <sup>b</sup>	0,08 <sup>d</sup>	5,12 <sup>a</sup>	4,01 <sup>b</sup>
E3	0,67 <sup>c</sup>	0,16 <sup>c</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,11 <sup>c</sup>	5,45 <sup>a</sup>	4,12 <sup>ba</sup>
E4	1,17 <sup>b</sup>	0,49 <sup>b</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	5,48 <sup>a</sup>	4,30 <sup>a</sup>
CV(%)	16,46	3,82	22,4	2,71	3,69	2,49

\* Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> Unidade: mg de ácido poligalacturônico/100 g de fase líquida ou de polpa de café.

Símbolos utilizados: E1 - apenas prensagem, E2 - extração mecânica a frio com prensagem posterior, E3 - extração termomecânica com aquecimento a 60 °C, com prensagem posterior, E4 - extração termomecânica com aquecimento a 121 °C, com prensagem posterior, ART - açúcares redutores totais; AR - açúcares redutores.

Valores entre parênteses representam a quantidade encontrada para cada parâmetro analisado em relação à base seca, sendo o teor de umidade da polpa igual a 82%.

Com base nos resultados do teste de Tukey, pôde-se observar que nenhum processo de extração retirou quantidades semelhantes às presentes na polpa de café (fato verificado para todos componentes analisados).

O processo de extração E4 (termomecânico com aquecimento a 121 °C) foi o que extraiu a maior quantidade dos componentes, amido, polifenóis, pectina total e solúvel, presentes na polpa de café, quando comparados os quatro métodos de extração.

A trituração a frio seguida de prensagem (E2) extraiu amido em quantidades estatisticamente semelhantes aos processos de extração E3 (extração termomecânica com aquecimento a 60 °C e prensagem) e E1 (apenas prensagem).

O teor de pectina total presente na polpa de café foi cerca da metade do reportado por Antier et al. (1993), que citam 6,5% de pectina em base seca.

Para a extração de pectina total e solúvel, os processos E1 (prensagem), E2 (trituração a frio e prensagem) e E3 (trituração a 60 °C) extraíram quantidades estatisticamente semelhantes desses componentes, indicando que o emprego de temperatura mais alta (E4) proporciona extração de maior concentração de pectina total e solúvel da polpa de café. As leveduras *Kluyveromyces* sp. têm sido apontadas (BRAVO et al., 2000) como produtoras de enzimas pectinolíticas de ampla aplicação na indústria de alimentos. Entretanto, se o uso da fase líquida de polpa de café for destinado à produção de etanol por via fermentativa, a presença de pectina pode dificultar o processo pelo aumento da viscosidade do meio, sendo, portanto, indesejável.

O teor de polifenóis encontrado na polpa de café (em base seca) foi bastante próximo ao valor observado por Bressani (1978), que relatou a concentração de 1% de polifenóis na polpa de café.

Os compostos fenólicos estão dentro de uma ampla gama de substâncias que afetam a fermentação por microrganismos, atuando como inibidores. Por essa razão, os métodos de extração mais indicados foram os que extraíram menor concentração desses inibidores, ou seja, as extrações E1 e E2.

O teor de açúcares totais e o teor de açúcares redutores presentes na polpa de café, semelhantes aos reportados por Bressani (1978), foram estatisticamente diferentes das concentrações observadas nos líquidos oriundos dos processos de extração. Por serem extensivamente solúveis em água, esses compostos podem ser perdidos quando ocorre a exsudação da parte líquida da polpa de café, durante o processo de descongelamento.

A extração dos açúcares totais foi influenciada pela trituração, tendo os processos envolvidos nessa etapa apresentado maiores teores de açúcares totais e sido estatisticamente semelhantes entre si. Concentrações mais elevadas de açúcares são favoráveis aos processos fermentativos de obtenção de etanol por *Kluyveromyces marxianus*, sendo reportadas concentrações altas, como 200 g.L<sup>-1</sup> de açúcares totais (ODA et al.; 2010). As fases líquidas da polpa de café podem ser utilizados como diluentes da fonte de carboidrato a ser utilizado na obtenção de etanol, o que é duplamente benéfico, do ponto de vista ambiental: economiza água destinada à diluição (conforme visualizado na Tabela 1, no item 2.2.2) e viabiliza o uso de um resíduo.

O processo de extração a frio com trituração (E2) destacou-se em relação aos demais processos (E1, E3 e E4), por retirar uma boa quantidade de açúcares totais e menor quantidade de polifenóis, além de não necessitar de aquecimento, sendo o mais indicado para a obtenção da fase líquida da polpa de café destinada à fermentação para a obtenção de etanol.

### 3.2 Processos fermentativos

Os estudos cinéticos dos processos fermentativos são discutidos nos próximos itens.

#### 3.2.1 Cinética de consumo de açúcares redutores totais

As cinéticas de consumo de açúcares redutores totais das fermentações F1 e F2, no decorrer de 72 horas de fermentação, estão representadas na Figura 1. O consumo de açúcares foi acompanhado por meio da medida dos sólidos solúveis (dados não mostrados), sendo a fermentação encerrada quando o teor de sólidos solúveis tornou-se constante, coincidindo com o tempo de 72 horas, encontrado na literatura, para a produção de etanol a partir de caldo de cana contendo o teor de açúcares totais de  $180\text{g.L}^{-1}$ , utilizando *Kluyveromyces marxianus* (LIMTONG; SRINGIEW; YONGMANITCHAI, 2007).

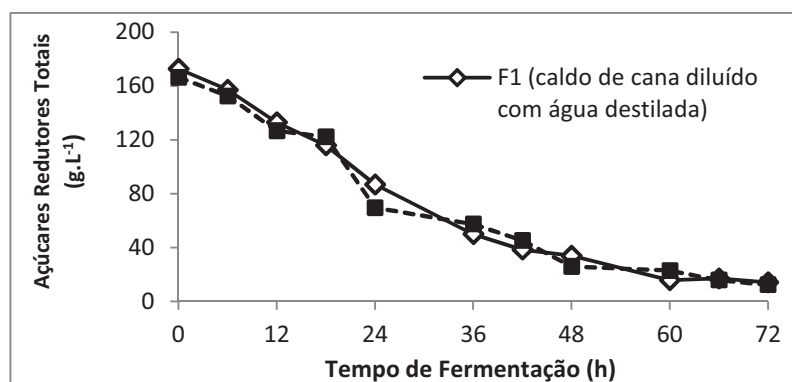


Figura 1 Cinética do consumo de açúcares redutores totais, por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meios contendo caldo de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2)

Não foi observada diferença entre os tipos de fermentação F1 e F2 (Tabela 7A), demonstrando que a adição de fase líquida da polpa de café não apresenta efeito inibitório sobre o consumo de açúcares redutores totais (ART) pela *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

A fermentação F1 iniciou-se com um teor de ART de 172,74 g.L<sup>-1</sup> e, após 72 horas, a concentração de ART observada foi de 14,21 g.L<sup>-1</sup>. Para a fermentação F2, os teores inicial e final de ART mensurado foram de 166,51 g.L<sup>-1</sup> e 12,43 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em *Kluyveromyces marxianus*, a sacarose é, inicialmente, hidrolisada em glicose e frutose, pela ação da enzima inulinase, uma  $\beta$ -frutosidase não específica capaz de atuar sobre a sacarose, de forma semelhante à invertase. A invertase não é secretada no meio de cultura, ficando retida no espaço periplasmático da *Kluyveromyces marxianus* (BRUNO, 1999).

A cinética de consumo de açúcares redutores totais nas fermentações F3 e F4, no decorrer de 120 horas de fermentação, pode ser observada na Figura 2.

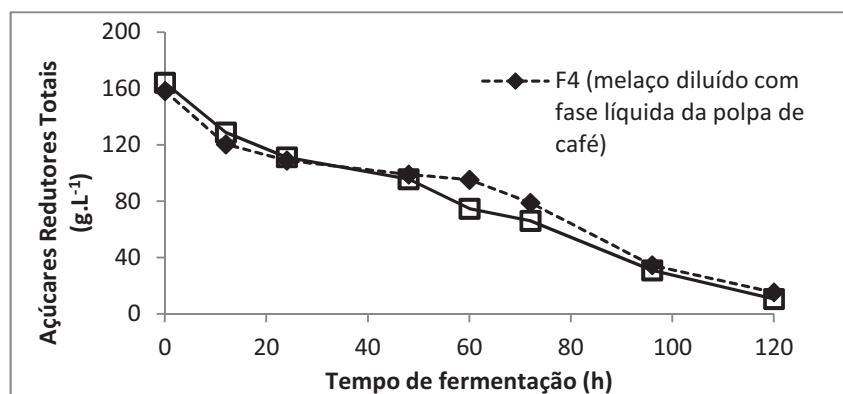


Figura 2 Cinética do consumo de açúcares redutores totais, por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meios contendo melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4)



Não se observaram diferenças significativas entre os tipos de fermentação F3 e F4 (Tabela 8A), indicando que a adição de fase líquida da polpa de café ao melão não interfere no consumo de ART, por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Os valores de ART iniciais e finais observados foram de 166,19 g.L<sup>-1</sup> e 10,61 g.L<sup>-1</sup>, para F3 e de 158,24 g.L<sup>-1</sup> e 15,37 g.L<sup>-1</sup>, para F4, respectivamente. Os tempos de fermentação por *Kluyveromyces marxianus* em meios contendo melão de cana-de-açúcar na literatura são bastante variáveis. Aziz et al. (2011) estudaram a fermentação alcoólica em meio contendo melão diluído por 72 horas. O tempo de fermentação utilizado na presente pesquisa foi definido pelo acompanhamento dos sólidos solúveis. Após 120 horas, os teores de sólidos solúveis se tornaram estáveis (em torno de 5°Brix), sendo encerrada a fermentação nesse tempo.

Com relação à fermentação de *Kluyveromyces marxianus* na fase líquida da polpa de café, observou-se que a levedura foi capaz de fermentar esse material (Figura 3).

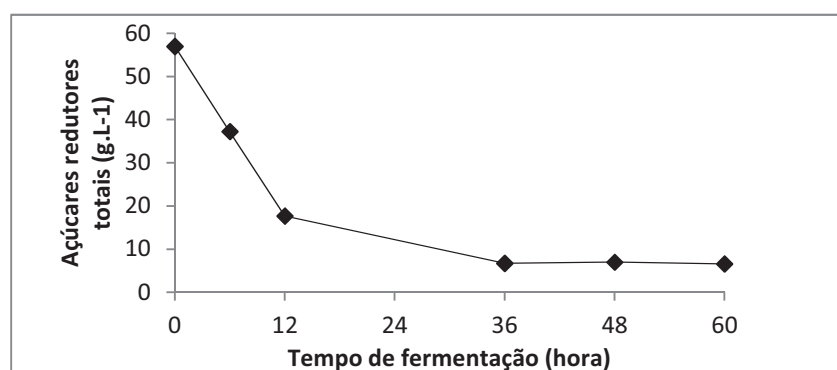


Figura 3 Cinética do consumo de açúcares redutores totais, por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café

Com base na visualização da Figura 3, pode-se perceber que *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi capaz de fermentar a fase líquida da polpa de café e que tal fermentação foi finalizada a partir de 36 horas. A fermentação iniciou-se com um teor de ART de 56,97 g.L<sup>-1</sup> e, após 36 horas, observou-se uma concentração de 6,74 g de ART.L<sup>-1</sup>.

### 3.2.2 Potencial hidrogeniônico (pH) e perfil de ácidos orgânicos

Avaliando-se o pH da fermentação F1, em comparação ao pH da F2, observaram-se os valores iniciais de 5,38, para a F1 e de 4,99, para a F2 e os valores finais de 3,92, para F1 e de 4,28, para F2. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre esses dois tipos de fermentação, quanto à variável pH (conforme ANOVA na Tabela 9A).

A fermentação contendo melaço diluído com água destilada (F3) apresentou pH inicial de 5,50 e, ao término da fermentação, o pH mensurado para esse tratamento foi de 4,95. Para a fermentação contendo melaço diluído com fase líquida da polpa de café (F4), os pHs verificados foram de 5,02 (inicial) e de 4,70 (final). Para tais tratamentos, os resultados estatísticos apontaram diferenças entre os tipos de fermentação (ANOVA, Tabela 10A), sendo a maior média encontrada na fermentação F3.

Limting, Sringiew e Yongmanitchai (2007) estudaram o efeito de diferentes pH iniciais (variando de 4,0 a 5,5) na produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042, utilizando caldo de cana, diluído a 18 °Brix e a 37 °C e obtiveram maior produção de etanol (87 g.L<sup>-1</sup>) com o pH inicial de 5,0, que é extremamente próximo aos verificados nos meios que foram diluídos com fase líquida da polpa de café (F2 e F4).

Nota-se o tamponamento realizado pela fase líquida da polpa de café, que culmina em menor diferença (entre o valor inicial e final) dos dados

referentes aos meios com adição desse material (F2 e F4) em comparação aos meios sem adição desse resíduo (Figuras 4A e 4B). Dessa maneira, o uso de fase líquida da polpa de café na produção de etanol minimizaria os gastos com os reagentes e à mão-de-obra necessários à correção do pH.

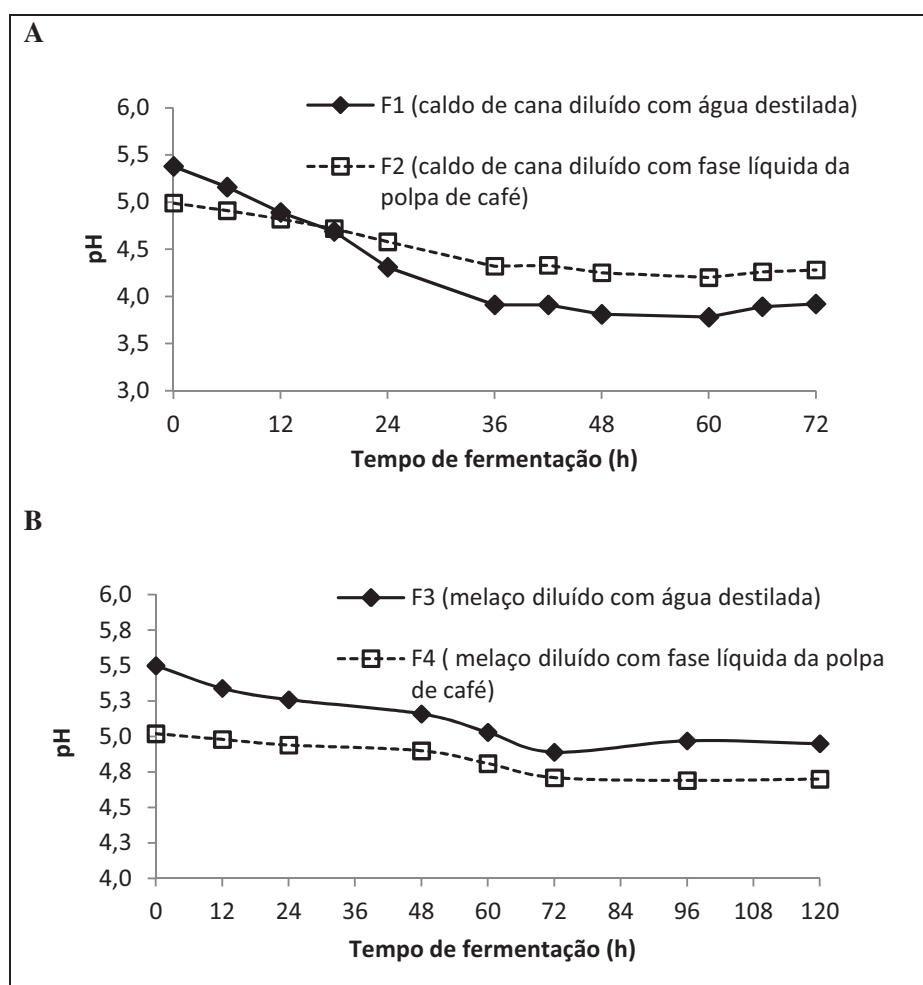


Figura 4 Variação do pH ao longo do tempo de fermentação em meios contendo (A) caldo de cana diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2) e (B) melaço de cana diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4) por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

Na Figura 5 está ilustrada a pequena diferença existente entre o pH inicial (4,26) e o pH final (4,15), durante a fermentação realizada em meio contendo apenas a fase líquida de polpa de café como fonte de carboidrato, demonstrando, mais uma vez, o potencial tamponamento exercido por esse resíduo.

Os meios fermentativos foram investigados quanto à presença dos ácidos cítrico, málico, tartárico, oxálico, succínico, fórmico, acético, propiônico, isobutírico e butírico. Dentre estes, foi detectada a presença de apenas quatro deles (em todos os meios), a saber: cítrico, succínico, málico e oxálico.

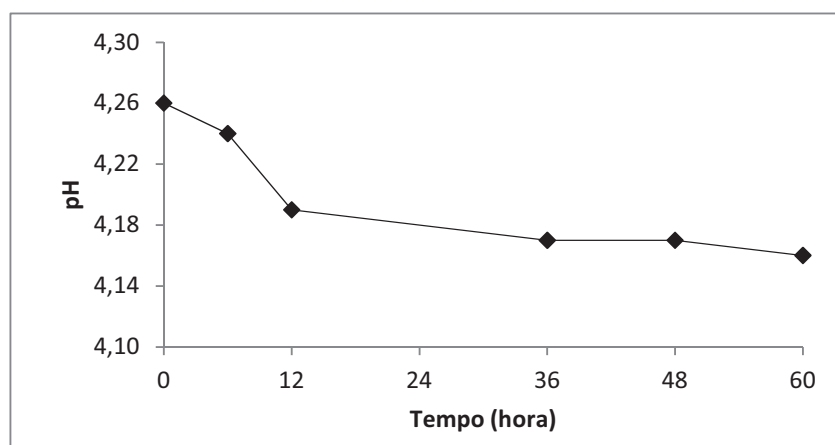


Figura 5 Variação do pH ao longo do tempo de fermentação por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café

Quando os resultados de concentração dos ácidos málico e oxálico referentes aos meios contendo caldo de cana-de-açúcar, diluído com água destilada (F1) ou com fase líquida da polpa de café (F2), foram submetidos à análise de variância, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tipos de tratamentos (F1 e F2), indicando que a presença desses ácidos nos meios deriva da matéria-prima empregada para a composição dos mesmos, não sendo produzidos pela *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, nas condições empregadas. Os valores médios observados de ácido málico e de ácido oxálico foram de 1,01 g de ácido málico.L<sup>-1</sup> para F1; 1,10 g de ácido málico.L<sup>-1</sup> para F2; 2,87 g de ácido oxálico.L<sup>-1</sup> para F1 e 2,57 g de ácido oxálico. L<sup>-1</sup> para F2.

As mesmas observações estatísticas relatadas anteriormente foram constatadas nos meios contendo melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada ou com fase líquida da polpa de café, encontrando-se os teores de 3,85 g de ácido málico.L<sup>-1</sup> para F3; 3,67 g de ácido málico.L<sup>-1</sup> para F4; 5,29 g de ácido oxálico.L<sup>-1</sup> para F3 e 5,45 g de ácido oxálico. L<sup>-1</sup> para F4.

Os teores de ácido cítrico e ácido succínico aumentaram ao longo do tempo de fermentação, em todos os processos, conforme se observa nas Figuras 6 e 7, indicando produção desses ácidos. O ácido succínico não foi detectado no início do experimento, apontando que ele não faz parte da composição dos substratos utilizados na elaboração dos meios de cultura

Os teores finais de ácido cítrico observados para as fermentações F1, F2, F3, F4 e F5 foram de 1,26; 1,22; 0,57; 0,83 e 0,25 g de ácido cítrico.L<sup>-1</sup> e de 0,36; 0,49; 1,13; 1 e 1,03 g de ácido succínico.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

O tamponamento dos meios contendo fase líquida da polpa de café não pode ser atribuído à presença dos ácidos detectados, uma vez que não foram constatadas diferenças estatísticas entre os meios contendo ou não fase líquida.

Dessa maneira, deve-se investigar a presença de outros ácidos orgânicos ou compostos com natureza tamponante.

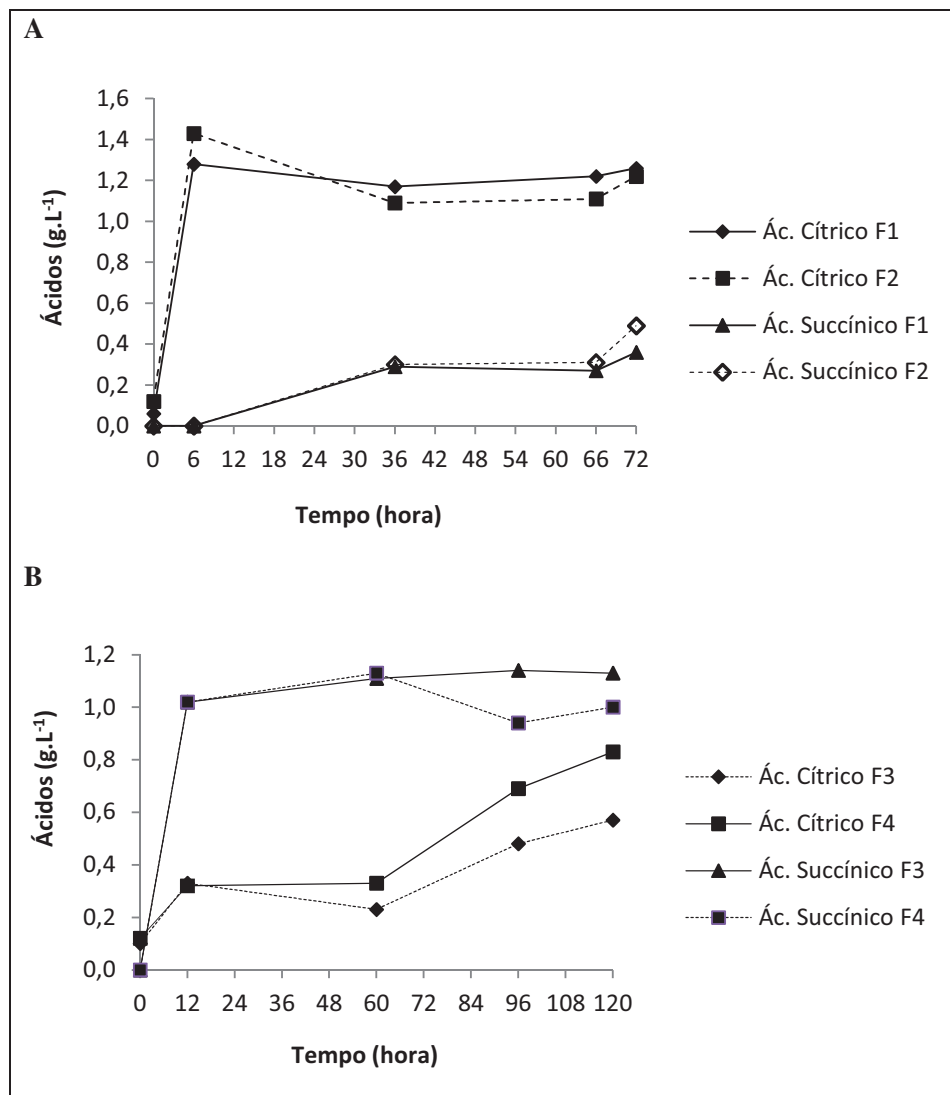


Figura 6 Variação dos teores dos ácidos orgânicos cítrico e succínico produzidos por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, utilizando-se (A) caldo de cana-de-açúcar diluído com água (F1) ou com fase líquida da polpa de café (F2) e (B) melaço de cana-de-açúcar diluído com água (F3) ou com fase líquida da polpa de café (F4).

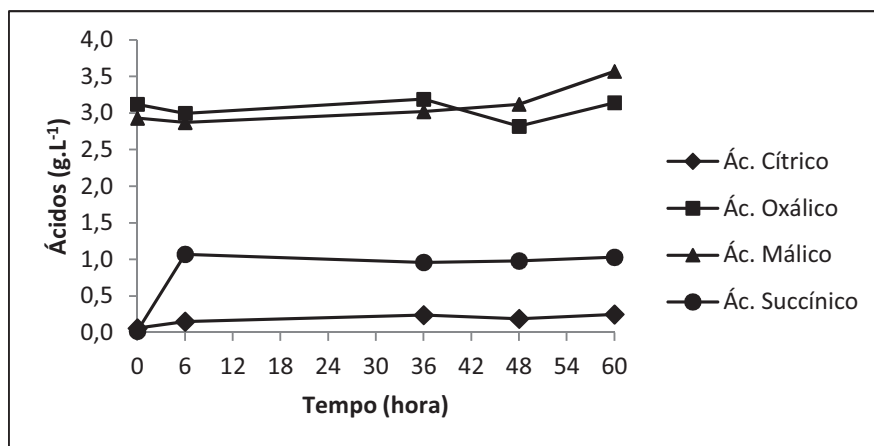


Figura 7 Variação dos teores dos ácidos orgânicos produzidos por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, utilizando-se fase líquida da polpa de café

A produção de ácido cítrico e ácido succínico obtida na presente pesquisa indica uma possível aplicabilidade da fermentação da fase líquida da polpa de café utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Silva et al. (2012) utilizaram a levedura *Kluyveromyces marxianus* URM 4404 para a produção de ácido cítrico em diferentes substratos e observaram que o resíduo de acerola foi o principal deles, atingindo-se uma produção de 4,1 g de ácido cítrico/L. Faga et al. (2010) relataram produção de ácido succínico por *Kluyveromyces marxianus* IMB5, utilizando resíduos de grama switchgrass, obtendo 0,6 g.L<sup>-1</sup>, após 72 horas de fermentação.

Lukondeh e Ashbolt, Rogers (2005) avaliaram a produção de ácidos orgânicos por *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivada em meio contendo lactose como fonte de carboidrato e verificaram baixas concentrações de ácidos orgânicos, tais como pirúvico (0,03 g.L<sup>-1</sup>), málico (0,01 g.L<sup>-1</sup>), cítrico, acético, propiônico e fumárico (todos em concentrações abaixo de 0,01 g.L<sup>-1</sup>).

Esses autores ressaltam que a produção de ácidos orgânicos é um evento natural durante o crescimento de leveduras.

### **3.2.3 Contagem total de células e viabilidade celular**

Os resultados das contagens de células totais para os meios contendo caldo de cana diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2) estão ilustrados na Figura 8, por meio da qual é possível observar a semelhança do número de células totais de ambos os tratamentos, o que ocasiona a sobreposição dos dados na figura. Não foi observada diferença estatística entre os dois tipos de fermentação, o que incita a ideia de que a fase líquida da polpa de café não influencia tanto o número de células como a viabilidade das mesmas (ANOVA Tabela 11A).

A fermentação F1 iniciou-se com  $5,8 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e, após 72 horas, o número de células observado foi de  $4,37 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>. As porcentagens de células viáveis no início e no final do processo foram de 90,30% e 89,61%, respectivamente. Para a fermentação F2,  $5,7 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> foram contadas no início da fermentação e  $4,41 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> estavam presentes ao final da fermentação, das quais 89,61% eram células viáveis no início e 84,44% eram células viáveis no final.



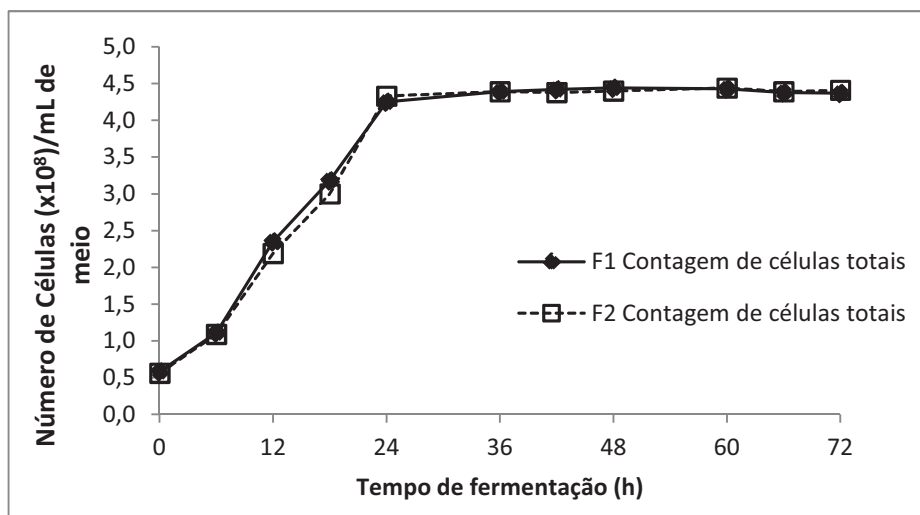


Figura 8 Variação da concentração de células totais ao longo do tempo de fermentação em meios contendo caldo de cana diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2) por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

Comportamento semelhante ao observado para F1 e F2 foi notado para os meios contendo melaço de cana diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4), conforme ilustrado na Figura 9 (ANOVA Tabela 12A). As fermentações F3 e F4 apresentaram, respectivamente,  $5,2 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e  $5,4 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, no início das fermentações e, ao término, foram verificadas  $4,31 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, para F3 e  $4,32 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup> para F4. As viabilidades das células iniciais e finais para F3 foram de 88,46% e 84,94%, respectivamente e, para F4, 88,34% de células viáveis estavam presentes no início da fermentação e, após 120 horas, a porcentagem de células viáveis foi de 84,92%.

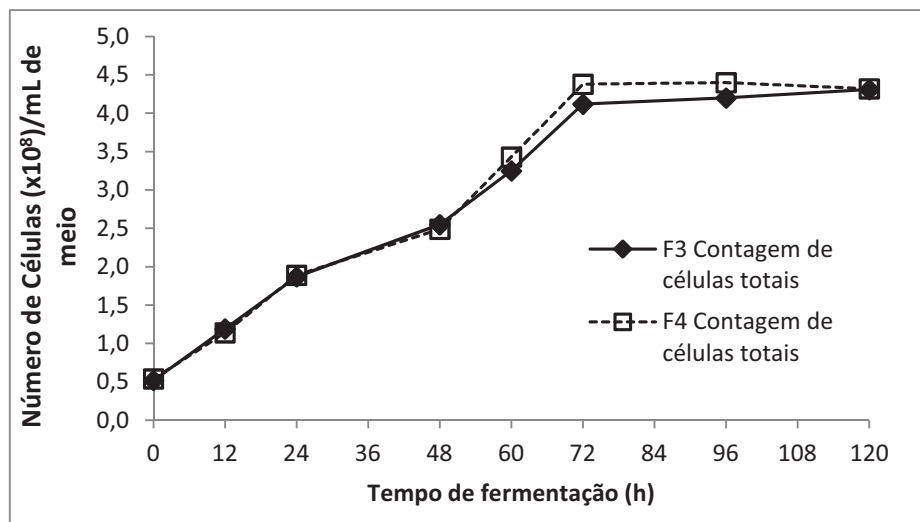


Figura 9 Variação da concentração de células totais ao longo do tempo de fermentação em meios contendo melão de cana diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4) por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

Na Figura 10 está ilustrada a variação do número de células ao longo do tempo de fermentação para o meio contendo apenas fase líquida da polpa de café (F5). Nota-se o menor número de células ao final da fermentação, em comparação aos demais processos fermentativos (F1, F2, F3 e F4), o que ocorre devido à menor concentração de substrato para o desenvolvimento do microrganismo. A fermentação iniciou-se com  $5,5 \times 10^7$  células/mL de meio, sendo 94,47% de células viáveis e, ao final da fermentação, observaram-se  $2,69 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, das quais 86,83% eram viáveis.

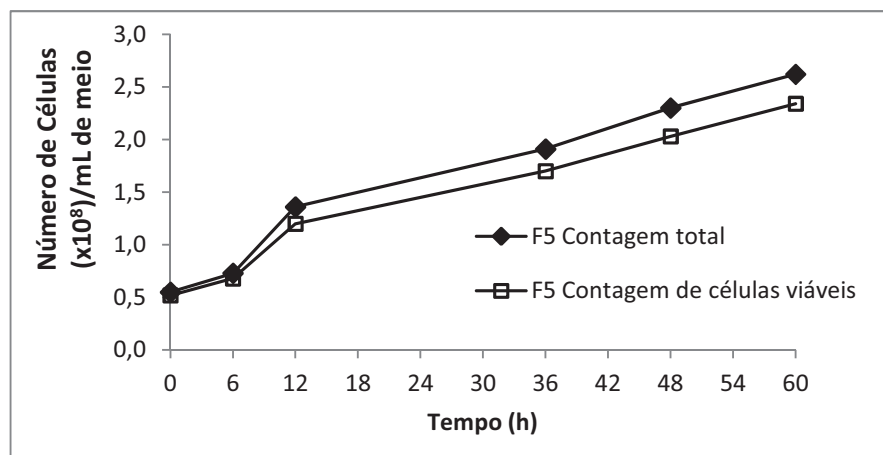


Figura 10 Variação da concentração e viabilidade celular ao longo do tempo de fermentação por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café

Oda et al. (2010) correlacionaram a viabilidade celular de *Kluyveromyces marxianus* com a quantidade de etanol produzida e constataram que a viabilidade celular reduziu drasticamente com o acúmulo de etanol no meio, sendo viável até a concentração de etanol em torno de  $90\text{g.L}^{-1}$ . Conforme será discutido nos itens posteriores, a quantidade de etanol produzida foi inferior a  $90\text{g.L}^{-1}$ , observando-se alta viabilidade durante todo o processo.

Em todos os processos fermentativos (F1, F2, F3, F4 e F5), pode-se perceber que, durante o ciclo de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, essa levedura não entrou na fase de declínio, quando a presença de produtos tóxicos presentes no meio pode causar a morte celular. Dessa maneira, o processo fermentativo parece ter sido encerrado pelo esgotamento do substrato, o que indica que novas estratégias de alimentação do processo poderiam proporcionar maior produção de etanol.

Por meio da contagem de células em placas foi constatado um aumento na concentração celular ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ), para todos os tratamentos, em relação ao

tempo inicial e final de cada processo fermentativo, conforme mostrado pelos dados da Tabela 5 e da Tabela 13A. Este aumento foi superior ao relatado por Oda et al. (2010), que observaram aumento de  $3 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> para  $5 \times 10^8$  UFC/mL, em 24 horas.

Em todos os tipos de fermentação estudados, a viabilidade celular no final do processo fermentativo foi próxima da viabilidade do início do tratamento. As contagens totais nos tempos iniciais foram estatisticamente semelhantes às contagens finais. O exposto anteriormente corrobora o pensamento de que a fase líquida da polpa de café não provoca interferências no processo de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, podendo ser empregada como diluente em meios de fermentação.

Tabela 5 Contagem de células em placa (UFC.mL<sup>-1</sup>) para o tempo inicial e tempo final de cada fermentação.

Tempo <sup>1</sup>	F1 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	F2 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	F3 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	F4 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	F5 (UFC.mL <sup>-1</sup> )
Inicial	4,67x10 <sup>7b</sup>	3,67x10 <sup>7b</sup>	3,33x10 <sup>7b</sup>	3,00x10 <sup>7b</sup>	3,67x10 <sup>7b</sup>
Final	3,97x10 <sup>8a</sup>	3,37x10 <sup>8a</sup>	3,17x10 <sup>8a</sup>	3,87x10 <sup>8a</sup>	1,13x10 <sup>8a</sup>
CV (%)	15,7				

<sup>1</sup> Tempo inicial: corresponde a 0 hora de fermentação para todos os tratamentos; tempo final corresponde a 72 horas para F1 e F2; 120 horas para F3 e F4 e 60 horas para F5. Médias seguidas de mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

### 3.2.4 Produção de etanol e parâmetros fermentativos

A cinética de produção de etanol nos meios contendo caldo de cana diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2) pode ser visualizada pela Figura 11. Não foi observada diferença estatística entre esses dois tipos de fermentação, quanto à produção de etanol (ANOVA Tabela 14A). As médias de etanol observadas após 72 horas de fermentação foram de  $37,18 \text{ g.L}^{-1}$ , para F1 e  $38,59 \text{ g.L}^{-1}$ , para F2.

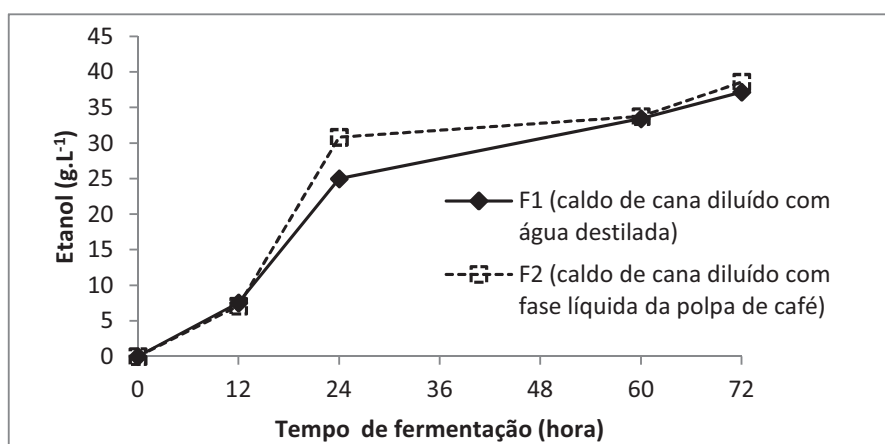


Figura 11 Produção de etanol, por *Kluyveromyces marxianus*, em meios contendo caldo de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F1) e diluído com fase líquida da polpa de café (F2)

Os dados disponíveis na literatura sobre a produção de etanol a partir de sacarose por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 são bastante escassos, embora essa levedura seja caracterizada como produtora de etanol a partir de glicose, pela Fundação André Tosello. Por ser produtor de  $\beta$ -galactosidase, este microrganismo vem sendo amplamente empregado na produção de etanol a partir de lactose (ODA et al., 2010).

Oda et al. (2010) utilizaram soro de queijo coalho como diluente para o viscoso suco de beterraba, visando à produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* KD45, à temperatura de 30 °C. Em condições otimizadas (sendo elas concentração inicial de 200 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores totais e 72 horas de fermentação), os autores obtiveram concentração final de etanol de 102 g.L<sup>-1</sup> e rendimento de 92,9%, valores superiores aos da presente pesquisa. Nos trabalhos de Bruscato et al. (2011), o uso de 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou a produção máxima de etanol de 33 g.L<sup>-1</sup>, após 76 horas, por *Kluyveromyces marxianus* E45, resultado que se aproxima dos encontrados neste trabalho, após 60 horas de fermentação.

O comportamento da produção de etanol nos meios contendo melaço diluído com água (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4) pode ser visto pela cinética representada na Figura 12, na qual é possível notar a semelhança na produção de etanol entre os dois tratamentos. Os resultados estatísticos (ANOVA Tabela 15A), corroborando o que foi exposto anteriormente, não apontaram a existência de diferenças entre os dois tipos de fermentação, indicando que, ao ser usado como fonte de carboidrato o melaço de cana-de-açúcar, a fase líquida da polpa de café pode ser utilizado como diluente, sem que ocorram prejuízos na produção de etanol.

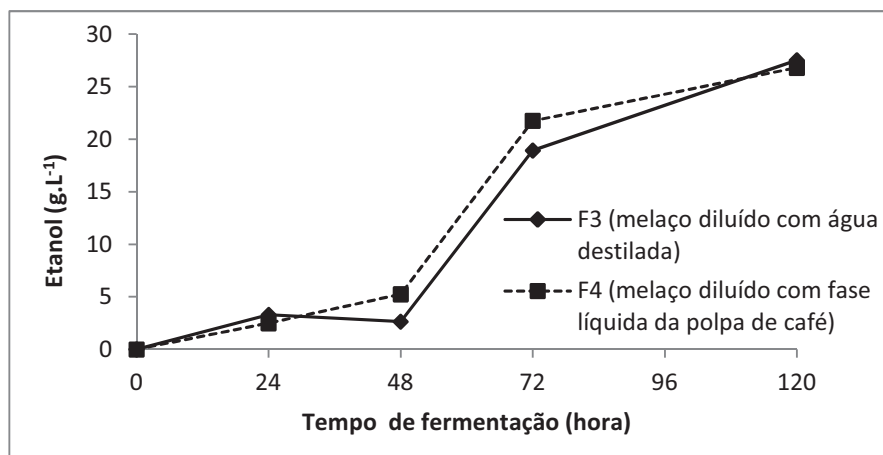


Figura 12 Produção de etanol, por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meios contendo melaço de cana-de-açúcar diluído com água destilada (F3) e diluído com fase líquida da polpa de café (F4)

No tempo 120 horas de fermentação, foram observadas as concentrações de etanol iguais a 27,51 g.L<sup>-1</sup>, para F3 (meio contendo melaço diluído com água) e 26,80 g.L<sup>-1</sup>, para F4 (meio contendo melaço diluído com fase líquida da polpa de café).

Em estudos de Gough et al. (1997), melaços de cana-de-açúcar de diferentes origens foram utilizados e foi detectada ampla variação na quantidade de etanol produzido. Foi sugerido que a reduzida produção de etanol seria resultante da presença de componentes inibitórios em alguns preparativos de melaço. Aziz et al. (2011), estudando diferentes fontes de carboidrato (glicose, sacarose ou melaço), em diferentes concentrações (100, 120, 150 ou 170 g.L<sup>-1</sup>), na produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus*, obtiveram a concentração máxima de 75 g.L<sup>-1</sup> de etanol em meio contendo 150 g.L<sup>-1</sup> de melaço, pH de 5,5 e temperaturas na faixa de 40 a 45 °C. As diferenças relatadas podem ser oriundas das diferentes cepas de levedura utilizadas, além da composição do melaço adicionado ao meio de cultura.

Com relação à produção de etanol no meio composto por fase líquida de café observou-se que a concentração máxima de etanol produzido foi detectada no tempo 60 horas, sendo de  $9,80 \text{ g.L}^{-1}$ , que é menor do que os demais tratamentos, devido ao menor teor de açúcares redutores totais (Figura 3). Todavia, evidencia a possibilidade de obtenção de etanol a partir da fase líquida da polpa de café. Esses valores mais baixos de etanol podem ser aproveitados para a elaboração de uma bebida fermentada a partir da fase líquida da polpa de café, proporcionando a obtenção de um novo produto. Entretanto, não foram realizadas análises na fase líquida da polpa de café quanto à presença de substâncias tóxicas ao ser humano, como as ocratoxinas, por exemplo, sendo importante considerar o aspecto microbiológico e toxicológico desse resíduo, antes de aplicá-lo na elaboração de um alimento. Recomenda-se uma investigação aprofundada de todos os componentes da fase líquida da polpa de café, antes de iniciar um processo de obtenção de um produto para fins alimentícios, para se ter um alimento seguro.

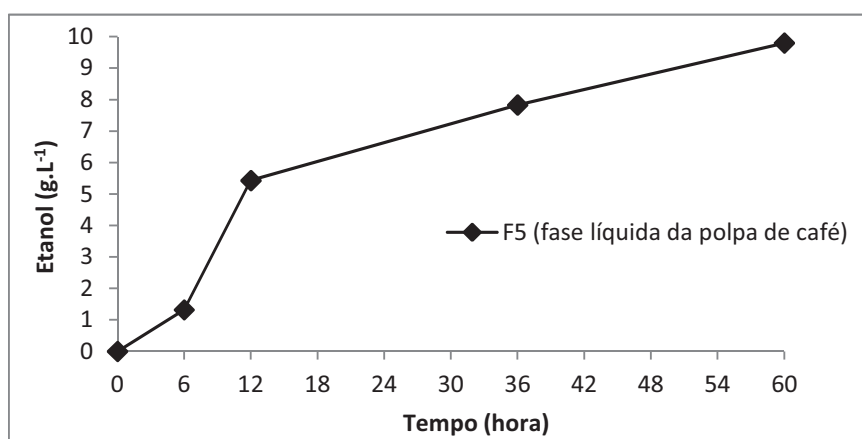


Figura 13 Produção de etanol, por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, em meio contendo fase líquida da polpa de café



Na Tabela 6 estão sumarizados os valores médios e os desvios padrões dos parâmetros fator de conversão do substrato em etanol ( $Y_p/s$ ), eficiência fermentativa ( $E_f$ ), produtividade em etanol ( $Q_p$ ) e conversão do substrato em células ( $Y_x/s$ ). Os resumos das ANOVAs encontram-se sumarizados nas Tabelas 16A a 18A.

Tabela 6 Valores médios para o fator de conversão do substrato em etanol ( $Y_p/s$ ), eficiência fermentativa ( $E_f$ ), produtividade em etanol ( $Q_p$ ), fator de conversão do substrato em células ( $Y_x/s$ ), dos processos fermentativos.

Tratamento*	$Y_p/s$ g etanol. g ART <sup>-1</sup>	$E_f$ (%)	$Q_p$ gEtOH/(L.h)	$Y_x/s$ g células.g substrato <sup>-1</sup>
F1	0,24±0,02 <sup>ab</sup>	47,41±4,03 <sup>ab</sup>	0,52±0,04 <sup>a</sup>	0,0628±0,004 <sup>a</sup>
F2	0,26±0,02 <sup>a</sup>	51,29±3,92 <sup>a</sup>	0,56±0,01 <sup>a</sup>	0,0632±0,010 <sup>a</sup>
F3	0,18±0,02 <sup>c</sup>	34,82±3,81 <sup>c</sup>	0,23±0,05 <sup>b</sup>	0,0576±0,001 <sup>a</sup>
F4	0,19±0,01 <sup>c</sup>	36,91±1,89 <sup>c</sup>	0,22±0,02 <sup>bc</sup>	0,0555±0,020 <sup>a</sup>
F5	0,20±0,05 <sup>bc</sup>	38,66±8,92 <sup>bc</sup>	0,16±0,03 <sup>c</sup>	0,0457±0,007 <sup>a</sup>
CV	10,86	12,53	8,15	16,21

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\*F1: meio contendo caldo de cana diluído com água destilada; F2: meio contendo caldo de cana diluído com fase líquida da polpa de café; F3: meio contendo melaço de cana diluído com água destilada; F4: meio contendo melaço de cana diluído com fase líquida da polpa de café; F5: meio contendo fase líquida da polpa de café.

Os fatores de conversão de substrato em etanol ( $Y_p/s$ ) dos tratamentos contendo caldo de cana apresentaram médias semelhantes e superiores às dos tratamentos contendo melaço. O tratamento contendo apenas café apresentou fator de conversão do substrato em etanol com médias estatisticamente semelhantes às do tratamento contendo caldo de cana diluído com água destilada e dos tratamentos contendo melaço de cana (menores médias observadas).

O valor máximo do fator de conversão do substrato em etanol é de 0,511, estando os valores encontrados nesta pesquisa bastante abaixo deste. Costa (2011), ao estudar a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em meio contendo uma concentração de glicose inicial de 47,81 g.L<sup>-1</sup>, concentração de inóculo com densidade ótica de 0,1 e 37 °C, obteve fatores de conversão do substrato em etanol inferiores ao encontrado nesta pesquisa, da ordem de 0,13. Quando o pesquisador aumentou a concentração do inóculo para densidade ótica de 2, o fator de conversão observado foi de 0,39, o que inspira a pesquisa de diferentes proporções de inóculo na produção de etanol a partir de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Comparando-se os tratamentos quanto à eficiência fermentativa, verifica-se que os meios contendo caldo de cana-de-açúcar apresentaram médias estatisticamente superiores à dos meios contendo melaço de cana-de-açúcar. A presença de metais pesados em melaço causa problemas durante a fermentação, como inibição do crescimento microbiano e influencia o pH do substrato, o que acarreta inibição das enzimas relacionadas à biossíntese de diversos produtos (ROUKAS, 1998).

Os meios contendo caldo de cana-de-açúcar apresentaram maiores produtividades em etanol, quando comparados aos meios contendo melaço de cana-de-açúcar. Os meios contendo apenas fase líquida de polpa de café ou contendo melaço (diluído com água destilada ou com fase líquida da polpa de

café) apresentaram médias estatisticamente semelhantes e inferiores às dos demais tratamentos, sendo os menos produtivos.

Os meios contendo caldo de cana apresentaram médias de eficiência e de produtividade em etanol próximas às relatadas por Limiting, Sringiew e Yongmanitchai (2007), que obtiveram  $57,8 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol, após 96 horas de fermentação por *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042, em pH de 4,5, obtendo produtividade de  $0,60 \text{ g.(L.h)}^{-1}$  e rendimento de 51,5%, em meio contendo  $180 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares redutores totais de caldo de cana diluído. Entretanto, ao otimizarem as condições para pH 5,0,  $220 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares redutores totais encontraram produtividade de  $1,45 \text{ g.(L.h)}^{-1}$  e rendimento de 77,5%, obtendo concentração de etanol de  $87,0 \text{ g.L}^{-1}$ .

Bellaver et al. (2004), ao estudarem a baixa tendência de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em formar etanol, sugeriram que isso ocorre em virtude da falta de capacidade desta levedura de manter o fluxo glicolítico constante em decorrência da dispersão do fluxo de carbono para a biossíntese de carboidratos ou para a rota da pentose fosfato.

Não houve diferenças entre os tratamentos quanto à conversão de substrato (açúcares totais) em biomassa. A espécie *Kluyveromyces marxianus* apresenta alta capacidade de conversão de substrato em biomassa (BELLAYER et al., 2004).

### **3.3 Produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando fase líquida da polpa de café: planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$**

Os resultados referentes a cada um dos ensaios decorrentes da utilização do planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , almejando verificar os efeitos dos níveis da concentração de pectina, da concentração de inóculo, da concentração

de fase líquida da polpa de café e da temperatura sobre a produção de poligalacturonase, estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 Atividade de poligalacturonase (PG) e concentração de proteínas no extrato enzimático bruto referente aos tratamentos do planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ .

Ensaio	[Pectina] (g/100mL)	[Inóculo] (mL/100mL)	[Fase líquida da polpa de café] (mL/100mL)	Temperatura (°C)	PG (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	PG (U/mg)
1	0	5	0	25	0,6215	0,0588	10,5976
2	1	5	0	45	0,2846	0,0792	3,5704
3	0	15	0	45	0,3425	0,0858	4,1007
4	1	15	0	25	0,6438	0,0609	10,1303
5	0	5	70	45	0,1285	0,0519	2,4647
6	1	5	70	25	0,6908	0,0498	13,7655
7	0	15	70	25	0,7127	0,0678	10,6209
8	1	15	70	45	0,1576	0,0681	2,2958
9	0,5	10	35	35	0,5409	0,0523	10,2378
10	0,5	10	35	35	0,5364	0,0592	9,0622
11	0,5	10	35	35	0,5387	0,0558	9,6500

Não foram detectadas atividades para as enzimas pectina liase e pectinametilsterase, corroborando os resultados de Schwan, Cooper e Wheals (1997), que verificaram que a *Kluyveromyces marxianus*, nas condições testadas em seus experimentos não secretou outra enzima pectinolítica no meio de cultura além de poligalacturonase, o que torna mais fácil a obtenção dessa enzima purificada.

De acordo com as condições experimentais do planejamento fatorial fracionado (Tabela 8), foram calculados os efeitos de cada uma das variáveis sobre a produção de poligalacturonase, os quais são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 Efeito da concentração de pectina, da concentração de inóculo, da concentração de fase líquida da polpa de café e da temperatura, sobre a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.

Variável independente	Efeito	p-valor
[Pectina]	+0,4945 NS	0,7312
[Inóculo]	-0,8126 NS	0,5758
[Fase líquida da polpa de café]	+0,1870 NS	0,8962
Temperatura	-8,1704	0,0010

O uso de colchetes simboliza concentração. NS = não significativo, a 10% de probabilidade.

Os efeitos listados na Tabela 8 evidenciam o quanto cada variável afeta a produção da poligalacturonase. Dentre as quatro variáveis estudadas, a única que apresentou diferença estatística ( $p < 0,10$ ) na produção de poligalacturonase foi a temperatura, sendo esse efeito negativo, o que indica que o aumento nessa variável (de 25 °C para 45 °C) diminuiu a produção de tal enzima pela levedura *Kluyveromyces marxianus*. Por esse motivo, os níveis de estudo dessa variável foram deslocados para níveis inferiores (de 20 °C para 30 °C) no planejamento seguinte. O tamanho do inóculo também não influenciou a produção da enzima, sendo utilizada, no próximo delineamento, a menor concentração (5 mL/100 mL).

Alguns microrganismos têm a capacidade de produzir enzimas poligalacturonase constitutivamente, não exigindo a presença de uma substância pécica no meio de crescimento para a secreção da enzima e outros necessitam de indução, ou seja, necessitam de substâncias pécticas presentes no meio de cultura onde está crescendo. Embora os microrganismos que secretam poligalacturonase constitutiva no meio de cultura não necessitem de indução, a

produção dessa enzima pode ser aumentada na presença de indutores (Rexová-Benková e Marcovick, 1976).

Os resultados do ensaio fatorial fracionado não apontaram significância estatística para o efeito da concentração de pectina no meio de cultura para a produção de poligalaturonase por *Kluyveromyces marxianus* CCT, indicando que a presença de pectina não induziu a produção de poligalaturonase, sendo essa produção constitutiva. Optou-se, dessa maneira, pela não utilização da pectina no meio de cultura, uma vez que a sua presença aumenta a viscosidade do meio, dificultando a transferência de massa e energia. Schwan e Rose (1994) reportaram que não houve aumento significativo no crescimento ou na secreção da poligalaturonase quando pectina, ácido pécico ou poligalacturônico foram adicionados ao meio contendo 1% (m/v) de glicose, pela *Kluyveromyces marxianus* CCT 3172.

Como a proposta deste trabalho é o reaproveitamento da fase líquida da polpa de café no meio de cultura, optou-se por inseri-lo no delineamento seguinte, aumentando-se a concentração utilizada (de 70% a 90% v/v).

### **3.3.1 Otimização da produção de poligalaturonase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086**

Na Tabela 9 estão apresentadas a matriz do delineamento composto central rotacional e as respostas obtidas (atividades de poligalaturonase e os teores de proteínas), referentes a cada ensaio. É possível observar diferenças na produção enzimática com as alterações nas condições de cultivo.

Tabela 9 Matriz do delineamento composto central rotacional e respostas da atividade de poligalacturonase e proteínas.

Ensaio	[Fase líquida da polpa de café] (mL/100mL)	[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (g/L)	Temperatura (°C)	PG (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	PG (U/mg)
1	85,946	0,797	27,973	0,5744	0,0561	10,2447
2	85,946	0,797	22,027	0,5911	0,0619	9,4369
3	85,946	0,203	22,027	0,6073	0,0833	7,2962
4	85,946	0,203	27,973	0,5729	0,0639	8,9665
5	74,054	0,203	22,027	0,6492	0,0949	6,8418
6	74,054	0,203	27,973	0,5605	0,0657	8,5294
7	74,054	0,797	22,027	0,5949	0,0515	11,5428
8	74,054	0,797	27,973	0,5798	0,0887	6,5386
9	80	0,5	30	0,5681	0,0626	9,0687
10	80	0,5	20	0,6797	0,0572	11,8789
11	80	1,0	25	1,089	0,0696	15,6604
12	80	0	25	0,9091	0,0740	12,2866
13	90	0,5	25	0,9455	0,0578	16,5157
14	70	0,5	25	1,0736	0,0714	13,2343
15	80	0,5	25	1,0078	0,0522	19,3212
16	80	0,5	25	0,9740	0,0516	18,8948
17	80	0,5	25	0,9714	0,0516	18,7336

De posse dos dados experimentais contidos na Tabela 9, determinaram-se os coeficientes de regressão (Tabela 10) e ajustou-se um modelo quadrático, que relaciona a atividade enzimática com os parâmetros estudados. As variáveis codificadas foram concentração de fase líquida da polpa de café (x1), concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (x2) e temperatura (x3) e a variável resposta foi atividade específica de poligalacturonase.

Tabela 10 Resultados dos coeficientes da equação para a atividade de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

	Coeficiente	p-valor
Média	19,2479	0,00
(1) [Extrato] (L)	0,5688 NS	0,4967
[Extrato] (Q)	-2,3784	0,0296
(2)[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (L)	0,8622 NS	0,3132
[(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] (Q)	-2,6736	0,0183
(3)Temperatura(L)	-0,4039NS	0,6264
Temperatura(Q)	-3,9093	0,0029
1L x 2L	0,0838 NS	0,9379
1L x 3L	0,7288 NS	0,5048
2L x 3L	-0,9388 NS	0,3953

\* NS= não significativo, a 10% de probabilidade.

[Extrato]= [fase líquida da polpa de café]

O modelo descrito está mostrado na Equação 6 e apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,80, sendo que essa variância explicada pelo modelo indica boa relação entre as atividades enzimáticas experimentais e as previstas pelo mesmo.

$$\begin{aligned}
 PG = & 19,25 + 0,57x_1 - 2,38x_1^2 + 0,82x_2 - & (6) \\
 & 2,67 x_2^2 - 0,40 x_3 - 3,91 x_3^2 + 0,08x_1x_2 + \\
 & 0,73 x_1 x_3 - 0,94 x_2x_3
 \end{aligned}$$

Os resultados das análises estatísticas para os dados experimentais da atividade específica ( $U.mg^{-1}$ ) de poligalacturonase (Tabela 11), analisados a 10%



de probabilidade, demonstram que apenas os termos quadráticos das variáveis concentração de fase líquida da polpa de café, concentração de sulfato de amônio e temperatura apresentaram significância, nesse nível de probabilidade. Os efeitos negativos dessas variáveis indicam a existência de um ponto de máximo (curvatura da parábola para baixo) para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

A análise de variância para a atividade de poligalacturonase, produzida por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, está sumarizada na Tabela 11, por meio da qual nota-se que a regressão apresentou significância estatística, a 10% de probabilidade.

Os resultados são mais bem compreendidos ao se analisar as curvas de contorno, elaboradas aplicando-se a Equação 6, as quais estão ilustradas na Figura 14. Na Figura 14A está ilustrada a concentração de fase líquida da polpa de café *versus* concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , com a temperatura fixada no ponto central (25 °C;  $x_3=0$ ); na Figura 14B, a concentração de fase líquida da polpa de café *versus* temperatura, com a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fixada no ponto central (0,5 g/L,  $x_2=0$ ) e na Figura 14C, em que é plotada a variável concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *versus* temperatura, sendo a variável concentração de fase líquida da polpa de café com seu valor fixado no ponto central (80mL/100mL;  $x_1=0$ ).

Tabela 11 ANOVA para a atividade de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	P
Regressão	238,96	9	26,55	3,09	P<0,10
Resíduos	60,18	7	8,60		
Total	299,13	16			

F<sub>tabelado, 10% , 9;7</sub> = 2,72

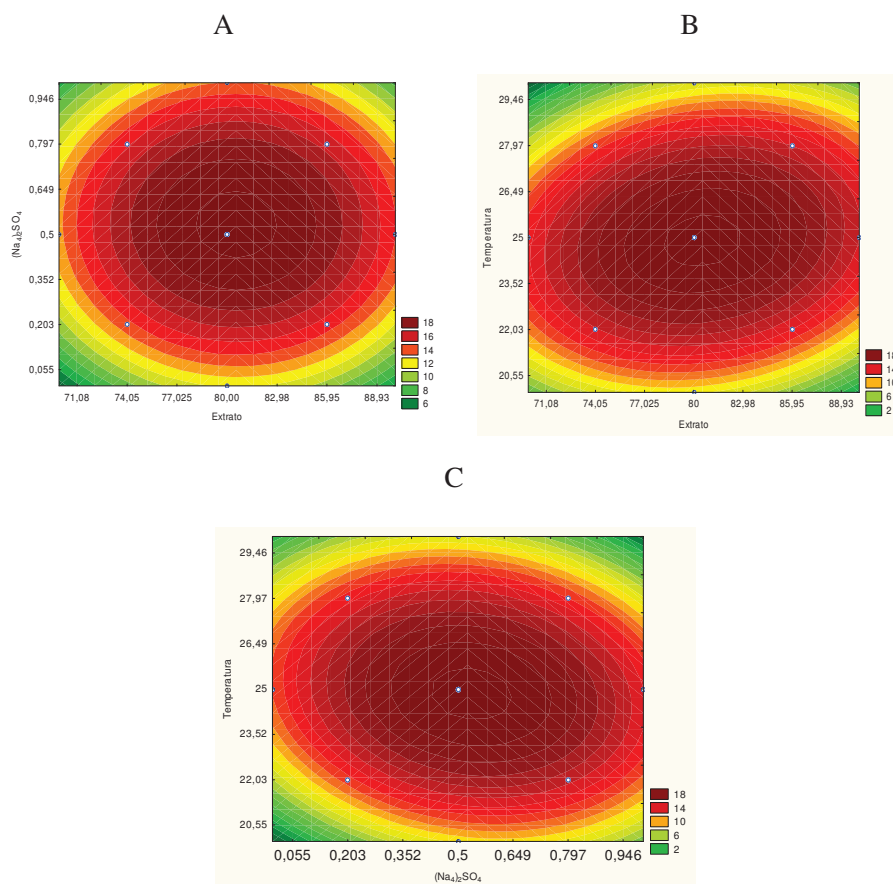


Figura 14 Curvas de contorno para a atividade específica de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus*: (A) concentração de fase líquida da polpa de café *versus* concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , com a temperatura fixada no ponto central (25 °C); (B) concentração de fase líquida da polpa de café *versus* temperatura, com a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fixada no ponto central (0,5 g.L<sup>-1</sup>) e (C) concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *versus* temperatura, sendo a variável concentração de fase líquida da polpa de café com seu valor fixado no ponto central (80mL/100mL)

Por meio das curvas de contorno (Figura 14), observa-se, dentro dos intervalos estudados, que concentrações de fase líquida da polpa de café entre 77

e 85 mL/100mL, concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 0,352 e 0,649 g/L e temperaturas entre 23,52 e 26,46 °C proporcionaram elevada produção de poligalacturonase pela *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Entretanto, em todos os gráficos da Figura 13 fica evidente que a condição de cultivo que resultou em máxima produção de poligalacturonase (aproximadamente 18 U/mg) foi no ponto central do delineamento, correspondente à concentração de fase líquida da polpa de café de 80 mL/100 mL, à concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  igual a  $0,5\text{g.L}^{-1}$  e à temperatura de 25 °C.

Os diferentes métodos utilizados para a determinação da atividade de poligalacturonase, os diferentes microrganismos utilizados como fonte e os diferentes arranjos experimentais levam a um vasto leque de atividades relatadas na literatura.

A atividade da poligalacturonase pode ser quantificada por métodos colorimétricos que dosam os açúcares redutores liberados ou por métodos viscosimétricos que mensuram a redução da viscosidade da mistura reacional (ALIMARDANI-THEIUL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011). Os trabalhos mencionados a seguir foram utilizados para fins de comparação, por utilizarem a mesma metodologia que foi utilizada neste trabalho.

Teixeira, Lima-Filho e Duran (2000) estudaram diferentes fontes de carbono para a produção de pectinases por *Aspergillus japonicus* 586 e encontraram, para a produção de poligalacturonase (endo-PG), atividades máximas em torno de  $0,5\text{ U.mL}^{-1}$ . Os valores máximos obtidos por esses autores estão próximos aos mínimos obtidos na otimização realizada na presente pesquisa (Tabela 10), o que enaltece o uso de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 para a produção de poligalacturonase.

#### 4 CONCLUSÃO

O estudo da forma de obtenção da fase líquida da polpa de café permitiu a seleção do tratamento envolvendo trituração e prensagem à temperatura ambiente como a melhor forma de extração, por permitir a obtenção de açúcares totais, semelhante aos teores dos demais tratamentos e menores concentrações de pectina e compostos fenólicos, quando comparado ao processo em temperaturas elevadas (121 °C), os quais podem prejudicar o uso desse resíduo em processos fermentativos. A fase líquida da polpa de café foi um eficiente diluente do caldo e do melaço de cana-de-açúcar, que pode ser utilizado como potencial substituto da água, uma vez que não provocou inibição do crescimento e tampouco da viabilidade celular da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. A produção de etanol também não foi afetada pela presença da fase líquida da polpa de café nos meios de cultura, sendo o objetivo principal deste trabalho alcançado com êxito. O pH dos meios em que esse resíduo foi adicionado apresentou menor variação, atribuindo-lhe uma característica de tamponamento.

Além disso, otimizaram-se as condições de produção de poligalacturonase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, obtendo-se concentrações enzimáticas (aproximadamente 18 U/mg) ótimas ao se utilizar concentração de fase líquida da polpa de café de 80 mL/100 mL; concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  igual a  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , temperatura de 25 °C, tempo de fermentação de 48 horas, concentração de sólidos solúveis de 12 °Brix e agitação de 150 rpm.

## REFERÊNCIAS

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: an attractive source of pectinases-from gene expression to potential applications: a review. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 46, n. 8, p. 1525–1537, Aug. 2011.

ANTIER, P. et al. Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid- state fermentation of coffee pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, p. 254-260, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Indicadores da indústria de café no Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#tabevol2011>>. Acesso em: 9 jul. 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC International, 1990. 1298 p.

AZIZ, S. et al. Hyper production of ethanol from cane molasses at optimized agitational intensity using indigenous thermotolerant *Kluyveromyces Marxianus*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 750-754, 2011.

BELLAVER, L. H. et al. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 691–698, May 2004.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 34, p. 330-334, 1962.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analysis Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESSANI, R. Potencial uses coffee-berry-by-products In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Coffee Pulp**: composition, technology and utilization. Ottawa: International Development Research Centre, 1978. p. 17–24. (Publication 108e). Disponível em: < <http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/6006/1/34042.pdf> >. Acesso em: 10 dez. 2012.

BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 137-152, 2000. Edição Especial.

BRUNO, L. M. **Secreção de proteínas nativas por *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae***. 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

BRUSCATO, C. et al. Condições de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* para a produção de etanol em biorreator de bancada. In: ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES, 19.; MOSTRA ACADÊMICA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 1., 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul, 2011.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

FAGA, B. A. et al. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 2273–2279, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 371-383, Oct. 1963.

GOUGH, S. et al. Production of ethanol from molasses at 45 °C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 6, p. 389-392, May 1997.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 277-282, Apr. 2000.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, n. 11, p. 641-649, Jan. 1981.

LIMITING, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 17, p. 3367-3374, Dec. 2007.

LUKONDEH, T; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 32, n. 7, p. 284-288, July 2005.

MALTA, M. R. **Colheita e processamento do café**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2010. 3 p. (Circular Técnica, 92).

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1986-1988, Dec. 1952.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 375-380, 1944.

ODA, Y. et al. Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1263-1266, Aug. 2010.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PITT, O. Pectin lyase from *Phoma medicabinis* var. *pinodella*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 161, p. 350-364, 1988.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVICK, O. Pectic enzymes. In: TIPSON, R. S.; HORTON, D. (Ed.). **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York: Academic, 1976. v. 33, p. 323-385.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, London, v.3, n.8, p. 805-810, Mar.1998.

SCHWAN, R.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Feb. 1994.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 21, n. 4, p. 234-244, Sept. 1997.

SILVA, G. K. C. et al. Utilização de resíduo agroindustrial como matéria-prima para a produção de ácido cítrico por *Kluyveromyces marxianus* URM 4404. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 8, n. 5, 2012.



STATISTICA Data Analysis Software System 8.0. Tulsa: Stat-Soft, 2008. Software.

TEIXEIRA, M. F. S; LIMA-FILHO, J. L.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus Japonicus 586*. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, Oct./Dec. 2000.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, London, v. 88, n. 11, p. 2142–2147, Nov. 2009.

TUTTOBELLO, B. R.; MILL, P. J. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. **Biochemistry Journal**, London, v. 79, n. 1, p. 51-56, Apr. 1961

### **CAPÍTULO 3: PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FASE SÓLIDA DA POLPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

#### **RESUMO**

O uso de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol, como a polpa de café que é gerada pelo processamento por via úmida dos frutos do cafeeiro, é uma alternativa economicamente e ecologicamente viável. Entretanto, um dos maiores desafios para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é obter uma maneira eficaz de se produzir glicose a partir da hidrólise da celulose, para depois ser fermentada a etanol. A produção de etanol utilizando resíduos lignocelulósicos requer três etapas: pré-tratamento ou deslignificação, em que a retirada da lignina facilita o acesso das enzimas hidrolíticas ao seu substrato; hidrólise da celulose em glicose, realizada com o uso de ácidos ou celulasas e fermentação, na qual se empregam, normalmente, leveduras. A etapa de pré-tratamento é uma das mais importantes na obtenção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, uma vez que interfere na eficiência das demais etapas. Dessa maneira, objetivou-se, com a presente pesquisa, otimizar o pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café a quente (121 °C) e estudar o pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente, almejando, em ambos os casos, selecionar o tratamento que facilitasse a hidrólise enzimática da celulose. Para a etapa de otimização, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), com as variáveis independentes da capacidade de hidrólise do material pré-tratado. Os resultados apontaram que o pré-tratamento utilizando 4% de hidróxido de sódio, 0% de hidróxido de cálcio e tempo de 25 minutos de pré-tratamento a 121 °C proporcionou os melhores resultados. No estudo à temperatura ambiente (22 a 28 °C), foram testadas duas concentrações de NaOH, 4% e 28% m/v, ao longo de 30 dias de armazenamento, tendo como variáveis respostas as mesmas analisadas no estudo a quente. A análise dos resultados indicou que o pré-tratamento com NaOH 4% m/v proporcionou bons resultados para as variáveis analisadas após 30 dias de armazenamento, o que viabiliza o processo de pré-tratamento por não necessitar da etapa de aquecimento.

Palavras-chave: Etanol. Fase sólida da polpa de café. Pré-tratamento alcalino.

## ABSTRACT

The use of lignocellulosic residues, such as coffee pulp which is generated by wet processing of the coffee berry, for ethanol production, is economically and environmentally feasible alternative. However, a major challenge for the production of ethanol from lignocellulosic materials is to obtain an effective way of producing glucose from cellulose hydrolysis, to then be fermented to ethanol. Ethanol production using lignocellulosic residues requires three steps: pretreatment or oxygen delignification, where the removal of lignin facilitates hydrolytic enzyme access to its substrate; hydrolysis of cellulose to glucose, carried out with use of acids or cellulase and fermentation, where yeasts are typically employs. The pretreatment step is one of the most important in obtaining ethanol from lignocellulosic biomass since it interferes with the efficiency of the other stages. Thus, the aim of the present research was to optimize the alkali pretreatment of the hot coffee pulp solid phase (121° C) and studying the alkaline pretreatment at ambient temperature, aiming in both cases, to select the treatment that facilitates enzymatic hydrolysis of cellulose. For the optimization step a central composite rotational design (CCRD) was used, with the independent variables hydrolysis capacity of pre-treated material. The results showed that pretreatment using 4% sodium hydroxide solution, 0% calcium hydroxide and pretreatment time of 25 minutes at 121° C gave the best results. In the study room temperature (22-28° C) two concentrations of NaOH: 4% and 28% w / v, were tested over 30 days of storage, having as response variables, the same as those analyzed in the hot study. The results indicated that the pretreatment with NaOH 4% w / v gave good results for the measured variables after 30 days of storage, thus enabling the pretreatment not to require the heating step.

Keywords: Ethanol. Solid phase of coffee pulp. Pre-alkali treatment.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de etanol, na atualidade, é conquistada utilizando-se açúcares simples (como a sacarose, obtida da cana-de-açúcar no Brasil) ou amido (obtido de grãos, como o milho nos Estados Unidos da América), obtendo-se o etanol de primeira geração (AGBOR et al., 2011), o que tem sido amplamente debatido em termos da sustentabilidade do processo.

O uso de resíduos na produção de etanol é extremamente interessante, por minimizar os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado desses resíduos e agregar valor aos mesmos, em virtude da obtenção de um produto de elevado potencial econômico.

Dessa maneira, a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas seria uma alternativa viável, uma vez que tais matérias-primas não competem com a produção de alimentos (como acontece com o milho e com a cana-de-açúcar) e são menos dispendiosas do que as matérias-primas agrícolas (ALVIRA et al., 2010).

O café, planta originária da Etiópia, tem se destacado na agricultura brasileira desde a época da escravidão, sendo um dos principais produtos agrícolas do Brasil e, especialmente, do estado de Minas Gerais. Durante o seu beneficiamento por via úmida, quando os cafés são descascados, despolpados ou desmucilados, é gerado o resíduo denominado polpa de café (PANDEY et al., 2000), que contém, em base seca, 50% de carboidratos, dos quais 27,65% correspondem à celulose, 12,40% de açúcares redutores, 2,02% de açúcares não redutores e 6,52% de substâncias pécticas (BRESSANI, 1978). Embora seja tradicionalmente empregada como fertilizante, como substituta em ração animal ou destinada à biocompostagem, a polpa de café apresenta grande potencial para ser utilizada em bioprocessos (PANDEY et al., 2000).

Apesar da diferente composição dos materiais lignocelulósicos entre uma espécie e outra, os componentes principais são, aproximadamente, 50% a 60% de carboidratos na forma de celulose e hemicelulose e entre 20% e 35% de lignina (GALBE; ZACCHI, 2012). Para a conversão da biomassa lignocelulósica em etanol são necessários, pelo menos, dois passos essenciais: hidrólise da celulose para ser convertida em açúcares fermentescíveis e fermentação dos açúcares em etanol. A hidrólise (também chamada de sacarificação), normalmente, é realizada por celulasas e a fermentação, por leveduras ou bactérias (SUN; CHENG, 2002).

A biomassa lignocelulósica é bastante resistente à hidrólise enzimática em virtude da forte associação entre os constituintes poliméricos (celulose, hemicelulose e lignina) e devido à cristalinidade da celulose (PEDERSEN, MEYER, 2010). O processo responsável por transformar qualquer biomassa lignocelulósica de sua forma nativa para uma forma que favoreça a hidrólise enzimática é denominado pré-tratamento (LYND et al., 2002). Existem diferentes tipos de pré-tratamentos, como físicos, físico-químicos, químicos, biológicos, elétricos ou, ainda, uma combinação destes (ALVIRA et al., 2010; GALBE; ZACCHI, 2012), cada qual dotado de vantagens e desvantagens.

Um dos principais tipos de pré-tratamentos é o químico, realizado por base (ou simplesmente pré-tratamento alcalino), particularmente por dissolver, de forma muito eficiente, a lignina, além de remover grupos acetila e vários substituintes dos ácidos urônicos que diminuem a susceptibilidade da celulose e hemicelulose à hidrólise enzimática (WAN; ZHOU; LI; 2011). Além de aumentar a solubilização da lignina, o tratamento alcalino ocasiona o inchaço da celulose, aumentando a sua porosidade (NLEWEM; THARASH JR., 2010), facilitando a hidrólise enzimática. Diversos tipos hidróxidos vêm sendo empregados no pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, como hidróxido de sódio, de potássio e de amônia.

Almejando a verificação de quão eficiente é o pré-tratamento, faz-se necessária a avaliação da conversão da celulose do material pré-tratado em glicose. A transformação da celulose em glicose catalisada por celulases (mistura de várias enzimas celulolíticas) é um processo complexo que envolve a atuação coordenada de três celulases principais:  $\text{exo-1,4-}\beta\text{-Dglucanases}$  (celobioidrolase),  $\text{endo-1,4-}\beta\text{-Dglucanases}$  (endoglucanase) e  $\beta\text{-1,4-glicosidases}$  (celobiase). As celobioidrolases atacam as extremidades da cadeia de celulose, enquanto as endoglucanases hidrolisam as cadeias de celulose pelo meio e reduzem o grau de polimerização. A adição de doses de  $\beta\text{-1,4-glicosidase}$  é essencial por reduzir a inibição proporcionada pela celobiose (GARCÍA-APARÍCIO et al., 2007; DYK; PLETSCHEKE, 2012). Mesmo que o mecanismo ainda não esteja totalmente elucidado, tem sido relatado que a remoção de xilanas por xilanases melhora a digestão da celulose em decorrência da redução do revestimento de xilana (presentes na hemicelulose) e das ligações com a celulose (KUMMAR; WYMAN, 2009).

A fim de aproveitar o potencial biotecnológico da polpa de café, objetivou-se, com a presente pesquisa, analisar o pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café, por meio da otimização do pré-tratamento alcalino a quente, com base no tipo de hidróxido a ser utilizado, NaOH e  $\text{Ca(OH)}_2$ , e tempo de processo, bem como avaliar o pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente da fase sólida da polpa de café, utilizando NaOH em duas concentrações (4% e 28% m/v), almejando, em ambos os casos, selecionar o tratamento que facilitasse a hidrólise enzimática.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima e obtenção da fase sólida da polpa de café**

A polpa de café cereja (*Coffea arabica* L.), oriunda do beneficiamento por via úmida, foi cedida por produtores da região rural de Lavras, MG. As amostras foram transportadas (em saco plástico) ao Laboratório Central de Análises no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram congeladas e armazenadas em freezer, a  $-5\pm 2$  °C. Para ser utilizado, o material foi descongelado e passou por um processo de trituração em liquidificador industrial, seguido de prensagem em prensa mecânica, almejando a retirada do excesso de água. A fração sólida recebeu a denominação de fase sólida da polpa de café, a qual foi utilizada nos experimentos descritos nos próximos itens.

### **2.2 Análises químicas e físico-químicas da fase sólida da polpa de café**

A fase sólida da polpa de café foi caracterizada química e físico-quimicamente quanto aos parâmetros potencial hidrogeniônico (pH), umidade, extrato etéreo, proteína, cinzas, fibra bruta, celulose, hemicelulose, lignina e extrativos. Todos os parâmetros foram analisados no Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

#### **2.2.1 Potencial hidrogeniônico (pH)**

Foi mensurado pelo método potenciométrico. Para tanto, 5 g da fase sólida da polpa de café foram triturados em politron, com 50 mL de água destilada. Em seguida, mediu-se o pH da solução resultante.

### **2.2.2 Umidade**

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico com secagem em estufa regulada a 65 °C, por 48 horas (tempo gasto para atingir o peso constante), de acordo com metodologia proposta pela Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1990). Os resultados foram expressos em porcentagem (% ou g de umidade/100 g de fase sólida da polpa de café).

### **2.2.3 Extrato etéreo**

O teor de extrato etéreo da fase sólida da polpa de café foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente, conforme metodologia descrita pela AOAC (1990), expressando-se os resultados em porcentagem (% ou g de extrato etéreo/100 g de fase sólida da polpa de café).

### **2.2.4 Proteína bruta**

Para a determinação do conteúdo de proteína bruta presente na fase sólida da polpa de café, adotou-se o método microkjeldhal, utilizando-se o fator de conversão (de nitrogênio em proteína) igual a 6,25, de acordo a AOAC (1990). Os resultados foram dados em porcentagem (% ou g de proteína bruta/100 g de fase sólida da polpa de café).

### **2.2.5 Cinzas**

O conteúdo de cinzas, ou resíduo mineral fixo, foi determinado pelo método gravimétrico, baseado na determinação da perda de peso do material submetido a aquecimento a 550 °C, como descrito EM AOAC (1990). Os



resultados foram expressos em porcentagem (% ou g de cinzas/100 g de fase sólida da polpa de café).

### **2.2.6 Fibra bruta**

O conteúdo de fibra bruta foi extraída por hidrólise ácida e quantificada por gravimetria, de acordo com metodologia proposta por Kamer e Ginkel (1952), com os resultados dados em porcentagem (% ou g de fibra bruta/100 g de fase sólida da polpa de café).

### **2.2.7 Extrato não nitrogenado**

O extrato não nitrogenado foi determinado pela diferença entre 100 e a soma dos demais componentes centesimais: umidade, extrato etéreo, proteína bruta, cinzas e fibra bruta, de acordo com a AOAC (1990).

### **2.2.8 Celulose, hemicelulose e lignina**

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram determinados de acordo com as metodologias propostas por Goering e Soest (1970), Silva (1998) e Soest (1963). Inicialmente, analisaram-se os teores de fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e lignina bruta. O teor de celulose foi determinado de acordo com a equação 1 e o teor de hemicelulose, determinado de acordo com a equação 2.

$$C (\%) = FDA - L \quad (1)$$

em que

$C(\%)$  = porcentagem de celulose;

$FDA$  = porcentagem de fibra em detergente ácido;

$L$  = porcentagem de lignina.

$$HC (\%) = FDN - FDA \quad (2)$$

em que

$HC(\%)$  = porcentagem de hemicelulose;

$FDN$  = porcentagem de fibra em detergente neutro;

$FDA$  = porcentagem de fibra em detergente ácido.

### **2.2.9 Extrativos**

O teor de extrativos foi determinado de acordo com a norma NREL nº10 “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER et al., 2005). Para a etapa de extração, utilizaram-se cartuchos de papel filtro para acomodação das amostras. A extração foi realizada em extrator Soxhlet, utilizando-se etanol como solvente. Os materiais presentes nos cartuchos após a extração foram secos em estufa e o teor de extrativos foi mensurado gravimetricamente, sendo os resultados expressos em porcentagem.

### **2.3 Pré-tratamento alcalino a quente da fase sólida da polpa de café**

Para a remoção da lignina e da hemicelulose da fase sólida da polpa de café é necessária a exposição das moléculas de celulose ao ataque enzimático, para que, finalmente, ocorra a sua conversão em açúcar fermentescível. Foram utilizados diferentes tratamentos alcalinos com hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio, realizando-se delineamento composto central rotacional (DCCR),

avaliando-se três variáveis independentes: concentração de NaOH (% m/v), concentração de Ca(OH)<sub>2</sub> (% m/v) e tempo do tratamento (min) e, como variáveis respostas, teor remanescente de celulose (2.3.1), teor remanescente de hemicelulose (2.3.1), teor remanescente de lignina (2.3.1), rendimento em massa (2.3.2) e eficiência do pré-tratamento (2.3.3).

Esse experimento foi realizado juntamente com o trabalho de Menezes (2012) e os resultados referentes à eficiência desses tratamentos encontram-se discutidos no trabalho deste autor (para que não ocorresse publicação dos mesmos dados, optou-se por excluí-los dessa tese), o qual selecionou o pré-tratamento com NaOH a 4% m/v e o tempo de tratamento de 25 minutos em autoclave (121 °C) como o de maior eficiência.

### **2.3.1 Determinação do teor remanescente de celulose, hemicelulose e lignina após os pré-tratamentos alcalinos**

Os teores residuais ou remanescentes (aqueles que permaneceram na biomassa após pré-tratamento alcalino) de celulose, hemicelulose e lignina foram quantificados de acordo com a equação (3). Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$Rx(\%) = \frac{W_f}{W_0} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

em que

Rx (%): percentual de celulose (RC), hemicelulose (RH) e lignina (RL);

W<sub>0</sub>: quantidade, em massa (g), do constituinte na polpa de café seca;

W<sub>f</sub>: quantidade, em massa (g), do constituinte na polpa de café pré-tratada seca.

### 2.3.2 Obtenção do rendimento em massa

O rendimento em massa foi calculado utilizando-se a equação (4). Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$\text{Rend}_{\text{massa}} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

em que

$\text{Rend}_{\text{massa}}$ : rendimento, em massa, em base úmida;

$M_f$ : massa final da fase sólida da polpa prensada após pré-tratamento com solução alcalina (g);

$M_i$ : massa inicial da fase sólida da polpa de café prensada (g).

### 2.3.3 Eficiência do pré-tratamento

A eficiência do pré-tratamento é uma variável que proporciona analisar conjuntamente as quantidades remanescentes de celulose, lignina e hemicelulose, sendo os melhores tratamentos aqueles que proporcionam maiores quantidades de celulose e menores quantidades de hemicelulose e lignina (MENEZES, 2012).

$$Ef = RC / (RH + RL) \quad (5)$$

## 2.4 Hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada a quente

Objetivando demonstrar melhores condições de pré-tratamento alcalino a quente que proporcionassem a maior conversão da biomassa pré-tratada em

açúcares fermentescíveis, realizou-se um DCCR, em esquema de fatorial completo  $2^3$ , com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, resultando em 17 ensaios. Foram avaliadas 3 variáveis independentes, sendo concentração de NaOH (% m/v), concentração de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (% m/v) e tempo do tratamento (min.), cujos valores codificados e reais encontram-se na Tabela 1, sendo a temperatura do processo fixada em 121 °C e a pressão em 1 atm.

Tabela 1 Níveis do planejamento experimental para otimização do pré-tratamento alcalino a quente da fase sólida da polpa de café.

Variável	-1,6818	-1	0	1	1,6818
[NaOH] (% m/v)	0	1,63	4	6,37	8
[Ca(OH) <sub>2</sub> ] (% m/v)	0	1,63	4	6,37	8
Tempo (min)	16,5	20	25	30	33,4

Para a elaboração dos 17 meios reacionais, foram utilizados erlenmeyers de 1 L contendo 100 g de fase sólida da polpa de café e 500 mL da solução alcalina designada a cada ensaio, resultando na concentração de 20% m/v da fase sólida da polpa de café. Em seguida, os meios referentes a cada ensaio foram submetidos ao aquecimento, a 121 °C e pressão de 1 atm em autoclave, pelo tempo determinado no planejamento experimental.

Após o término do aquecimento, a biomassa pré-tratada foi filtrada e, em seguida, lavada com cerca de 1 L de água destilada quente (70 °C) para a retirada de material superficialmente aderido à biomassa, como a lignina em solução. Lavou-se a fase sólida da polpa de café pré-tratado com um volume de 5 L de água, volume esse necessário para que fosse atingido um pH neutro na fase sólida da polpa de café pré-tratada. Após esses procedimentos, a fase sólida

da polpa de café pré-tratado foi prensada para a retirada da água excedente. Os resíduos líquidos gerados em todas as etapas foram coletados em frascos plásticos e armazenados em geladeira, a  $10\pm 3$  °C.

Todos os pré-tratamentos realizados na fase sólida da polpa de café (correspondentes ao planejamento fatorial contido na Tabela 1) foram caracterizados quanto à facilidade de hidrólise enzimática, medida em termos do teor de açúcares redutores totais, do percentual de glicose e da conversão da celulose em glicose, após a ação enzimática. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software Statistica 8.0 (STATISTICA, 2008).

Para a hidrólise enzimática foram utilizadas as enzimas celulase (Celluclast 1.5L),  $\beta$ -glicosidase (NS 22118) e endoxilanase (NS 22083), cedidas gentilmente pela Novozymes<sup>®</sup>, sendo adicionadas após o pré-tratamento.

A atividade enzimática da celulase foi mensurada de acordo com a metodologia de Ghose (1987), sendo expressa em unidades de papel filtro (Whatman<sup>®</sup> n°1) por mL (FPU/mL). Para a determinação da atividade da  $\beta$ -glicosidase utilizou-se a metodologia de Wood e Bhat (1988), empregando, como substrato, uma solução de celobiose 15 mmol/L, sendo expressa em unidades de celobiose por mL (CBU/mL). A atividade da xilanase foi realizada de acordo com metodologia de Bailey, Biely e Poutanen (1992), utilizando, como substrato, madeira de bétula (“birchwood” Sigma<sup>®</sup>) e os açúcares liberados foram mensurados pelo método DNS (2.4.1), sendo os resultados dados em U/mL (uma unidade de atividade de xilanase é a quantidade de enzimas requerida para liberar 1  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto). Foram encontradas as seguintes atividades enzimáticas: 69,25 FPU/mL, 288CBU/mL e 2438U/mL, para celulase,  $\beta$ -glicosidase e endoxilanase, respectivamente.

A etapa de hidrólise procedeu-se em tampão citrato (pH = 4,8), temperatura de 50 °C e agitação de 150 rpm. O volume final de cada um dos 17 tratamentos (com 3 repetições de cada) foi de 40 mL para cada 10 g de fase

sólida da polpa de café pré-tratado e prensado. Utilizou-se a proporção de 10:1:5 (enzima/substrato) de celulase (2mL ou 13,82 FPU/g de substrato): $\beta$ -glicosidase (0,2 mL ou 5,76 CBU/g de substrato):endoxilanase (1 mL ou 243,8 U/g de substrato), de acordo com García-Aparício et al. (2007). A faixa de celulase utilizada está dentro da relatada na literatura (de 7 a 33 FPU/g de substrato, de acordo com Sun e Cheng, 2002).

#### **2.4.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART)**

As concentrações de açúcares redutores totais foram mensuradas consoante metodologia do ácido dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959). Para tanto, foi construída uma curva padrão de sacarose, relacionando a absorbância lida a 540 nm com as concentrações de açúcares redutores totais. Os resultados foram expressos em g de ART.L<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2 Quantificação da glicose**

As determinações dos conteúdos de glicose nas amostras pré-tratadas e hidrolisadas foram realizadas por meio do kit enzimático GOD PAD (Laborlab<sup>®</sup>). Para tanto, em tubos de ensaio de 10 mL, o conteúdo de 10  $\mu$ L de cada amostra foi acrescido de 1,0 mL do kit enzimático GOD PAP e, sequencialmente, incubado em banho termostatizado, a 30 °C, por 10 minutos. A reação foi interrompida por diminuição abrupta da temperatura, utilizando-se banho de gelo para paralisar a atividade enzimática. As amostras foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda regulado a 500 nm. Os resultados foram encontrados por meio da curva de calibração preparada com o uso do kit enzimático e solução padrão de glicose, sendo expressos em g de glicose. L<sup>-1</sup>.

### 2.4.3 Conversão da celulose do material pré-tratado em glicose após hidrólise enzimática

A conversão da celulose do material pré-tratado em glicose após hidrólise enzimática foi calculada utilizando-se a equação 6, considerando-se somente a celulose presente na fase sólida da polpa de café pré-tratado.

$$Conv_{celulose}(\%) = \frac{(G_f - G_b) \times 0,9}{C_0} \times 100 \quad (6)$$

em que

$G_f$ : concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (g de glicose/L de meio após a hidrólise);

$G_b$ : concentração de glicose no branco (tratamento realizado sem as enzimas) (g de glicose/L de meio);

$C_0$ : concentração de celulose no material pré-tratado (g de celulose/L meio a ser hidrolisado).

### 2.5 Estudo do reuso da solução alcalina no pré-tratamento da fase sólida da polpa de café

Com o objetivo de minimizar os custos inerentes ao reagente utilizado (NaOH) e diminuir a quantidade de efluente gerado, estudou-se o reuso da solução alcalina de NaOH de concentração inicial de 4% m/v por 5 ciclos de deslignificação.

Para cada ciclo, foram preparados 4 erlemeyers de 1 L contendo 100 g de fase sólida da polpa de café. No primeiro ciclo, utilizaram-se 500 mL da solução de 4% m/v de NaOH, em cada repetição. Em seguida, as soluções foram submetidas a um aquecimento, a 121 °C e pressão de 1 atm em autoclave, pelo



tempo de 25 minutos. Após o término do aquecimento, a biomassa pré-tratada foi filtrada e, em seguida, lavada com cerca de 1 L de água destilada quente (70 °C) e com 5 L de água em temperatura ambiente. A fase sólida da polpa de café pré-tratado foi prensada e caracterizada quanto ao rendimento em massa (2.3.2), ao teor de umidade (2.2.2), ao teor remanescente de celulose (2.3.1), ao teor remanescente de hemicelulose (2.3.1) e ao teor remanescente de lignina (2.3.1). Após a caracterização, a biomassa pré-tratada foi submetida à hidrólise enzimática (2.4) e avaliada quanto à concentração de glicose (2.4.2) e à conversão de celulose em glicose (2.4.3). Os resíduos líquidos gerados após primeira filtragem (após o primeiro ciclo de pré-tratamento) foram utilizados no ciclo seguinte e assim sucessivamente até o quinto ciclo.

### **2.5.1 Análises dos resíduos líquidos gerados após cada etapa de reuso**

Os resíduos líquidos gerados após cada ciclo de reuso foram analisados quanto a:

- a) pH: método potenciométrico;
- b) demanda química de oxigênio (DQO): digestão por refluxo fechado e leitura em espectrofotometria de acordo com as metodologias propostas pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, APHA, 1998), método 5220 D;
- c) sólidos totais (ST), método gravimétrico com secagem em estufa regulada a 105 °C, como descrito método 2540 B do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998);
- d) sólidos totais fixos (STF) e sólidos totais voláteis (STV) pelo método 2540 E, descrito no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), sendo os STF determinados gravimetricamente por

incineração em mufla, a 550 °C e os STV, pela diferença entre os ST e os STF.

## **2.6 Pré-tratamentos alcalinos à temperatura ambiente da fase sólida da polpa de café**

Pensando na facilidade do procedimento e na economia da energia dispensada à etapa de aquecimento em autoclave, procedeu-se ao estudo do processo de pré-tratamento da fase sólida da polpa de café à temperatura ambiente. Para tanto, foram utilizadas duas concentrações de NaOH: 4% m/v (usada nos experimentos anteriores) e 28% (conforme Ko et al.; 2009). Foram estudados 4 tempos de tratamento: 5, 10, 20 e 30 dias. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 1 L, contendo, em cada um, 500 mL de solução alcalina. Após o tempo determinado, realizaram-se filtração e lavagens (a quente e a frio), como descrito nos procedimentos anteriores. A fase sólida da polpa de café pré-tratada foi prensada e analisada quanto às variáveis rendimento em massa (2.3.2), teor de umidade (2.2.2), teor remanescente de lignina (2.3.1), teor remanescente de celulose (2.3.1) e teor remanescente de hemicelulose (2.3.1). A biomassa pré-tratada foi hidrolisada enzimaticamente (2.4) e avaliada quanto à concentração de glicose (2.4.2) e à conversão de celulose em glicose (2.4.3).

As temperaturas máxima e mínima ambiente foram mensuradas diariamente por meio de um termômetro de máxima e mínima (Alla France®). As médias de temperaturas máximas e mínimas observadas foram de 22 °C e 28 °C.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização da polpa de café

Antes de iniciar os experimentos de deslignificação e hidrólise da fase sólida da polpa de café, procedeu-se à caracterização da polpa de café, quanto ao pH e à composição centesimal, incluindo umidade, extrato etéreo, proteína bruta, cinzas, fibra bruta e extrato não nitrogenado (carboidratos). Da porção fibra, quantificou-se o percentual de celulose, hemicelulose e lignina. Por último, foram dosados os extrativos presentes na matéria-prima. Os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 Composição da polpa de café.

Componente	Base úmida	Base seca
pH	4,55	---
Umidade (%)	82,19	---
Extrato etéreo (%)	0,58	3,26
Proteína bruta (%)	1,78	10,00
Cinzas (%)	1,41	7,90
Fibra bruta (%)	3,47	19,50
Extrato não nitrogenado (carboidratos) (%)	10,57	---
Celulose (%)	3,67	20,60
Hemicelulose (%)	3,06	17,20
Lignina (%)	2,76	15,50
Extrativos (%)	---	27,50

Os valores de extrato etéreo, proteína bruta e fibra bruta relatados por Bressani (1978), ao analisar a polpa de café, foram muito próximos dos observados na presente pesquisa, sendo de 2,5% de extrato etéreo, 10% de proteína bruta e 19,5% de fibra bruta (em base seca). Os valores de celulose e hemicelulose encontrados neste trabalho foram inferiores aos relatados por Barcelos et al. (2002), que relataram 23,45% de hemicelulose e 36,77% de celulose. O teor de lignina também se distanciou dos reportados por Salmones, Mata e Waliszewski (2005), que encontraram 26% de lignina na polpa de café seca. Essas diferenças incitam à ideia de variabilidade natural de composição química desta matéria-prima (MENEZES, 2012).

O teor de extrativos encontrado para a polpa de café ficou acima dos citados na literatura para outras matérias-primas, demonstrando um elevado teor de compostos solúveis em etanol. Nlewen e Tharash Jr. (2010) relataram o percentual de 15% de extrativos para a grama switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Pelos resultados apresentados, pode-se perceber a variabilidade no teor de extrativo nas diversas matérias-primas, em decorrência das diferentes composições.

### **3.2 Hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café após alicação dos pré-tratamentos alcalinos**

Como o objetivo principal do pré-tratamento realizado em materiais lignocelulósicos é a retirada dos componentes que impedem o acesso das enzimas hidrolíticas (celulases) ao substrato (celulose), após a aplicação dos pré-tratamentos, foi realizada uma hidrólise padrão, contendo as enzimas celulase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase, visando à obtenção de carboidratos fermentescíveis (sobretudo a glicose). Verificou-se também quais condições de pré-tratamentos foram responsáveis por proporcionar maior conversão da celulose em glicose (o que se traduz em melhor atividade enzimática).

Os teores de açúcares redutores totais, glicose e conversão de celulose em glicose obtidos após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café, pré-tratado de diferentes formas (após aplicação do DCCR), encontram-se na Tabela 3, assim como os resultados de dois tratamentos controles que foram realizados (os quais não participaram do DCCR), o tratamento 18, que se refere à hidrólise da fase sólida da polpa de café sem pré-tratamento e tratamento e o 19, no qual se utilizou água em substituição às soluções alcalinas.

Tabela 3 Teores de açúcares redutores totais, glicose e conversão da celulose em glicose da polpa de café pré-tratada, segundo planejamento fatorial DCCR, acrescido de dois ensaios (18 e 19).

Ensaio	[NaOH]	[Ca(OH) <sub>2</sub> ]	Tempo	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Conversão* (%)
1	+1	+1	+1	78,64	20,2	53,84
2	+1	+1	-1	26,81	16,78	37,74
3	+1	-1	-1	81,81	21,04	47,33
4	+1	-1	+1	81,43	22,57	56,11
5	-1	-1	-1	27,19	13,94	39,90
6	-1	-1	+1	24,03	15,53	39,55
7	-1	+1	-1	17,60	11,03	38,77
8	-1	+1	+1	9,07	12,1	47,91
9	0	0	+1,6818	14,67	12,72	42,66
10	0	0	-1,6818	18,27	12,17	30,89
11	0	1,6818	0	73,39	19,76	53,54
12	0	-1,6818	0	103,78	30,41	69,11

Tabela 3, continuação

13	1,6818	0	0	91,41	28,39	63,24
14	-1,6818	0	0	14,45	9,26	37,35
15	0	0	0	31,00	19,98	45,98
16	0	0	0	34,34	20,21	45,69
17	0	0	0	34,90	19,46	44,33
18				20,14	4,98	18,42
19				20,82	5,03	17,21

\*Conversão da celulose em glicose.

Os baixos valores encontrados para todas as variáveis-respostas analisadas para os tratamentos 18 e 19 mostram a necessidade do pré-tratamento (neste caso alcalino) da fase sólida da polpa de café, a fim de disponibilizar a celulose ao ataque enzimático, garantindo a produção do seu monômero glicose.

De posse dos resultados das variáveis-respostas obtidos experimentalmente após aplicação do DCCR, determinaram-se os coeficientes de regressão (cuja análise estatística encontra-se na Tabela 4) e ajustaram-se os modelos dispostos na Tabela 5, por meio da qual se podem observar os elevados valores dos coeficientes de determinação, mostrando que as variáveis-respostas ajustaram-se muito bem aos modelos preditos. O quadro da análise de variância, disponível na Tabela 6, mostra a significância da fonte de variação regressão para ambos os casos.

Tabela 4 Resultados dos coeficientes da equação sobre a concentração de glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e conversão da celulose em glicose (%) após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café.

	Glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ )		Conversão da celulose em glicose (%)	
	Coeficiente	p-valor	Coeficiente	p-valor
Média	20,017	0,000	45,628	0,000
(1)[NaOH] (L)	4,405	0,000	5,304	0,006
[NaOH] (Q)	-0,834NS	0,283	0,739NS	0,640
(2)[Ca(OH)2] (L)	-2,261	0,010	-2,256NS	0,144
[Ca(OH)2] (Q)	1,380NS	0,096	4,638	0,018
(3) Tempo (L)	0,625NS	0,369	3,915	0,025
Tempo (Q)	-3,089	0,004	-4,041	0,032
1Lx2L	-0,036NS	0,967	-2,386NS	0,225
1Lx3L	0,286NS	0,746	2,010NS	0,299
2Lx3L	0,171NS	0,846	2,099NS	0,280
R <sup>2</sup> (%)	92,7		88,5	

NS: não significativo, a 5% de probabilidade.

Tabela 5 Modelos preditos e seus respectivos coeficientes de determinação para as variáveis-respostas concentração de glicose e conversão da celulose em glicose.

Equação	Modelo predito	R <sup>2</sup>
7	$[Glicose] = 20,02 + 4,41x_1 - 0,83x_1^2 - 2,26x_2 + 1,38x_2^2 + 0,63x_3 - 3,09x_3^2 - 0,04x_1x_2 + 0,29x_1x_3 + 0,17x_2x_3$	0,927
8	$\text{Conversão da celulose em glicose} = 46,63 + 10,61x_1 + 1,48x_1^2 - 4,51x_2 + 9,28x_2^2 + 7,34x_3 - 8,08x_3^2 - 4,77x_1x_2 + 4,02x_1x_3 + 4,20x_2x_3$	0,885

$x_1$ = concentração de NaOH,  $x_2$  = concentração de Ca(OH)<sub>2</sub> e  $x_3$ = tempo de tratamento.

Tabela 6 ANOVA para concentração de glicose e conversão da celulose em glicose.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F <sub>calc</sub>	P
Glicose (g.L <sup>-1</sup> )					
Regressão	526,154		57,350	9,909	P<0,05
Resíduos	40,514		5,788		
Total	556,667				
Conversão da celulose em glicose (%)					
Regressão	1385,096	9	153,8996	5,9798	P<0,05
Resíduos	180,157	7	25,73674		
Total	1565,253	16			

As curvas de contorno obtidas por meio da Equação 7, para a concentração de glicose, estão ilustradas na Figura 1. Os resultados da análise estatística para essa variável resposta indicaram que foram significativos (a 5% de significância) os termos linear da concentração de hidróxido de sódio, linear da concentração de hidróxido de cálcio e quadrático do tempo. O termo linear da concentração de hidróxido de sódio apresentou efeito positivo, indicando que um aumento em sua concentração proporciona maior concentração de glicose após conversão enzimática da celulose. O contrário foi observado para o efeito do termo linear da concentração de hidróxido de cálcio, o qual apresentou efeito negativo, indicando que quanto maior for a concentração de hidróxido de cálcio, menor será a concentração de glicose obtida após hidrólise enzimática da celulose. O termo quadrático do tempo apresentou efeito negativo, indicando que existe um tempo ótimo de pré-tratamento, antes e depois do qual observa-se uma diminuição da concentração de glicose.



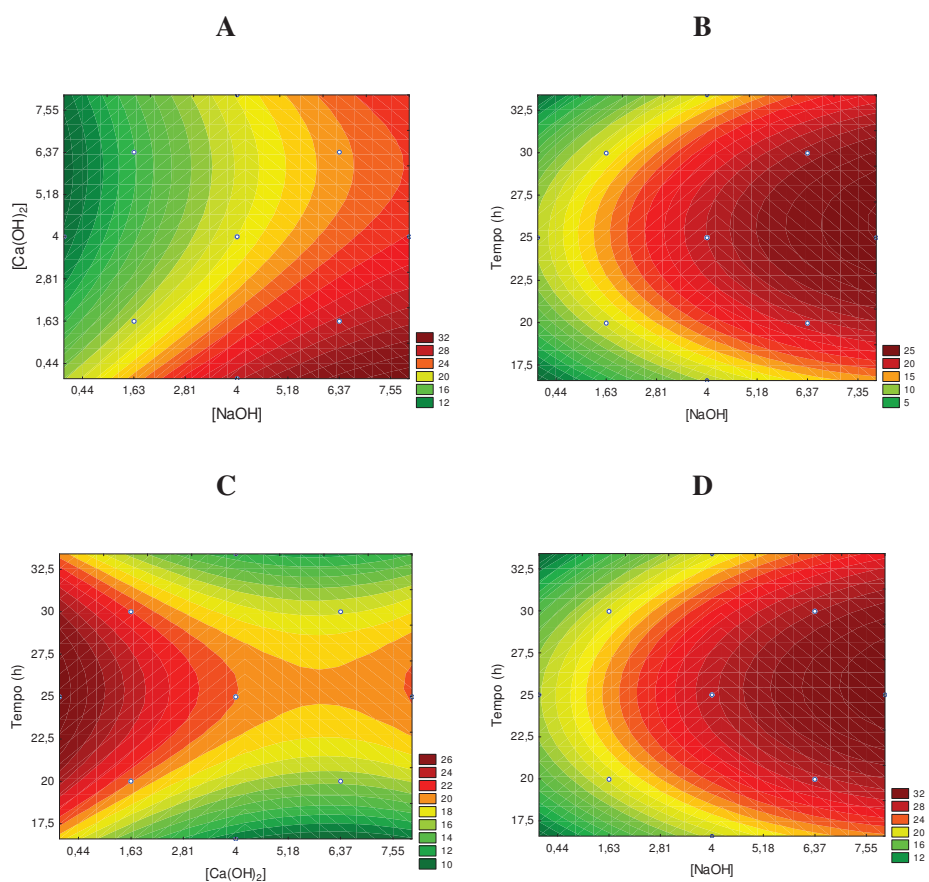


Figura 1 Curvas de contorno para a concentração de glicose obtida após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada: (A) [Na(OH)] *versus* [Ca(OH)<sub>2</sub>], sendo o tempo fixado no ponto central – 25 minutos, (B) [Na(OH)] *versus* tempo sendo a [Ca(OH)<sub>2</sub>] fixada no ponto central – 4% m/v, (C) [Ca(OH)<sub>2</sub>] *versus* tempo sendo a [NaOH] fixada no ponto central – 4% m/v e (D) [NaOH] *versus* tempo para a eficiência do pré-tratamento da polpa de café considerando 0% de Ca(OH)<sub>2</sub>

A análise da Figura 1A demonstra que, quando o tempo foi fixado em 25 minutos, as concentrações de NaOH foram superiores a 4% m/v e as

concentrações de  $\text{Ca(OH)}_2$  estavam abaixo de 0,44%, foram obtidas concentrações de glicose próximas a  $28 \text{ g.L}^{-1}$ . Quando a concentração de  $\text{Ca(OH)}_2$  é fixada em 4% (Figura 1B), concentrações de NaOH próximas a 7,35% e tempo de 25 minutos proporcionaram a obtenção de cerca de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. Pela Figura 1C pode-se notar que baixas concentrações de  $\text{Ca(OH)}_2$  e tempo de reação entre 22,5 e 27,5 minutos levam à maior obtenção de glicose quando a concentração de NaOH é 4% m/v. Ao fixar-se a concentração de  $\text{Ca(OH)}_2$  em 0% (Figura 1D), uma vez que ela apresentou efeito linear negativo, foi possível observar claramente o efeito da concentração de NaOH. Quanto maior concentração de NaOH, maior teor de glicose foi obtido, sendo que, ao se utilizar o tempo de reação de 25 minutos e concentrações de NaOH em torno de 7,35%, alcançaram-se as maiores concentrações de glicose.

Para a conversão da celulose em glicose, foram significativos, a 5% de probabilidade, termo linear da concentração de hidróxido de sódio (com efeito positivo), quadrático da concentração de hidróxido de cálcio (com efeito positivo), linear do tempo (com efeito positivo) e quadrático do tempo (com efeito negativo). As curvas de contorno para a conversão da celulose em glicose estão dispostas na Figura 2.

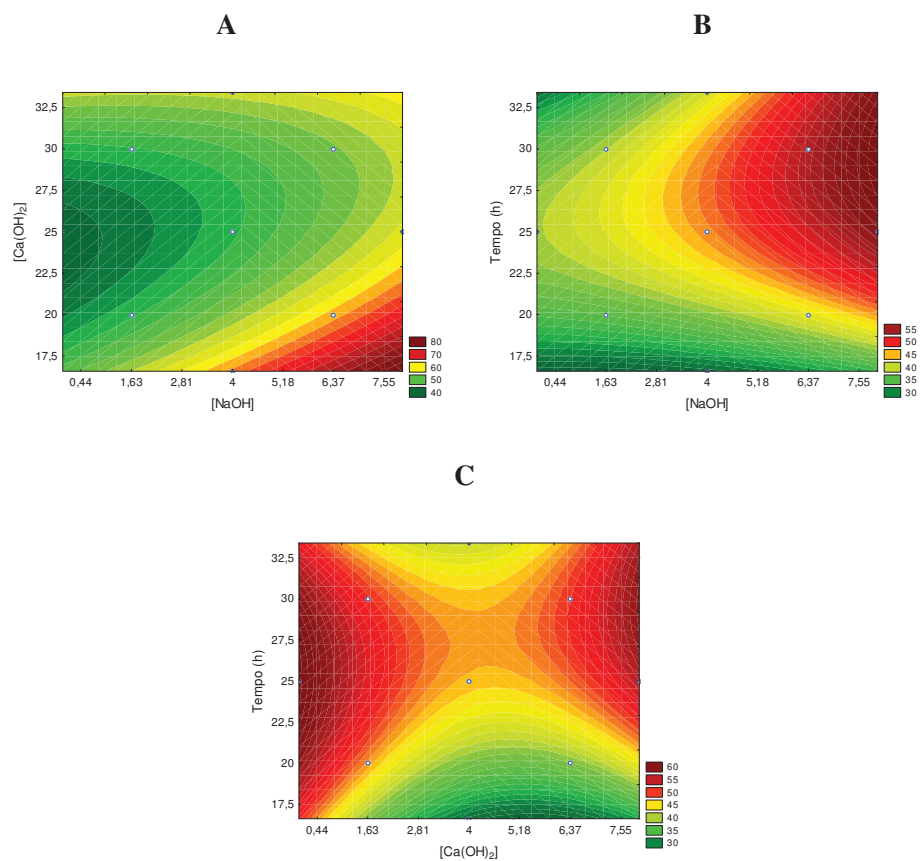


Figura 2 Curvas de contorno para conversão da celulose em glicose obtida da fase sólida da polpa de café pré-tratada após hidrólise enzimática: (A) [Na(OH)] versus [Ca(OH)<sub>2</sub>], sendo o tempo fixado no ponto central – 25 minutos, (B) [Na(OH)] versus tempo, sendo a [Ca(OH)<sub>2</sub>] fixada no ponto central – 4% m/v e (C) [Ca(OH)<sub>2</sub>] versus tempo, sendo a [NaOH] fixada no ponto central – 4% m/v

A análise da Figura 2 mostra que melhores conversões da celulose em glicose ocorreram ao se utilizar menores concentrações de  $\text{Ca(OH)}_2$ , tempos superiores a 20 minutos e concentrações de NaOH acima de 4% m/v. Pode-se notar que, ao se utilizar 4% m/v de NaOH, deve-se fazer uso de baixas concentrações de  $\text{Ca(OH)}_2$  e adotar tempos de pré-tratamento entre 20 a 30 minutos ou concentrações de  $\text{Ca(OH)}_2$  acima de 7,55% e tempos superiores a 30 minutos, com a finalidade de se conquistar elevadas conversões da celulose em glicose. A última condição citada seria desfavorável por utilizar mais reagente e aumentar o gasto energético devido ao maior tempo de tratamento.

Silva (2011) obteve elevada concentração de glicose a partir da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar expolido a vapor e pré-tratado com hidróxido de amônio a 15% sob temperatura de 100 °C, com valores próximos a 45 g/L de glicose. No bagaço de cana-de-açúcar tratado apenas com hidróxido de amônio a 15%, sob temperatura de 100 °C, sem explosão a vapor, o valor máximo de glicose obtido foi de, aproximadamente, 11 g/L. É importante salientar que as diferenças encontradas entre alguns trabalhos da literatura e os dados desta pesquisa podem ser provenientes de diversos fatores, que vão desde o tipo de enzima e o tempo utilizados na hidrólise, até as diferenças existentes entre as matérias-primas bagaço de cana e polpa de café, quanto à composição química.

Após análise de todas as variáveis respostas analisadas, pode-se perceber que tempos de aquecimento próximos ao ponto central (25 minutos), ausência de  $\text{Ca(OH)}_2$  e concentrações de NaOH elevadas (iguais ou superiores a 4% m/v) resultam em melhores remoções de lignina e hemicelulose, maiores eficiências e elevadas concentrações de celulose e glicose, além de grandes conversões de celulose em glicose, sendo, portanto, as melhores condições de pré-tratamento para a fase sólida da polpa de café.

### 3.3 Reuso da solução de hidróxido de sódio 4% em ciclos de deslignificação

Com o objetivo de minimizar os custos dispensados ao reagente e à produção de resíduos líquidos (também chamados de licores) decorrentes do pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café, realizou-se o estudo do reaproveitamento desse resíduo líquido, por cinco ciclos subsequentes. Foram quantificados os rendimentos em massa, o teor de celulose remanescente, o teor de hemicelulose remanescente, o teor de lignina remanescente e a eficiência do pré-tratamento. Os resultados para as médias das variáveis mencionadas anteriormente, assim como o resultado do teste de comparação de médias (teste de Tukey), estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 Médias dos rendimentos em massa, teores de celulose remanescente, teores de hemicelulose remanescente, teores de lignina remanescente e eficiências dos pré-tratamentos realizados com o reuso do resíduo alcalino por cinco ciclos.

Ciclo	Rend <sub>Massa</sub> (%)	RC*	RH*	RL*	Ef	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Conversão de celulose em glicose (%)
1	19,56 <sup>b</sup>	73,88 <sup>b</sup>	40,91 <sup>b</sup>	22,65 <sup>b</sup>	1,16 <sup>a</sup>	27,35 <sup>a</sup>	61,79 <sup>a</sup>
2	18,53 <sup>b</sup>	69,99 <sup>b</sup>	38,53 <sup>b</sup>	22,40 <sup>b</sup>	1,16 <sup>a</sup>	27,08 <sup>a</sup>	61,14 <sup>a</sup>
3	18,65 <sup>b</sup>	67,14 <sup>b</sup>	41,29 <sup>b</sup>	23,58 <sup>b</sup>	1,05 <sup>a</sup>	26,58 <sup>a</sup>	63,25 <sup>a</sup>
4	19,26 <sup>b</sup>	70,12 <sup>b</sup>	56,01 <sup>a</sup>	30,59 <sup>a</sup>	0,81 <sup>b</sup>	20,19 <sup>b</sup>	44,44 <sup>b</sup>
5	23,17 <sup>a</sup>	87,32 <sup>a</sup>	63,28 <sup>a</sup>	33,46 <sup>a</sup>	0,91 <sup>ab</sup>	17,84 <sup>b</sup>	39,77 <sup>b</sup>
CV(%)	5,48	14,35	10,36	9,88	11,59	6,39	5,63

\* Teores iniciais iguais a 100%.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Abreviações utilizadas: Rend<sub>Massa</sub> = rendimento em massa; RC = teor de celulose remanescente; RH = teor de hemicelulose remanescente e RL = teor de lignina remanescente; Ef = eficiência.

O rendimento em massa manteve-se estatisticamente semelhante até o 4º ciclo de reuso, apresentando média superior no 5º ciclo de pré-tratamento. Para o teor de celulose, foi observado que, nos quatro primeiros ciclos, as médias apresentaram semelhança estatística, tendo a média do 5º ciclo sido superior às demais. O teor remanescente de hemicelulose manteve-se o mesmo (apresentou semelhança estatística) por 4 ciclos de pré-tratamento, sendo a maior média observada no 5º ciclo. As menores médias observadas para o teor de lignina remanescente no material pré-tratado foram detectadas nos três primeiros ciclos, indicando que o reuso do resíduo líquido do pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH 4% m/v atua eficientemente na remoção de lignina por três ciclos. As eficiências de todos os ciclos foram muito próximas, tendo a menor média sido observada no quarto ciclo de reuso. Os maiores teores de glicose e de conversão de celulose em glicose foram observados até o terceiro ciclo de reuso, sendo as médias do 4º e 5º ciclo de reuso estatisticamente semelhantes entre si e menores que as demais.

Nguyen et al. (2010), visando à reutilização do resíduo de líquido iônico (acetato de 1-etil-3-metilimidazol) utilizado para o pré-tratamento de casca de arroz (previamente pré-tratada com hidróxido de amônio a 10%), estudaram 20 ciclos de reuso e observaram o contrário do que foi constatado nesta pesquisa: uma redução no conteúdo de celulose (de 82%, no primeiro ciclo para 74%, no vigésimo ciclo). Entretanto, os dados obtidos pelos autores quanto à conversão de celulose em glicose corroboram o que foi observado no presente estudo, uma vez que os autores observaram uma diminuição de 97% (primeiro ciclo) para 78% de conversão de glicose (vigésimo ciclo), representando cerca de 20% de perda da conversão da celulose em glicose do vigésimo ciclo em relação ao primeiro.

A fim de caracterizar os extratos líquidos gerados a cada ciclo de reuso, foram analisados pH, teores de demanda química de oxigênio, conteúdo de

sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis. Observando-se os dados contidos na Tabela 8, pode-se notar que o pH dos dois primeiros ciclos foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores aos demais. O pH sofreu um decréscimo ao longo dos ciclos de reuso, indicando que uma menor concentração de íons (hidroxila e sódio) estava disponível para reagir com a lignina, podendo diminuir a eficiência do pré-tratamento. As menores médias de eficiência observadas para o 4º e 5º ciclo corroboram os menores teores de lignina observados nesses ciclos, indicando que, quando o pH da solução de NaOH se encontra em pH abaixo de 13, a deslignificação fica comprometida.

A matéria orgânica foi estimada com base na DQO e no teor de sólidos totais voláteis. A DQO representa a quantidade de oxigênio requerida para oxidar a matéria orgânica carbonácea e, como pode ser visto pelos dados da Tabela 8, o teor de DQO nos líquidos obtidos após cada ciclo de pré-tratamento aumentou (a partir do segundo ciclo), indicando o gradual aumento da matéria carbonácea oxidável, em virtude do acúmulo desse material proveniente da matéria-prima. O valor de DQO encontrados por Rabelo (2011) para o resíduo líquido oriundo do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio (0,49 g de hidróxido de cálcio/g de biomassa, 90 horas, 90 °C e carga de 8% m/v de sólidos) foi de 21,5 g.L<sup>-1</sup>, muito próximo ao observado nesta pesquisa para o primeiro ciclo (29,95 g.L<sup>-1</sup>).

O conteúdo de sólidos totais (fixos + voláteis) do resíduo líquido do pré-tratamento da fase sólida da polpa de café aumentou ao longo dos ciclos de reuso e o conteúdo de sólidos totais fixos (resíduo mineral fixo) manteve-se invariável durante todos os ciclos de reuso. O menor teor de sólidos totais voláteis foi encontrado no resíduo líquido gerado no primeiro ciclo de pré-tratamento. Os teores de sólidos totais voláteis dos resíduos líquidos gerados no segundo e no terceiro ciclos foram estatisticamente semelhantes e maiores que o observado no primeiro ciclo. Os maiores valores observados para o teor de

sólidos totais voláteis foram detectados no resíduo líquido do quarto e do quinto ciclos de reuso do resíduo líquido do pré-tratamento da fase sólida da polpa de café, indicando um aumento da matéria orgânica, o que concorda com o aumento observado nos teores remanescentes de hemicelulose e lignina.

Os resumos das ANOVAs para todas as variáveis encontram-se nas Tabelas 19A a 23A.

Tabela 8 Médias de potencial hidrogeniônico, demanda química de oxigênio, sólidos totais, sólidos totais fixos e sólidos totais voláteis do resíduo líquido do pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café, durante 5 ciclos de reuso.

Ciclo	pH	DQO (g.L <sup>-1</sup> )	ST (mg.L <sup>-1</sup> )	STF (mg.L <sup>-1</sup> )	STV (mg.L <sup>-1</sup> )
1	13,40 <sup>a</sup>	29,95 <sup>d</sup>	72533,33 <sup>c</sup>	42466,67 <sup>a</sup>	30066,67 <sup>c</sup>
2	13,42 <sup>a</sup>	55,50 <sup>d</sup>	86200,00 <sup>d</sup>	459977,78 <sup>a</sup>	40222,22 <sup>b</sup>
3	13,17 <sup>b</sup>	78,98 <sup>c</sup>	91266,67 <sup>c</sup>	47133,33 <sup>a</sup>	44133,33 <sup>b</sup>
4	11,02 <sup>c</sup>	100,31 <sup>b</sup>	996466,67 <sup>b</sup>	40726,70 <sup>a</sup>	55740,00 <sup>a</sup>
5	9,83 <sup>d</sup>	132,68 <sup>a</sup>	1102866,70 <sup>a</sup>	39400,00 <sup>a</sup>	63466,67 <sup>a</sup>
CV(%)	0,21	0,86	1,74	12,33	7,76

Médias seguidas de mesma letra na coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Abreviações utilizadas: pH = potencial hidrogeniônico; DQO = demanda química de oxigênio; ST = sólidos totais; STF = sólidos totais fixos e STV = sólidos totais voláteis.



### **3.4 Pré-tratamento alcalino da fase sólida da polpa de café à temperatura ambiente**

Como o hidróxido de sódio apresentou os melhores resultados na concentração de 4% m/v nos estudos realizados anteriormente, procedeu-se ao estudo do pré-tratamento a frio utilizando essa concentração do reagente e também uma concentração sete vezes maior (28% m/v), de acordo com Ko et al. (2009).

Os resultados para os teores remanescentes de celulose, hemicelulose e lignina, rendimento em massa, teor de glicose e conversão da celulose em glicose, para cada concentração de NaOH testada, durante o armazenamento, encontram-se na Tabela 9 (Tabelas 24A a 29A). Para as variáveis teor remanescente de hemicelulose e lignina, rendimento em massa e concentração de glicose, observou-se interação significativa entre as concentrações de NaOH e os tempos de armazenamento. Para o teor remanescente de celulose, apenas o tipo de tratamento apresentou significância estatística. Já para a conversão da celulose em glicose, a única variável que foi significativa, a 5% de probabilidade, foi o tempo de armazenamento.

Tabela 9 Valores médios para os teores remanescentes de celulose (RC), hemicelulose (RH) e lignina (RL), rendimento em massa ( $R_{\text{massa}}$ ), concentração de glicose e conversão da celulose em glicose, para cada concentração de NaOH testada (4 ou 28%), durante os 30 dias de armazenamento.

Tempo (dias)	RC* (%)		RH*(%)		RL*(%)	
	NaOH (4% m/v)	NaOH (28% m/v)	NaOH (4% m/v)	NaOH (28% m/v)	NaOH (4% m/v)	NaOH (28% m/v)
5	80,51 <sup>a</sup>	70,68 <sup>b</sup>	75,70 <sup>a</sup>	72,53 <sup>b</sup>	58,81 <sup>a</sup>	49,71 <sup>b</sup>
10	81,13 <sup>a</sup>	70,06 <sup>b</sup>	66,85 <sup>a</sup>	56,75 <sup>b</sup>	55,57 <sup>a</sup>	40,46 <sup>b</sup>
20	81,33 <sup>a</sup>	69,13 <sup>b</sup>	50,33 <sup>a</sup>	47,55 <sup>b</sup>	34,73 <sup>a</sup>	27,59 <sup>b</sup>
30	82,03 <sup>a</sup>	69,51 <sup>b</sup>	48,02 <sup>a</sup>	47,90 <sup>a</sup>	21,27 <sup>a</sup>	19,62 <sup>a</sup>
CV (%)	2,69		2,98		5,54	
Tempo (dias)	$R_{\text{massa}}$ *(%)		Glicose (g.L <sup>-1</sup> )		Conversão de celulose em glicose (%)	
	NaOH (4% m/v)	NaOH (28% m/v)	NaOH (4% m/v)	NaOH (28% m/v)	NaOH (4% m/v)	NaOH (28% m/v)
5	37,44 <sup>a</sup>	32,01 <sup>b</sup>	12,02 <sup>a</sup>	12,50 <sup>a</sup>	39,63 <sup>a</sup>	40,63 <sup>a</sup>
10	35,48 <sup>a</sup>	28,60 <sup>b</sup>	13,97 <sup>a</sup>	14,29 <sup>a</sup>	45,46 <sup>a</sup>	43,68 <sup>a</sup>
20	29,99 <sup>a</sup>	23,20 <sup>b</sup>	18,92 <sup>b</sup>	20,71 <sup>a</sup>	54,06 <sup>a</sup>	56,95 <sup>a</sup>
30	24,88 <sup>a</sup>	20,70 <sup>b</sup>	23,97 <sup>a</sup>	24,47 <sup>a</sup>	60,97 <sup>a</sup>	61,30 <sup>a</sup>
CV(%)	2,25		4,39		6,69	

\* Teores iniciais iguais a 100%.

Médias seguidas de mesma letra entre as duas colunas referentes à concentração de NaOH (4% ou 28%) para cada variável (RC, RH, RL,  $R_{\text{massa}}$ , glicose, conversão da celulose em glicose) não apresentaram diferenças estatísticas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O teor remanescente de celulose e o rendimento em massa para a fase sólida da polpa de café após o pré-tratamento com NaOH a 4% m/v foram estatisticamente superiores aos encontrados após a aplicação do pré-tratamento com a solução de NaOH a 28% m/v, em todos os tempos de armazenamento. Na pesquisa de Wan, Zhou e Li (2011), fato semelhante foi observado, ou seja, a massa recuperada (rendimento em massa) de palha de soja após pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente diminuiu de 88,66% para 78,62%, quando a quantidade de NaOH foi aumentada de 4% para 40% m/m.

Na Figura 3 mostra-se a variação do rendimento em massa para a fase sólida da polpa de café pré-tratado com NaOH 4% ou 28% m/v, ao longo do armazenamento, por meio da qual nota-se a diminuição do rendimento em massa com os dias de armazenamento.

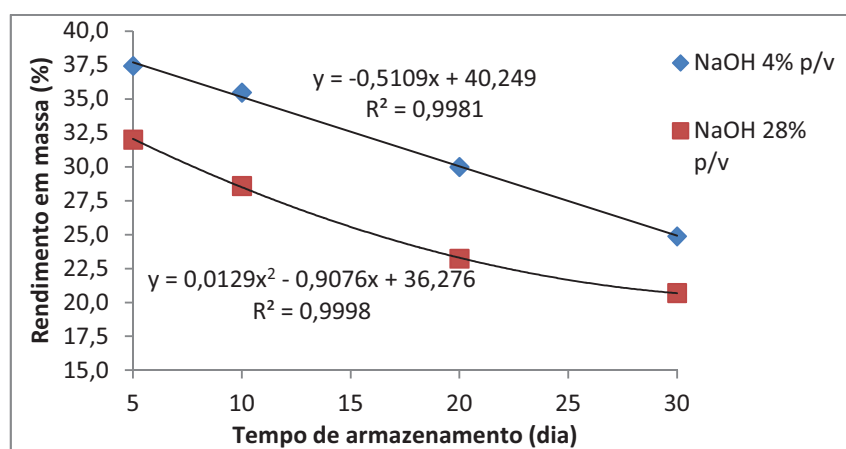


Figura 3 Variação do rendimento em massa observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH nas concentrações de 4% m/v ou 28% m/v, ao longo de 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente

O teor remanescente de hemicelulose e o de lignina apresentaram comportamento semelhante. Ambas as variáveis apresentaram maiores médias quando a fase sólida da polpa de café foi pré-tratada com a menor concentração de NaOH, até 20 dias de armazenamento. Com 30 dias de armazenamento, o teores de hemicelulose e lignina verificados após aplicação dos dois tratamentos com NaOH (4% e 28%) foram estatisticamente semelhantes. Esses resultados demonstram que maiores concentrações de NaOH proporcionam maior remoção dos componentes hemicelulose e lignina (remoção esta necessária a uma eficiente conversão enzimática da celulose em glicose), até 20 dias de tratamento à temperatura ambiente. Wan; Zhou; Li (2011) também observaram uma maior redução no teor de lignina ao utilizar NaOH 40% (m/m), da ordem de 24,78%, em comparação à quantidade de lignina removida ao se utilizar NaOH 4% (m/m), que foi cerca de metade do valor obtido com NaOH 40% (m/m).

Por meio da Figura 4 pode-se observar a diminuição do teor de hemicelulose ao longo dos dias de armazenamento e, pela Figura 5, observa-se a diminuição do teor de lignina ao longo do armazenamento. A redução dessas variáveis é extremamente benéfica à hidrólise enzimática da celulose, que culmina em liberação de glicose.

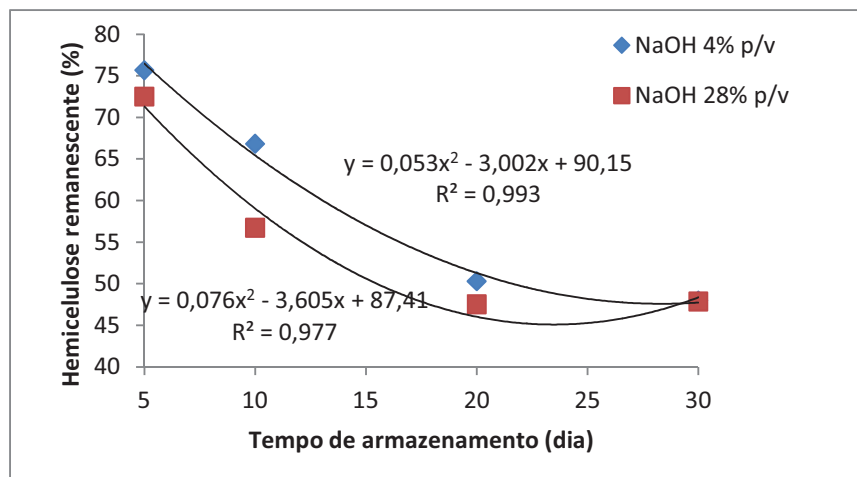


Figura 4 Variação do teor remanescente de hemicelulose observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH, nas concentrações de 4% m/v ou 28% m/v, ao longo de 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente

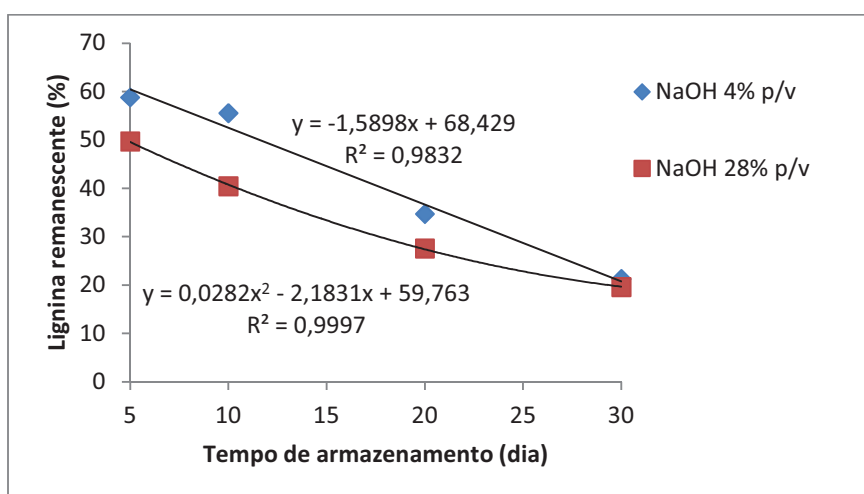


Figura 5 Variação do teor remanescente de lignina observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH, nas concentrações de 4% m/v ou 28% m/v, ao longo de 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente

A maior concentração de NaOH proporcionou maior eficiência nos tempos iniciais de pré-tratamento, sendo verificados os valores de eficiência de 0,657 e 0,810, para os tempos 5 e 10 dias, respectivamente, em comparação aos valores de 0,599 (5 dias) e 0,663(10 dias) de eficiência verificados ao se utilizar a solução de NaOH 4% m/v. Aos 20 dias de armazenamento, a solução de NaOH 4% m/v destacou-se por ser mais eficiente do que a solução do mesmo hidróxido a 28% m/v, sendo as eficiências de 0,958 para NaOH 4% m/v e 0,920 NaOH 28% m/v. Com 30 dias de armazenamento, a eficiência das duas concentrações de NaOH testadas foram estatisticamente semelhantes (1,184 para NaOH 4% m/v e 1,030 NaOH 28% m/v). Com o aumento do tempo de armazenamento, observa-se um aumento na eficiência do pré-tratamento alcalino (Figura 6).

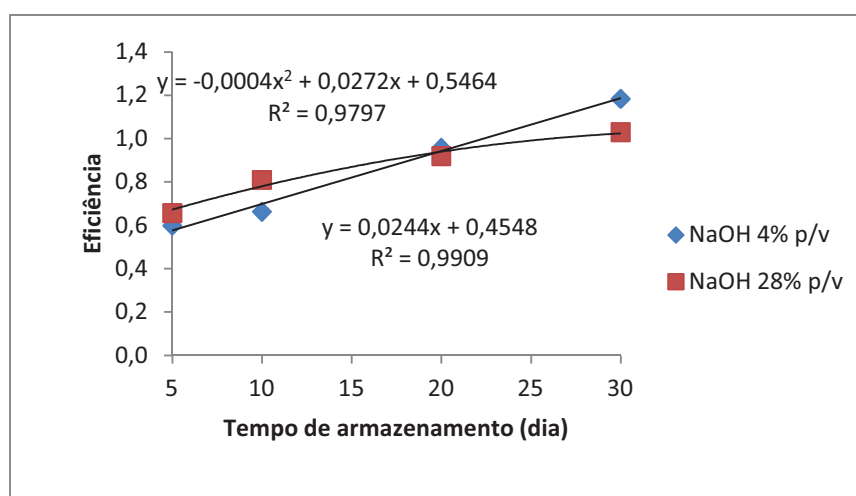


Figura 6 Variação da eficiência observado após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH (4% m/v ou 28% m/v), ao longo de 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente

As concentrações de glicose obtidas após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% m/v foram estatisticamente semelhantes aos valores observados ao se utilizar NaOH 28% m/v para o pré-tratamento referente aos tempos 5, 10 e 30 dias. No tempo 20 dias, a concentração de glicose observada para a fase sólida pré-tratado com NaOH 4% m/v foi estatisticamente inferior ao valor notado na fase sólida pré-tratada com NaOH 28% m/v, o que é contraditório com o observado para a eficiência. A partir dos 20 dias de armazenamento, maiores eficiências foram observadas para a fase sólida pré-tratada com NaOH 4% m/v, ou seja, maiores valores na relação  $RC/(RL+RH)$  foram detectados após uso da solução de NaOH 4% m/v, em comparação com os valores observados após o uso da solução de NaOH 28% m/v.

De acordo com Agbor et al. (2011), tem sido proposto que pelo menos 50% da hemicelulose devem ser removidos para aumentar significativamente a digestibilidade da celulose. O valor observado para a hemicelulose removida (hemicelulose removida = 100 - hemicelulose remanescente) para a solução de NaOH 28% foi de, aproximadamente, 52,45% e, para NaOH 4% m/v, foi de 49,69%, o que pode ter originado a diferença estatística observada.

Na Figura 7 nota-se o aumento da concentração de glicose ao longo dos tempos de armazenamento, o que corrobora o aumento da eficiência.

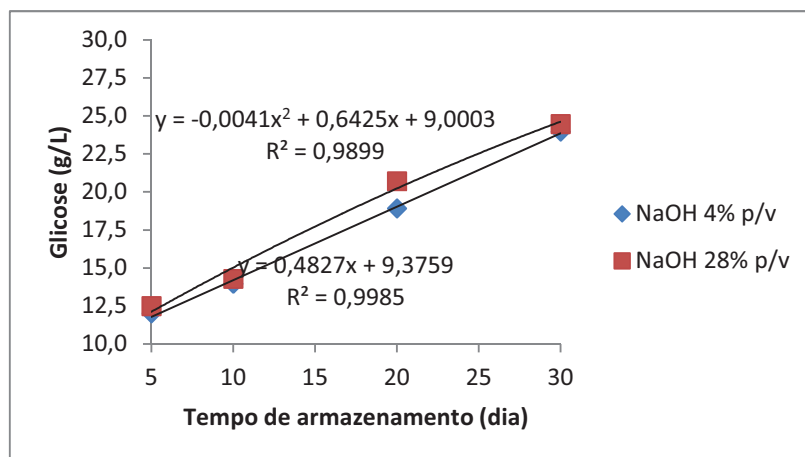


Figura 7 Variação da concentração de glicose observada após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH (4% m/v ou 28% m/v), ao longo de 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente

Apenas o tempo de armazenamento apresentou significância estatística para a conversão de celulose em glicose, indicando que as diferentes concentrações de etanol proporcionaram conversões da celulose em glicose estatisticamente semelhantes, durante todos os tempos de armazenamento avaliados. A variação da conversão de celulose em glicose ao longo do tempo é mostrada na Figura 8, por meio da qual se pode observar um aumento na conversão de celulose em glicose com o tempo de armazenamento, concordando com o que foi observado para a eficiência e para a concentração de glicose.



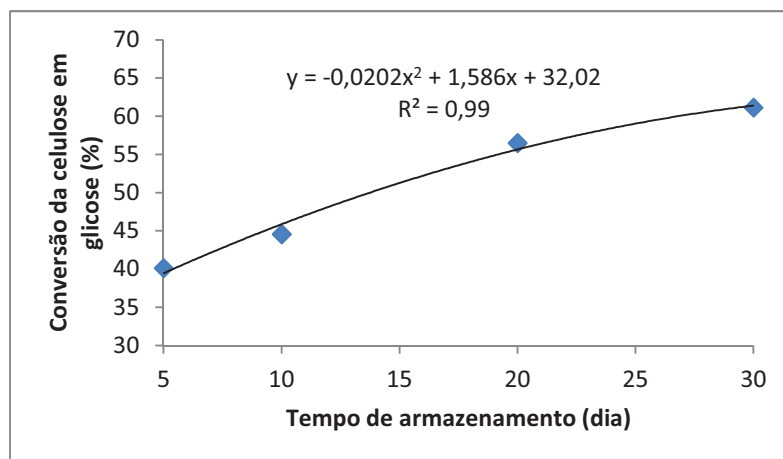


Figura 8 Variação da conversão de celulose observada após pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com NaOH (4% m/v ou 28% m/v), ao longo de 30 dias de armazenamento, à temperatura ambiente

Os valores mais baixos de conversão de celulose em glicose foram observados nos menores tempos de armazenamento (39,63% de conversão para o material pré-tratado com NaOH 4% m/v e 40,63% para a biomassa pré-tratada com NaOH 48% m/v) e, ao final de 30 dias de armazenamento, as porcentagens de conversão da celulose em glicose na fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% m/v e com NaOH 28% m/v foram de 60,97% e 61,30%, respectivamente.

Panagiopoulos et al. (2010) observaram um aumento na conversão de celulose em glicose em bagaço de sorgo pré-tratado com NaOH (à temperatura ambiente, por 4 horas) ao se aumentar a concentração 2% para 12% m/m, tendo a maior conversão observada sido de 33,8% de conversão. Na presente pesquisa não foram encontradas diferenças estatísticas entre as conversões da celulose em glicose nos materiais pré-tratados com NaOH 4% m/v e com NaOH 28%, ressaltando que o tempo adotado neste trabalho foi bastante superior ao utilizado por Panagiopoulos et al. (2010).

#### 4 CONCLUSÃO

O pré-tratamento alcalino a quente da fase sólida da polpa de café proporcionou grandes concentrações de glicose ( $30,41 \text{ g.L}^{-1}$ ) e ótimos resultados de conversão da celulose em glicose (cerca de 69%), ao se utilizar a condição otimizada: 4% de NaOH, 0% de  $\text{Ca(OH)}_2$  e um tempo em torno de 25 minutos. Foi possível o reuso do resíduo líquido gerado após o pré-tratamento da fase sólida da polpa de café com hidróxido de sódio a quente por 25 minutos, por 3 ciclos consecutivos, sem perda de eficiência. O estudo do pré-tratamento alcalino à temperatura ambiente apontou que não é necessária maior concentração de hidróxido de sódio do que 4% m/v, a fim de atingir-se boa conversão da celulose em glicose (60,97% de conversão), se o tempo de armazenamento for de 30 dias.

## REFERÊNCIAS

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 6, p. 675–685, Nov./Dec. 2011.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, July 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 1117 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. American Water Works Association. Water Environmental Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20<sup>th</sup> ed. Washington, 1998.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 257-270, May 1992.

BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros bromatológicos da casca e polpa desidratada de café em diferentes períodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, jul./ago. 2002.

DYK, J. S. van.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, New York, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, Nov. 2012.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, Nov. 2012.

GARCÍA-APARICIO, M. P. et al. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136–140, n. 1-12, p. 353-365, Apr. 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOERING, H. K.; SOEST, P. J. van. **Agricultural handbook**. Washington: ARS USDA, 1970.

KAMMER, S. B. van de; GINKEL, L. van. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 19, n. 4, p. 239-251, July/Aug. 1952.

KO, J. K. et al. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 18, p. 4374-4380, May 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 18, p. 4203–4213, Sept. 2009.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–77, Sept. 2002.

MENEZES, E. G. T. **Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café**. 2012. 236 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

NGUYEN, T. A. D. et al. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocelluloses conversion to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 19, p. 7432-7438, Oct. 2010.

NLEWEM, K. C.; THARASH Jr., M. E. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 14, p. 5426-5430, July 2010.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. et al. Pretreatment of sweet sorghum bagasse for hydrogen production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 15, p. 7738-7747, Aug. 2010.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PEDERSEN, A.; MEYER, A. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 739-750, Dez. 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 5, p. 537-544, Mar. 2005.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 1998.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade de São Carlos, São Carlos, 2011.

SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005.

STATISTICA Data Analysis Software System 8.0. Tulsa: Stat-Soft, 2008. Software.

SOEST, P. J. van. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, London, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.

SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, May 2002.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, May 2011.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, n. 1, p. 87-116, 1988.

**CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, UTILIZANDO FASE SÓLIDA DA POLPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR PROCESSOS DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SEPARADAS, SIMULTÂNEAS E SEMISSIMULTÂNEAS**

**RESUMO**

Uma das alternativas mais promissoras para a obtenção de etanol é a conversão de biomassas lignocelulósicas em açúcares passíveis de fermentação. Dentro dos materiais lignocelulósicos, destaca-se a polpa de café, principal resíduo gerado no beneficiamento desse fruto por via úmida. Este resíduo merece atenção quanto à sua utilização, almejando-se, sobretudo, a obtenção de produtos com alto valor agregado e a minimização dos impactos ambientais decorrentes do lançamento desses rejeitos nos recursos naturais, sem tratamento adequado. Para que materiais lignocelulósicos, como a polpa de café, sejam convertidos a etanol, três passos são requeridos: pré-tratamento para a retirada da lignina, hidrólise da celulose à glicose e fermentação da glicose a etanol. De posse do material pré-tratado, diferentes tecnologias podem ser utilizadas para a hidrólise e a fermentação da biomassa pré-tratada. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de etanol a partir da fase sólida da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio, por meio dos processos de hidrólise e fermentação separadas (SHF), hidrólise e fermentação semissimultâneas (SSSF) e hidrólise e fermentação simultâneas (SSF). Para a realização de todos os processos, foi utilizada a fase sólida da polpa de café (polpa triturada e prensada) pré-tratada com NaOH 4% m/v, a 121 °C, por 25 minutos. As enzimas utilizadas para a hidrólise foram: celulase,  $\beta$ -glucosidase e xilanase e o microrganismo utilizado na fermentação foi *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Todos os processos foram avaliados quanto aos teores de açúcares redutores, glicose e etanol e acompanharam-se a concentração celular e o pH. Para fins de comparação dos processos, escolheram-se os fatores conversão da celulose em etanol, concentração final de etanol e produtividade volumétrica. Verificou-se, pelos resultados obtidos, que a utilização de fase sólida da polpa de café para a produção de etanol de segunda geração foi viável, tendo os processos SHF e SSSF sido os que proporcionaram maiores concentrações de etanol (21,77 e 21,66 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente) e conversão do

substrato em etanol (0,31 g de etanol/g de celulose para ambos) sendo mais produtivo o processo SHF (0,36 g etanol/ L.h), apontando uma nova aplicação biotecnológica para esse resíduo.

Palavras-chave: Fase sólida da polpa de café. Pré-tratamento alcalino. Hidrólise enzimática. *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Etanol.



## ABSTRACT

One of the most promising alternatives for obtaining ethanol is the conversion of lignocellulosic biomass into sugars susceptible to fermentation. Within the lignocellulosic materials, coffee pulp stands out, which is the main waste generated in the wet processing of the fruit. This residue deserves attention regarding its use aiming mainly to obtain products with high added value and minimize environmental impacts resulting from the release of these wastes in natural resources without proper treatment. For lignocellulosic material, such as coffee pulp, to be converted to ethanol, three steps are required: pretreatment for the removal of lignin, hydrolysis of cellulose to glucose and fermenting glucose to ethanol. In possession of the pre-treated material, different technologies can be used for the hydrolysis and fermentation of the pretreated biomass. The objective of this study was to assess the production of ethanol from the solid phase of coffee pulp pretreated with sodium hydroxide by the procedures of separate hydrolysis and fermentation (SHF), semi-simultaneous saccharification and fermentation (SSSF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Coffee pulp solid phase (ground and pressed pulp) pretreated with NaOH 4% w / v, at 121° C was used for performing all processes, for 25 minutes. The enzymes used for the hydrolysis were: cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase and the microorganism used in fermentation was *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. All cases were evaluated for reducing sugars, glucose and ethanol and cell concentration and pH was accompanied. For purposes of process comparisons, the chosen factors were conversion of cellulose to ethanol, final ethanol concentration and volumetric productivity. It was found that the results obtained using coffee pulp solid phase for the production of second generation ethanol was viable and the SHF and SSSF processes were those that yielded higher ethanol concentrations, (21.77 and 21.66 g L<sup>-1</sup>, respectively) and the SHF process (0.36 g ethanol / L.h) the most productive for conversion of the substrate into ethanol (0.31 g ethanol / g cellulose for both), pointing to a new biotechnological applications for this residue

Keywords: Solid phase of coffee pulp. Alkaline pretreatment. Enzymatic hydrolysis. *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086. Ethanol.

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços industriais e a expansão da indústria de transportes resultam em mudanças notórias no ecossistema, que ocorrem em virtude da emissão de gases poluentes. A fim de se evitar alterações irreversíveis e reduzir o impacto desses gases sobre o clima da Terra, muitos países iniciaram um incentivo à obtenção de fontes renováveis de energia, por exemplo, instigando a produção de combustíveis renováveis em detrimento dos combustíveis fósseis, sendo o etanol um importante candidato (KÁDÁR; SZENGYEL; RÉCZEY, 2004).

No Brasil, o etanol é obtido a partir da cana-de-açúcar e um dos pontos mais discutidos em relação a essa produção tem origem na ocupação de terras destinadas a essa cultura, que compete com o plantio de alimentos. Sendo assim, para a produção sustentável de etanol, materiais lignocelulósicos (compostos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina) têm sido considerados fontes potenciais, por serem vantajosos quanto à evasão da competição com a produção de alimentos e por existir a possibilidade de sua obtenção a partir de resíduos agrícolas (MEJÍA; GUTIÉRREZ; EL-HALWAGI, 2012), o que torna o processo mais barato e compatível com a minimização da poluição causada pela disposição inadequada desses resíduos.

Dentre os materiais lignocelulósicos, pode-se destacar a polpa de café, principal resíduo gerado no beneficiamento desse fruto por via úmida, processo em que os frutos de café são descascados, despolpados ou desmucilados. Devido à sua rica composição em celulose, hemicelulose e lignina, a polpa de café torna-se um substrato promissor para a transformação em etanol.

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos requer a conversão dos componentes celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos simples, os quais são fermentados a etanol (NLEWEM; THARASH Jr., 2010)

que, normalmente, é realizado por complexos enzimáticos celulolíticos. A hidrólise enzimática é chamada de sacarificação.

Entretanto, a tarefa de hidrolisar materiais lignocelulósicos em monossacarídeos fermentescíveis é tecnicamente problemática, uma vez que a digestibilidade da celulose é impedida por muitos fatores físico-químicos e estruturais. Dessa maneira, faz-se necessário um pré-tratamento no material a ser hidrolisado, a fim de quebrar a estrutura de lignina e afetar a estrutura cristalina da celulose, aumentando, assim, o acesso das enzimas à celulose para a hidrólise efetiva (ALVIRA et al., 2010). Um dos principais tipos de pré-tratamentos é o alcalino, particularmente por dissolver de forma muito eficiente a lignina, além de remover grupos acetila e vários substituintes dos ácidos urônicos, que diminuem a susceptibilidade da celulose e da hemicelulose à hidrólise enzimática (WAN; ZHOU; LI; 2011).

Historicamente, existem dois processos de produção de etanol a partir de biomassa: sacarificação e fermentação separadas (SHF) e sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). No primeiro processo, realiza-se, primeiramente, a hidrólise (normalmente a 50 °C) e, ao término desta etapa, as enzimas são inativadas (por temperatura ou produtos químicos) e, posteriormente, realiza-se a fermentação (28-30 °C). Já no segundo processo, a adição de enzimas (celulases) e de leveduras ocorre simultaneamente, portanto, o processo de quebra da celulose e fermentação ocorre ao mesmo tempo (em temperaturas por volta de 42 °C). Se uma pré-hidrólise é aplicada antes do início do processo SSF, em condições ótimas de atuação da celulase (50 °C) e se o substrato não é removido antes de iniciar a fermentação, o processo adquire vantagens dos dois tipos (SHF e SSF). Este processo misto é denominado sacarificação e fermentação semissimultâneas (SSSF) (TOMÁS-PEJÓ, 2009; SHEN; AGBLEVOR, 2011), que é dividido em duas fases: a pré-hidrólise, em que, inicialmente, é adicionada apenas enzima ao substrato, incubando-se por

um período de tempo a uma temperatura ideal para hidrólise e, posteriormente, a temperatura é abaixada, adicionando-se mais enzima e também leveduras, dando início, então, ao processo de sacarificação e fermentação simultâneas.

Embora seja relatada maior produtividade de etanol no processo simultâneo (SSF), o ponto crítico desse processo é a diferença de temperatura ótima entre as enzimas celulasas (50 °C) e o microrganismo empregado normalmente para a fermentação etanólica: leveduras do gênero *Saccharomyces*. Cepas de *Saccharomyces* são bem conhecidas como boas produtoras de etanol, no entanto, elas necessitam de uma temperatura de funcionamento de cerca de 30-35 °C. Temperaturas mais baixas acarretam em taxas de hidrólise reduzidas, aumentando o tempo de processamento. Uma possível solução para o impasse é o uso de leveduras termotolerantes (KÁDAR; SZENGYEL; RÉCZEY, 2004), dentre as quais se destaca *Kluyveromyces marxianus*.

A levedura *Kluyveromyces marxianus* tem sido amplamente utilizada em aplicações biotecnológicas, por ter habilidade de crescer sobre grande variedade de substratos e por ser termotolerante, sendo relatadas cepas com capacidade de crescimento em temperaturas de até 52 °C (LANE; MORRISSEY, 2010). Existem outras vantagens quanto ao uso de leveduras termotolerantes, a saber, economia de energia por meio da redução no custo de resfriamento, maior rendimento de hidrólise, possibilidade de remoção contínua do etanol produzido e diminuição do risco de contaminação (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a produção de etanol a partir da fase sólida da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio, por meio dos processos de sacarificação e fermentação separadas, sacarificação e fermentação simultâneas e sacarificação e fermentação semissimultâneas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Substrato e pré-tratamento alcalino a quente

O substrato utilizado nos experimentos foi a polpa de café cereja (*Coffea arabica* L.), resíduo do processamento desses frutos por via úmida. Tal material foi cedido por produtores da região rural de Lavras, MG. As amostras foram transportadas, ensacadas, até o Laboratório Central de Análises no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e, em seguida, foram congeladas (em freezer, a  $-5\pm 2$  °C). A polpa de café foi anteriormente caracterizada (Capítulo 3) e sua composição está sumarizada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição da polpa de café.

Componente	Base úmida	Base seca
pH	4,55	---
Umidade (%)	82,19	---
Extrato etéreo (%)	0,58	3,26
Proteína bruta (%)	1,78	10,00
Cinzas (%)	1,41	7,90
Fibra bruta (%)	3,47	19,50
Extrato não nitrogenado (carboidratos) (%)	10,57	59,34
Celulose (%)	3,67	20,60
Hemicelulose (%)	3,06	17,20
Lignina (%)	2,76	15,50
Extrativos (%)	---	27,50

Adotou-se um pré-tratamento alcalino a quente, procedimento esse necessário para a remoção de lignina e hemicelulose do substrato, a fim de expor a celulose ao ataque de celulases, responsáveis por transformar esse açúcar não fermentescível em glicose (carboidrato diretamente fermentescível). Previamente ao pré-tratamento, 15 kg de polpa de café foram descongelados, triturados em liquidificador industrial e, em seguida, filtrados e prensados em organza. O sólido retido no tecido deu origem à fase sólida da polpa de café e o filtrado originou a fase líquida, que foi reservada para ensaios que contemplam outros capítulos deste trabalho.

Na realização do pré-tratamento alcalino a quente, utilizaram-se condições otimizadas anteriormente (capítulo 3). Para tanto, foram preparados meios reacionais (aproximadamente 120 meios, a fim de se obter 2,1 kg de material pré-tratado), utilizando-se erlenmeyers de 1 L contendo 100 g de fase sólida da polpa de café e 500 mL da solução aquosa de hidróxido de sódio a 4% m/v (20% m/v de sólidos). Os erlenmeyers contendo a mistura da fase sólida da polpa de café com a solução alcalina foram submetidos ao aquecimento a 121 °C e pressão de 1 atm, em autoclave, por 25 minutos. Em seguida, a biomassa pré-tratada foi filtrada e lavada com cerca de 3L de água destilada quente (70 °C) a fim de retirarem-se substâncias superficialmente aderidas ao material pré-tratado e com um volume de 5 L de água à temperatura ambiente, para que atingisse pH neutro. Foi realizado um pré-tratamento controle utilizando-se água destilada em vez da solução alcalina (mantendo-se as mesmas condições operacionais: 121 °C por 25 minutos), a fim de se comparar os resultados aos encontrados quando se utilizou o agente alcalino. Em ambos os casos, a fase sólida da polpa de café pré-tratada obtida foi prensada para a retirada da água excedente e caracterizada quanto ao teor de umidade, de celulose, de hemicelulose, de lignina, de cinzas, de rendimento em massa, de teor remanescente de celulose, de teor

remanescente de hemicelulose e de teor remanescente de lignina, conforme metodologias descritas a seguir.

### **2.1.1 Metodologias analíticas**

As metodologias analíticas utilizadas para a determinação de cada variável resposta estão descritas nos próximos itens.

### **2.1.2 Umidade**

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico com secagem em estufa regulada, a 65 °C, por 48 horas, de acordo com metodologia proposta pela AOAC (1990). Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade.

#### **2.1.2.1 Celulose, hemicelulose e lignina**

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram determinados de acordo com as metodologias propostas por Goering e Soest (1970), Silva (1998) e Soest (1963). Inicialmente, foram mensurados os teores de fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) e lignina bruta. O teor de celulose foi determinado de acordo com a Equação 1 e o teor de hemicelulose foi determinado de acordo com a Equação 2.

$$C (\%) = FDA - L \quad (1)$$

em que

$C(\%)$  = porcentagem de celulose;

*FDA* = porcentagem de fibra em detergente ácido;

*L* = porcentagem de lignina.

$$HC (\%) = FDN - FDA \quad (2)$$

em que

*HC*(%) = porcentagem de hemicelulose;

*FDN* = porcentagem de fibra em detergente neutro;

*FDA* = porcentagem de fibra em detergente ácido.

#### **2.1.2.2 Cinzas**

O conteúdo de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico baseado na determinação da perda de peso do material submetido a aquecimento, a 550 °C, em mufla, como descrito na Association of Official Analytical Chemists, AOAC (1990). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

#### **2.1.2.3 Rendimento em massa**

O rendimento em massa foi calculado utilizando-se a Equação 3. Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$Rend_{massa} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (3)$$

em que

$Rend_{massa}$  : rendimento em massa em base úmida;



$M_f$ : massa final da fase sólida da polpa prensada após pré-tratamento com solução alcalina (g);

$M_i$ : massa inicial da fase sólida da polpa de café prensada (g).

#### **2.1.2.4 Determinação do teor remanescente de celulose, hemicelulose e lignina após os pré-tratamentos**

Os teores remanescentes ou residuais (aqueles que permaneceram na biomassa após a aplicação do pré-tratamento) de celulose, hemicelulose e lignina foram quantificados de acordo com a Equação 4. Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$Rx(\%) = \frac{W_f}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

em que

$Rx(\%)$ : percentual de celulose (RC), hemicelulose (RH) e lignina (RL);

$W_0$ : quantidade, em massa (g), do constituinte na polpa de café seca;

$W_f$ : quantidade, em massa (g), do constituinte na polpa de café pré-tratada seca.

## **2.2 Enzimas e hidrólise enzimática (sacarificação)**

Para a hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada foram utilizadas três enzimas, fornecidas pela Novozymes®: celulase (Celluclast 1.5L),  $\beta$ -glicosidase (NS 22118) e endoxilanase (NS 22083).

A celulase é a principal enzima utilizada na hidrólise de materiais lignocelulósicos, responsável por catalisar a quebra da celulose em glicose, celobiose e polímeros superiores de glicose. A atividade da celulase foi medida

segundo metodologia de Ghose (1987), apresentando 69,25 FPU/mL, em que FPU/mL são unidades de papel filtro por mL.

As enzimas  $\beta$ -glicosidase e endoxilanase são utilizadas devido às suas ações sinérgicas: atuam degradando compostos que inibem a ação da celulase, sendo empregadas para maximizar o desempenho da hidrólise, conforme orientações da Novozymes<sup>®</sup>. A  $\beta$ -glicosidase, também conhecida como celobiase, hidrolisa celobiose à glicose. Sua atividade foi mensurada de acordo com a metodologia de Wood e Bhat (1988), usando como substrato uma solução de celobiose 15 mmol/L, encontrando-se 288 CBU/mL, sendo CBU/mL a abreviatura de unidades de celobiose por mL. A endoxilanase apresenta elevada especificidade por pentosanas (compostos que por hidrólise liberam pentoses e xilose), sendo capaz de liberar pentoses e xilose a partir de frações hemicelulose presente na biomassa a ser hidrolisada. A atividade da xilanase foi determinada de acordo com metodologia de Bailey, Biely e Poutanen (1992), utilizando como substrato madeira de bétula (“birchwood” Sigma<sup>®</sup>) e os açúcares liberados foram mensurados pelo método DNS, sendo os resultados dados em U/mL (uma unidade de atividade de xilanase é a quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol).

Utilizou-se a proporção de 20 g de fase sólida da polpa de café prensada para 40 mL de tampão citrato (pH=4,8), dosagens de 25,78 FPU de celulase/g de substrato e 28,95 CBU de  $\beta$ -glicosidase/g de substrato, conforme condições otimizadas por Menezes (2012) e com dosagens de endoxilanase de 487,6 U/g. A etapa de sacarificação foi realizada separadamente, semissimultaneamente ou concomitantemente à fermentação, conforme detalhado posteriormente (itens 2.3.3; 2.3.4 ou 2.3.5), utilizando em todos os processos tampão citrato (50 mM, pH = 4,8).

Anteriormente aos ensaios fermentativos, foi realizada hidrólise da fase sólida da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio e fase sólida da polpa

de café pré-tratada com água, a fim de compará-las quanto aos teores de açúcares redutores e glicose e quanto à conversão da celulose em glicose, cujas metodologias estão descritas no item 2.3.8. Para a análise estatística de comparação de médias, utilizou-se o Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o Software Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011).

### **2.3 Processos fermentativos**

Os procedimentos para a realização dos processos fermentativos são descritos a seguir.

#### **2.3.1 Microrganismo utilizado e preparo do inóculo**

Utilizou-se o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, pertencente à Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello, armazenado sob a forma liofilizada. O microrganismo foi reativado (adicionando-se 0,2 mL de água destilada a 0,05 g da cultura liofilizada, deixando-se em repouso por 15 minutos, seguido de inoculação do conteúdo total obtido a 5 mL de meio YM e incubado à temperatura de 28 °C/48 horas). O microrganismo foi repicado para tubos de ensaio contendo meio de cultura YMA (extrato de malte-extrato de levedura-ágar) inclinado, os quais foram incubados à temperatura de 28 °C, em incubadora BOD, por 48 horas. As colônias foram cobertas com óleo mineral esterilizado e armazenadas em geladeira (temperatura média de 4 °C). A composição dos meios de cultura encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 Composição dos meios de cultura YM e YMA.

Reagente (g.L <sup>-1</sup> )	YMA	YM
Glicose	10	10
Extrato de levedura	3	3
Extrato de malte	3	3
Peptona bacteriológica	5	5
Ágar	20	--

O volume final foi completado com água destilada.

Os microrganismos armazenados foram transferidos para 3 erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura YM, utilizando uma alça de platina. Após a repicagem, os erlenmeyers foram incubados em BOD, à temperatura de 28 °C, por 48 horas. Depois do período de incubação, atingiu-se uma população de 10<sup>8</sup> células viáveis/mL, originando o inóculo utilizado nos processos fermentativos subsequentes.

### 2.3.2 Testes de termotolerância da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

Visando à aplicação da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), em que temperaturas superiores às convencionais de fermentação são requeridas, para que ambos os processos sejam favorecidos é necessário um estudo do comportamento desse microrganismo, quando armazenado em diferentes temperaturas.

Pelos motivos já mencionados, ensaios de tolerância à temperatura foram realizados em meio líquido (YM), incubados sob agitação de 150 rpm. Os ensaios foram realizados em erlemeyers de 250 mL contendo 100 mL de

meio YM e tamanho de inóculo de 10 mL. As temperaturas de incubação foram 28 °C, 37 °C, 42 °C e 45 °C. Foram mensurados os parâmetros contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer e contagem de unidades formadoras de colônia em placa, com periodicidade de 2 horas, totalizando 16 horas de avaliação.

### **2.3.2.1 Análise estatística do teste de termotolerância**

O experimento de termotolerância seguiu um delineamento inteiramente casualizado, avaliando-se temperatura de incubação, em quatro níveis: 28, 37, 42 e 45 °C, com 27 repetições para cada tratamento. O tempo de fermentação (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas) não foi incluído como fonte de variação, por se tratar de um estudo cinético. A variável resposta avaliada foi contagem de células em câmara de Neubauer. Para a variável resposta contagem total em placa, os resultados foram avaliados apenas no tempo inicial (0 hora de fermentação) e, no final (16 horas de fermentação), com 4 repetições para cada tratamento. As médias foram submetidas à análise de variância utilizando-se o software Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Tukey, a 5% de probabilidade.

### **2.3.3 Tipos de processos**

Nos trabalhos disponíveis na literatura, existe ampla divergência entre a nomenclatura atribuída aos processos de hidrólise e fermentação. Em grande parte dos trabalhos é realizada uma pré-hidrólise, a fim de fornecer um carboidrato prontamente disponível no início da fermentação. Existem trabalhos que não inativam as enzimas após a pré-hidrólise e atribuem ao processo o nome de hidrólise e fermentação separados (MADRID; DÍAZ, 2011) e outros que

atribuem ao processo a denominação de hidrólise e fermentação simultâneas (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009; COSTA, 2011). Poucos trabalhos, principalmente os realizados pelos autores Shen e Agblevor (2010; 2011), assumem a denominação de sacarificação e fermentação semissimultâneas (SSSF), pois, de acordo com tais autores, processos que envolvem uma fase de pré-hidrólise e uma fase de hidrólise e fermentação simultâneas são assim chamados. Sendo assim, para fins de comparação com os dados da presente pesquisa, serão considerados trabalhos com processos SSSF os que contarem com uma etapa de pré-hidrólise, mesmo que os autores dos mesmos assumam denominações diferentes.

#### **2.3.3.1 Sacarificação e fermentação e separadas (SHF)**

Como o próprio nome sugere, no processo de sacarificação e fermentação separadas, a hidrólise e a fermentação ocorreram em etapas distintas.

Para a hidrólise, foram utilizados 35 erlenmeyers de 125 mL, cada um contendo 20 g da fase sólida da polpa de café, 40 mL de tampão citrato (50 mM, pH = 4,8) e a concentração de enzima de 25,78 FPU/g; 28,95 CBU/g e 487,6 U/g de celulase,  $\beta$ -glicosidase e endoxilânase, respectivamente. Os erlenmeyers foram incubados, a 50 °C e 150 rpm, por 72 horas, de acordo com Souza et al. (2012). Após a hidrólise, os erlenmeyers foram imersos em banho de gelo fundente, a fim de paralisar a reação enzimática e, em seguida, foram centrifugados, a 5.000 g, por 10 minutos, descartando-se o precipitado, utilizando-se apenas o sobrenadante para o processo fermentativo. O hidrolisado foi avaliado quanto aos teores de açúcares redutores e glicose e quanto à conversão da celulose em glicose.

Para a fermentação, foram utilizados 3 erlenmeyers de 1 L, contendo, cada um, 700 mL do hidrolisado produzido a partir da fase sólida da polpa de café suplementados com sulfato de amônio ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ), fosfato dibásico de potássio ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ), de acordo com Tomas-Pejó et al. (2009) e esterilizados em autoclave, a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. O início da fermentação foi marcado pela adição do inóculo, na concentração de 10% v/v. A fermentação foi realizada em incubadora regulada a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , sem agitação, por um período de 72 horas. O estudo cinético foi realizado retirando-se amostras nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Foram realizadas análises de açúcares redutores, glicose, contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer, contagem de células em placa, pH e etanol.

#### **2.3.3.2 Sarificação e fermentação semi-simultâneas (SSSF)**

No processo de sacarificação e fermentação semissimultâneas foi realizada uma pré-hidrólise da fase sólida da polpa de café pré-tratada, utilizando-se 35 erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 g de extrato sólido da polpa de café pré-tratada e 40 mL de tampão citrato (50 mM, pH = 4,8), os quais foram esterilizados em autoclave, a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 15 minutos. A concentração de enzima utilizada na etapa de hidrólise descrita no item anterior foi dividida pela metade. Após a adição das enzimas, os erlenmeyers foram incubados, a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , a 150 rpm, por 24 horas (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

Após o período determinado, o material pré-hidrolisado foi disposto em três erlenmeyers de 1 L, contendo, cada um, 700 mL de material pré-hidrolisado, os quais foram acrescidos da outra metade da concentração de enzimas (a fim de se atingir a concentração total utilizada no processo SHF), de suplementos (sulfato de amônio:  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , fosfato dibásico de potássio:  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , sulfato de magnésio hepta-hidratado:  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) e de 10% v/v de inóculo de *Kluyveromyces*

*marxianus* CCT 4086. Os meios foram incubados a 37 °C (temperatura selecionada com base nos experimentos de termotolerância e nos trabalhos de Costa, 2011 e Shen e Agblevor, 2011), sendo agitados, a 150 rpm, nas primeiras 12 horas e, depois, deixados em repouso até o final do processo. Nessa etapa ocorrem a sacarificação e a fermentação simultâneas e, devido ao fato de o experimento ser precedido de uma pré-hidrólise, o processo recebe o nome de sacarificação e fermentação semissimultâneas. O estudo cinético foi realizado retirando-se amostras nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de processo, tendo, de 0 a 24 horas, ocorrido apenas a pré-hidrólise e, a partir de 24 horas, iniciaram-se a fermentação e a hidrólise simultâneas. Foram realizadas análises de açúcares redutores, glicose, contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer, contagem de células em placa, pH e etanol.

#### **2.3.3.3 Sacarificação e fermentação simultâneas**

Almejando a realização da fermentação e hidrólise simultâneas, foram utilizados 7 erlemeyers de 500 mL, contendo, cada um, 100 g de fase sólida da polpa de café e 200 mL de tampão citrato (50 mM, pH=4,8), as concentrações de enzimas de 25,78 FPU/g; 28,95 CBU/g e 487,6 U/g de celulase,  $\beta$ -glicosidase e endoxilânase, respectivamente; 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 1 g.L<sup>-1</sup> de fosfato dibásico de potássio, 0,3 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 10% v/v de inóculo de *Kluyveromyces marxianus*. Os meios foram armazenados à temperatura de 42 °C (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009) e agitados, por 12 horas, a 150 rpm. Transcorrido esse tempo, os meios permaneceram em repouso até o final do processo de fermentação e hidrólise simultâneas. Para o estudo cinético foram retiradas amostras nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de processo. Foram realizadas análises de açúcares redutores, glicose, contagem e



viabilidade de células em câmara de Neubauer, contagem de células em placa, pH e etanol.

### 2.3.4 Parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos avaliados nos três tipos de processos foram produtividade em etanol e conversão da celulose em etanol. Apenas para o processo de sacarificação e a fermentação separados foi possível calcular a conversão de glicose em etanol e a eficiência fermentativa (que mensura o quanto do açúcar metabolizado se transformou em etanol), uma vez que, nos demais processos (SSSF e SSF), a glicose é continuamente liberada, o que acarreta valores superestimados para as variáveis relatadas.

#### 2.3.4.1 Produtividade em etanol ( $Q_p$ )

A produtividade em etanol ( $Q_p$ ), também conhecida como produtividade volumétrica de etanol, expressa o teor produzido em etanol em certo intervalo de tempo e é obtida dividindo-se a concentração final de etanol pelo tempo de fermentação em horas, conforme Equação 5:

$$Q_p = \text{EtOH}_f / t_f \quad (5)$$

em que

$\text{EtOH}_f$  = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

$t_f$  = tempo total da fermentação (horas).

#### 2.3.4.2 Conversão de celulose em etanol

O fator de conversão do substrato (celulose) em etanol ( $Y_{E/C}$ ) foi calculado em gramas de etanol produzido por gramas celulose inicial, empregando-se a Equação 6.

$$Y_{E/C} = EtOH_f / C_o \quad (6)$$

em que

$EtOH_f$  = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

$C_o$  = concentração de celulose no início da fermentação (gcelulose/L);

#### 2.3.4.3 Conversão de glicose em etanol

O fator de conversão do substrato (glicose) em etanol ( $Y_{E/G}$ ) foi calculado em gramas de etanol produzido por gramas de glicose, conforme a Equação 7.

$$Y_{E/G} = EtOH_f / (C_o - C) \quad (7)$$

em que

$EtOH_f$  = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

$C_o$  = concentração de glicose no início da fermentação (g glicose/L);

$C$  = concentração de glicose no final da fermentação (g glicose/L).

#### 2.3.4.4 Eficiência fermentativa

A eficiência fermentativa ( $E_f$ ) mensura a fração do açúcar metabolizado que se transformou em etanol. A eficiência fermentativa foi calculada pela relação entre o rendimento do etanol observado no processo e o rendimento teórico (Equação 8).

$$E_f = \left( \frac{Y_{E/G}}{0,511} \right) \times 100 \quad (8)$$

#### 2.3.4.5 Análises estatísticas

Em decorrência dos diferentes tempos de duração, os processos fermentativos foram comparados apenas no último tempo, quanto às variáveis concentração final de etanol, produtividade e conversão de celulose em etanol. Para tanto, o experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com 7 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Tukey, a 5% de probabilidade.

#### 2.3.5 Metodologias analíticas

As metodologias analíticas utilizadas para a determinação de cada variável resposta estão descritas nos próximos itens.

##### 2.3.5.1 Açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores foram dosados de acordo com a metodologia do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrita por Miller (1959). Para

tanto, foi construída uma curva padrão de glicose, relacionando a absorbância lida a 540 nm com as concentrações de açúcares redutores. Os resultados foram expressos em g de AR/L de solução.

### 2.3.5.2 Glicose

Os teores de glicose nas amostras foram determinados por meio do kit enzimático GOD PAD (Laborlab<sup>®</sup>). Para tanto, em tubos de ensaio de 10 mL, o conteúdo de 10 µL de cada amostra foi acrescido de 1,0 mL do kit enzimático GOD PAP e, sequencialmente, incubado em banho termostatzado, a 30 °C, por 10 minutos. A reação foi interrompida por diminuição abrupta da temperatura, utilizando-se banho de gelo para paralisar a atividade enzimática. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 500 nm e os resultados foram encontrados pela curva de calibração preparada com o emprego do kit enzimático e solução padrão de glicose, sendo expressos em g de glicose/L de solução.

### 2.3.5.3 Conversão da celulose em glicose

A conversão da celulose do material pré-tratado em glicose após hidrólise enzimática foi calculada utilizando-se a Equação 9, considerando-se somente a celulose presente na fase sólida da polpa de café pré-tratada.

$$Conv_{celulose}(\%) = \frac{(G_f - G_b) \times 0,9}{C_0} \times 100 \quad (9)$$

em que

$G_f$ : concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (g de glicose/L de meio após a hidrólise);

$G_b$ : concentração de glicose no branco (tratamento realizado sem a enzima) (g de glicose/L de meio);

$C_0$ : concentração de celulose no material pré-tratado (g de celulose/L meio a ser hidrolisado).

#### **2.3.5.4 Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer**

A contagem e a viabilidade foram realizadas em câmara de Neubauer após diluições adequadas, utilizando-se a coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

#### **2.3.5.5 Contagem total em placa**

Para a contagem total em placa, foi utilizado o meio YMA. Aproximadamente 20 mL desse meio foram fundidos, a 40 °C, utilizando-se aparelho de micro-ondas e foram vertidos em placas de Petri esterilizadas, deixadas em repouso sob luz UV em capela de fluxo laminar, até a solidificação do meio (cerca de 15 minutos). Para o plaqueamento, foram utilizadas diluições seriadas (de  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$ ), incubando-se 100  $\mu$ L com três repetições para cada diluição (plaqueamento em superfície). As placas foram armazenadas em estufa BOD, à temperatura de 28 °C, por 72 horas. Transcorrido o tempo de incubação, fez-se a contagem do número de colônias, tirando-se a média aritmética de cada diluição e multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição. Os resultados foram expressos em UFC/mL de meio.

### **2.3.5.6 Potencial hidrogeniônico**

O potencial hidrogeniônico foi determinado por potenciômetro digital, modelo Quimis, tipo Q-400 A.

### **2.3.5.7 Etanol**

O etanol produzido foi quantificado por meio da análise de cromatografia gasosa, em aparelho Shimadzu CG 17A, com detector de ionização em chama (FID), utilizando-se coluna capilar Carbowax 20M (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m). Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: o injetor automático trabalhou no modo “splitless”, utilizando o hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 33 cm.s<sup>-1</sup>. Foi injetado 1  $\mu$ L de amostra, sendo o tempo de corrida de 15 minutos. Utilizou-se um gradiente de temperatura em que a coluna permaneceu, inicialmente, à temperatura de 40 °C, por 4 minutos, aquecendo até 220 °C e permanecendo, por 2 minutos, nessa temperatura, por meio de uma rampa de aquecimento de 25°C.min<sup>-1</sup>. A temperatura do detector foi de 300 °C. Para a quantificação dos teores de etanol nas amostras, foi realizada uma calibração com base no padrão externo etanol (padrão analítico da Merck).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Características da fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrólise enzimática

A fase sólida da polpa de café pré-tratada com solução de NaOH a 4% (m/v) ou com água destilada foi caracterizada quanto aos teores de umidade, celulose, hemicelulose e lignina, além de se quantificar as porcentagens de celulose, de hemicelulose e de lignina remanescentes na biomassa após pré-tratamento. Os resultados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 Características da fase sólida da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio ou com água destilada.

Componentes	Fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4%*	Fase sólida da polpa de café pré-tratada com água destilada**
Rendimento (%)	18,01±1,25	60,25±2,03
Celulose (%)	50,53±2,45	28,65±1,52
RC (%)	69,18±0,75	93,1±1,2
Hemicelulose (%)	27,68±1,18	18,25±1,05
RH (%)	44,15±0,19	71,0±2,7
Lignina (%)	13,83±1,25	23,96±1,11
RL (%)	25,19±1,25	100±0,35
Cinzas (%)	2,03±0,25	6,32±0,29

\*Umidade da fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% = 72%.

\*\* Umidade da fase sólida da polpa de café pré-tratada com água destilada = 82%.

Abreviaturas utilizadas: RC (%) = teores remanescentes de celulose; RH (%) = teores remanescentes de hemicelulose (RH) e RL (%) = teores remanescentes de lignina.

Analisando-se os dados da Tabela 3 e comparando-os com os da Tabela 1 (item 2.1), quanto às frações celulose, hemicelulose e lignina, verifica-se um aumento na concentração das duas primeiras variáveis, ao se aplicar qualquer um dos dois tipos de pré-tratamentos (alcalino ou neutro). Para o teor de lignina, a observação é diferente: para o pré-tratamento com hidróxido de sódio, é observado um menor teor de lignina, em comparação com a fase sólida da polpa de café e, para o pré-tratamento com água destilada, constatou-se um maior teor de lignina.

Entretanto, os teores de celulose, hemicelulose e lignina devem ser analisados assumindo-se as porcentagens de cada um desses componentes que permanecem na biomassa após a aplicação do pré-tratamento, as quais foram denominadas teores remanescentes de cada componente (celulose, hemicelulose ou lignina). Dessa forma, a análise dessas variáveis mostra que a aplicação do pré-tratamento alcalino acarreta em menor teor remanescente de celulose e maior teor remanescente de hemicelulose, quando comparado ao tratamento com água destilada, indicando perda de celulose provocada pelo álcali. Todavia, o tratamento alcalino remove eficientemente a lignina da biomassa, o que é de extrema importância, uma vez que a lignina e a hemicelulose atuam como barreira física, impedindo o ataque das enzimas celulases à celulose. A lignina é um dos principais fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose (BERLIN et al., 2005). A solubilização/remoção de lignina é nula ao se aplicar o tratamento com água destilada, fato também observado por Nlewem e Tarash Jr. (2010), ao pré-tratar gramíneas switchgrass com água, a 100 °C, por 1 hora.

O objetivo de qualquer pré-tratamento é alterar ou remover impedimentos estruturais ou composicionais à hidrólise enzimática, ao quebrar (ou solubilizar) a estrutura da lignina e diminuir a cristalinidade da celulose, melhorando o rendimento da produção de açúcares fermentescíveis a partir da celulose e da hemicelulose (BALAT; BALAT: OZ, 2008).



De acordo com McIntosh e Vancov (2010), a taxa e a extensão da hidrólise do tratamento enzimático indicam a medida da eficácia do pré-tratamento. A maior eficiência do pré-tratamento alcalino, em comparação com o pré-tratamento contendo água destilada, pode ser constatada após a aplicação da hidrólise enzimática, sendo tal eficiência avaliada quanto aos teores de açúcares redutores e glicose liberados após hidrólise e quanto à conversão da celulose em glicose, conforme sumarizado na Tabela 4.

Tabela 4 Teores de açúcares redutores, glicose e porcentagem de conversão da celulose em glicose após hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% ou água destilada.

Componente	Fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4%	Fase sólida da polpa de café pré-tratada com água destilada
Açúcares redutores (g.L <sup>-1</sup> )	98,03±5,02	11,98±1,18
Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	69,71±0,75	9,03±0,26
Conversão da celulose (%)	84,55±0,95	14,02±1,94

Os dados contidos na Tabela 4 mostram claramente a necessidade da realização do pré-tratamento alcalino para facilitar a ação enzimática na hidrólise da celulose em glicose.

Os valores obtidos para o teor de açúcares redutores (98,03 g.L<sup>-1</sup>, que correspondem a 0,7 g de açúcar/g de biomassa) após hidrólise enzimática fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% (121°C; 25 minutos) foram superiores aos relatados por Nlewem e Tarash Jr. (2010) que, ao pré-tratarem gramíneas switchgrass com NaOH, em concentrações de 0,5% a 10%,

observaram 0,31 a 0,51 g de açúcar/g de biomassa. Tais diferenças são decorrentes do tipo e da concentração de enzimas utilizadas e da composição dos materiais. Já o rendimento em glicose da gramínea switchgrass pré-tratada com água (100 °C, 1 hora) foi de 0,093 g de açúcar/g de biomassa, muito próximo ao observado na presente pesquisa para a fase sólida da polpa de café pré-tratada com água, que foi de 11,98 g.L<sup>-1</sup>, correspondente a 0,086 g de açúcar/g de biomassa, indicando que a não remoção da lignina afeta (de maneira semelhante) o desempenho das enzimas em diferentes materiais.

### **3.2 Avaliação termotolerância da *Kluyveromyces marxianus* CCT4086**

A termotolerância da *Kluyveromyces marxianus* CCT4086 foi avaliada por meio da incubação do microrganismo em quatro temperaturas diferentes (28, 37, 42 e 47 °C) em relação à contagem do número de células em câmara de Neubauer (número de células/mL), ao longo de 16 horas de incubação, com amostragem de 2 em 2 horas e quanto à contagem em placas (UFC/mL), no tempo inicial (0 hora) e final (16 horas). A primeira variável mensura o número de células totais (viáveis e não-viáveis) e a segunda avalia o número de células capazes de se multiplicar formando colônias (viáveis).

Os resultados da análise estatística demonstraram que os tratamentos em temperaturas de 28, 37 e 42 °C apresentaram número de células estatisticamente semelhante e superior ao valor médio encontrado para a temperatura de 45 °C, conforme visualizado na Figura 1 (ANOVA disponível na Tabela A).

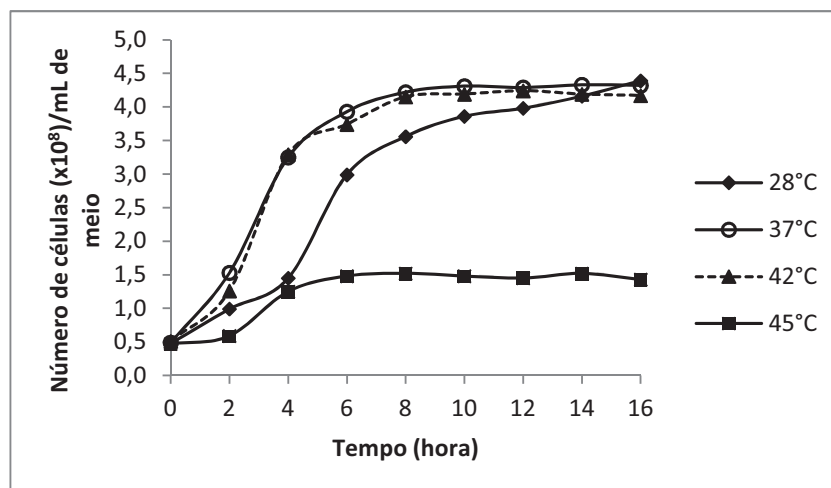


Figura 1 Contagem de células de *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 incubadas em diferentes temperaturas, ao longo de 16 horas

As curvas ilustradas na Figura 1 mostram que, em todas as temperaturas, a fase lag, em que a população permanece quase inalterada, teve duração de menos de duas horas. A fase seguinte - fase exponencial, em que a população aumenta em um ritmo constante - procedeu-se de 2 a 6 horas, aproximadamente, com o número de células permanecendo praticamente constante (fase estacionária) a partir de 8 horas, para as temperaturas de 37 e 42 °C e de 6 horas para a temperatura de 45 °C. Para a temperatura de 28 °C, a transição entre a fase exponencial e a fase estacionária não foi tão pronunciada quanto para as demais temperaturas, contudo, pode ser observada mudança na inclinação da curvatura (menos íngreme) a partir de 8 horas de incubação.

Muitas cepas de *Kluyveromyces marxianus* são termotolerantes, sendo capazes de alcançar temperaturas de crescimento tão elevadas quanto 47 e 52 °C e a produção eficiente de etanol pode ocorrer em temperaturas que variam entre 38 e 45 °C (BALLESTEROS et al., 2004; LIMTONG; SRINGIEW; YONGMANITICHAI, 2007).

Por meio da Figura 1 é possível se ver claramente que a *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 foi capaz de crescer em todas as temperaturas testadas. Maior número de células é atingido quando essa levedura é incubada a 37 e a 42 °C, seguida da incubação a 28 °C. Menores números de células foram encontrados, em todos os tempos de incubação, para a temperatura de 45 °C.

Pela análise desses dados fica evidente que a temperatura de 45 °C desfavoreceu o crescimento celular medido em termos da concentração de células. Limtong, Sringiew e Yongmanitchai (2007) também não observaram diferenças estatísticas no crescimento de *Kluyveromyces marxianus* DMKU-3-1042, nas temperaturas de 37 e 40 °C.

Costa (2011), ao avaliar a velocidade de crescimento específico da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 (a mesma levedura utilizada na presente pesquisa), não encontrou diferenças entre as temperaturas de 30, 37, 42 e 45 °C. Entretanto, em relação ao número de células (obtido em termos da densidade óptica), o maior valor obtido foi para a temperatura de 42 °C (1,17), seguido de 37 °C (0,89), depois 30 °C (0,73) e, por último, com o menor valor, 45 °C (0,68). A diferença observada pela autora não é tão pronunciada quanto a constatada nesse trabalho. Entretanto, devem ser consideradas as diferenças entre as metodologias utilizadas para mensurar a concentração celular, além da composição do meio de cultura, por exemplo, quanto à concentração de glicose (o autor utilizou a concentração 4% e, na presente pesquisa, o meio continha 1% de glicose).

Ao final do período de incubação (16 horas), as porcentagens de células viáveis em relação às células totais, contadas em câmara de Neubauer, observadas para as temperaturas de 28 °C, 37 °C, 42 °C e 45 °C foram de 90,71%, 91%, 90,24% e 73,28%, respectivamente.

Para a contagem de unidades formadoras de colônias em placa foram significativas ( $P < 0,05$ ) as variáveis temperatura de incubação e interação entre o

tempo e temperatura. As médias e os resultados do Teste de Tukey estão dipostos na Tabela 5 e o resumo da ANOVA, na Tabela 31A.

Observou-se, por meio da contagem de células em placa, que, no tempo inicial de incubação, todas as temperaturas foram equivalentes quanto à concentração celular mensurada em UFC/mL. Ao final da fermentação, as temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C proporcionaram as concentrações celulares estatisticamente semelhantes e superiores à média observada para a temperatura de 45 °C. Esses resultados concordam com a contagens em câmara de Neubauer, anteriormente discutidas.

Para as temperaturas de 28 °C, 37 °C e 42 °C foi observado aumento na concentração celular (diferença estatística entre as médias do tempo inicial e final) com o aumento do tempo de incubação. Para a temperatura de incubação de 45 °C, a média da contagem de células em placa do início do tratamento foi estatisticamente semelhante à média da contagem de células em placa do final do tratamento, o que pode ser decorrente do elevado coeficiente de variação encontrado para essa variável (33,06%), uma vez que, por meio da Figura 1, observa-se um pequeno aumento no número de células.

Tabela 5 Contagem de células em placa (UFC/mL) para o tempo inicial e o tempo final de cada fermentação.

Tempo	UFC x 10 <sup>8</sup> /mL de meio			
	28 °C	37 °C	42 °C	45 °C
Inicial	0,35±0,13 <sup>aA</sup>	0,30±0,14 <sup>aA</sup>	0,30±0,08 <sup>aA</sup>	0,30±0,08 <sup>aA</sup>
Final	3,43±0,52 <sup>aB</sup>	4,08±1,10 <sup>aB</sup>	3,78±0,96 <sup>aB</sup>	0,91±0,09 <sup>bA</sup>
CV(%)	33,06			

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

Os resultados obtidos para todas as variáveis analisadas indicam as temperaturas de 28, 37 e 42 °C como as melhores para se incubar a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, a fim de se obter maiores concentrações celulares. As temperaturas de 37 e 42 °C também foram escolhidas por Souza et al. (2012) para processos envolvendo a *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 e por Costa (2011) para a fermentação utilizando a *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

### **3.3 Processos fermentativos**

As características de cada processo fermentativo são discutidas nos próximos itens.

#### **3.3.1 Sacarificação e fermentação separadas (SHF)**

A fase sólida da polpa de café pré-tratada alcalinamente e hidrolisada por 72 horas apresentou teor médio de açúcares redutores igual 98,03 g.L<sup>-1</sup> e 69,71 g de glicose.L<sup>-1</sup>, com porcentagem de conversão da celulose em glicose de 84,55%. Os valores encontrados foram superiores aos relatados por Nascimento (2011), que observou 55,5 g de glicose.L<sup>-1</sup>, com uma porcentagem de conversão da celulose em glicose de 77,1%, para bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% (121°C, 30 min), utilizando 20 FPU de accelerase/g de material lignocelulósico. As discrepâncias encontradas entre a literatura citada e a presente pesquisa podem ser provenientes do tipo de enzima utilizada e das diferentes características composicionais das biomassas em comparação.

O material hidrolisado foi, então, fermentado (SHF) e as cinéticas de consumos de açúcares redutores e de glicose no decorrer de 72 horas estão representadas na Figura 2. O consumo de açúcares permaneceu constante após

60 horas de fermentação, sendo esse tempo assumido como o tempo final do processo fermentativo.

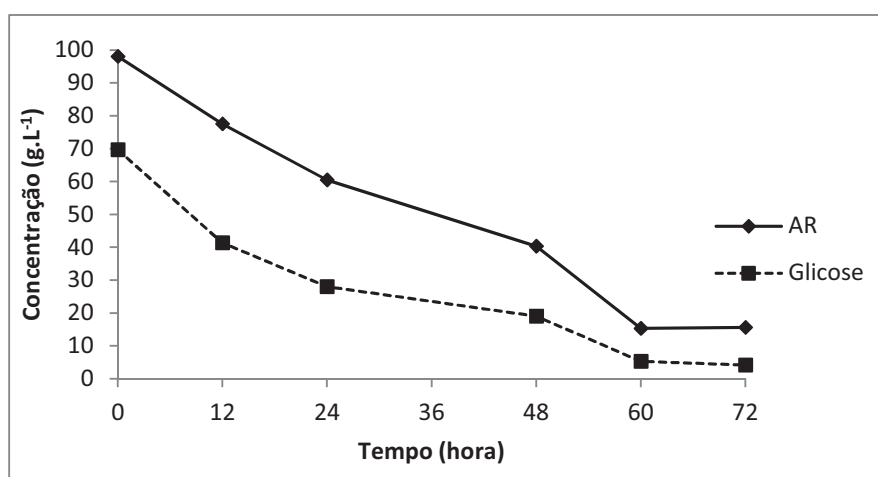


Figura 2 Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e glicose, por *Kluyveromyces marxianus*, em meios contendo fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada, sendo a hidrólise e a fermentação realizadas separadamente (SHF)

A fermentação F1 iniciou-se com um teor de AR de 98,03 g.L<sup>-1</sup> e, após 60 horas, a concentração observada foi de 15,31 g.L<sup>-1</sup>. Para a concentração de glicose, os teores inicial e final mensurados foram de 69,71 g.L<sup>-1</sup> e 5,32 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A cinética de produção de etanol observada no processo de hidrólise e fermentação separada da fase sólida da polpa de café pode ser visualizada com o auxílio da Figura 3, por meio da qual se observa que a concentração de etanol permaneceu constante após 60 horas de fermentação, o que corrobora os resultados observados durante o consumo de açúcares. Ao final das 60 horas de processo, foi observado teor médio de etanol de 21,72 g.L<sup>-1</sup>.

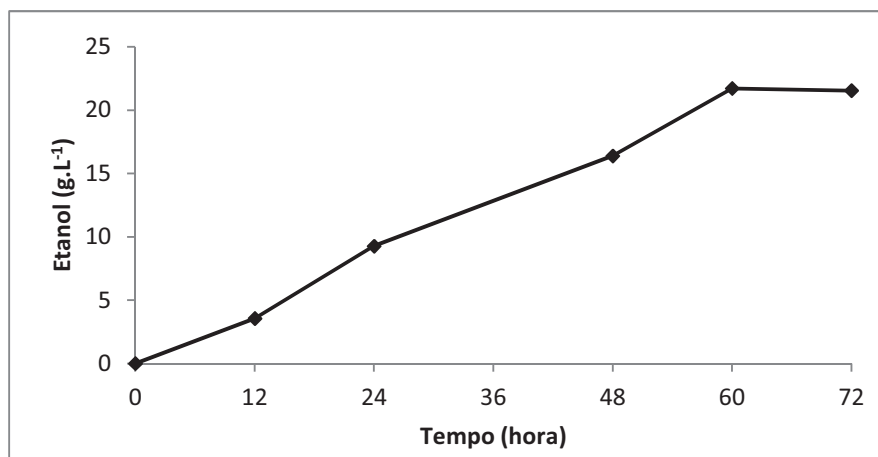


Figura 3 Produção de etanol, por *Kluyveromyces marxianus*, durante o processo de fermentação (SHF) da fase líquida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada

Os resultados observados foram superiores aos relatados por Madrid e Díaz (2011) que, após SHF, com hidrólise de 24 horas (a 50 °C) e fermentação de 48 horas (a 38 °C), utilizando como biomassa papel, obtiveram 33 g de açúcares redutores.L<sup>-1</sup>, após hidrólise e 12,2 g de etanol. L<sup>-1</sup>, utilizando *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907. Embora a carga de sólidos utilizada na literatura anteriormente citada para a hidrólise enzimática tenha sido menor (6% m/v) do que a empregada no presente trabalho, os resultados obtidos nesse estudo mostram o quão promissor é o uso de fase sólida da polpa de café para a produção de etanol utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

Kuloyo (2012), utilizando a carga de sólidos na mesma concentração que a empregada neste trabalho (14% m/v, em peso seco), obteve, em processo SHF de biomassa de figueira-da-índia (*Opuntia ficus-indica*), concentrações de açúcares redutores e glicose de 59,5 g. L<sup>-1</sup> e 30,7 g. L<sup>-1</sup>, respectivamente, após 48 horas de hidrólise. O teor máximo de etanol obtido foi de 19,5 g. L<sup>-1</sup>, ligeiramente inferior ao relatado nesta pesquisa.



Os resultados das contagens de células totais e viáveis ao longo da fermentação fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada pelo processo SHF estão ilustrados na Figura 4. Observa-se, no gráfico, a semelhança no comportamento do número de células totais e viáveis, com elevado aumento na concentração até 24 horas de fermentação, o que demonstra excelente adaptação da levedura ao meio composto pelo hidrolisado de fase sólida da polpa de café. A fermentação iniciou-se com  $5,6 \times 10^7$  células/mL de meio e, após 72 horas, o número de células observado foi de  $4,47 \times 10^8$  células/mL de meio e as porcentagens de células viáveis, no início e no final do processo, foram de 89,73% e 84,29%, respectivamente. Quanto à contagem em placa, observaram-se, no início (0 hora) e no final do processo (72 horas), os valores médios de  $5,3 \times 10^7$  UFC/mL e 3,60 UFC/mL, corroborando os resultados das contagens em câmara de Neubauer.

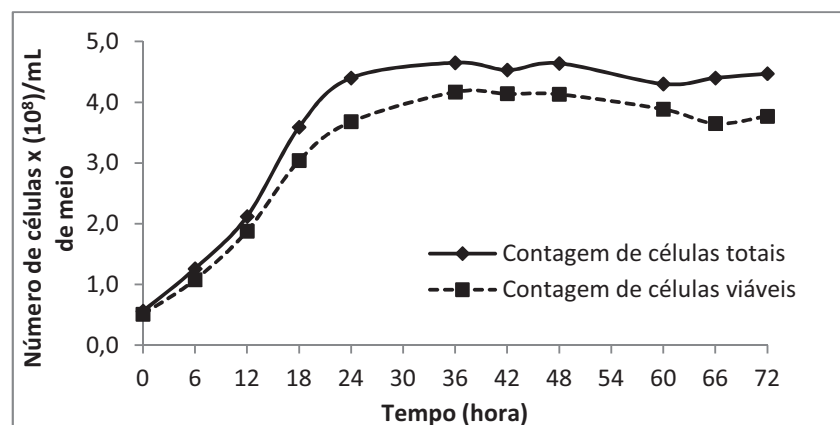


Figura 4 Variação da concentração de células e viabilidade celular ao longo do tempo de fermentação da fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada (SHF) por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

A fermentação apresentou pH inicial de 5,50 e, ao término da fermentação, o pH mensurado foi de 4,95. O maior pH observado no início da fermentação é decorrente da adição de suplementos e do inóculo, entretanto, com o decorrer da fermentação, ele foi se aproximando do pH do tampão citrato (pH = 4,8) utilizado na hidrólise.

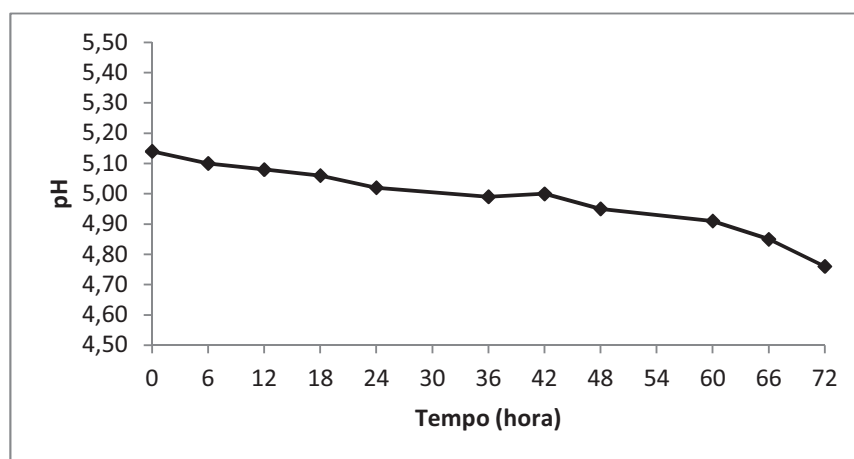


Figura 5 Variação do pH ao longo do tempo de fermentação da fase sólida da polpa de café pré-tratada e hidrolisada (SHF) por *Kluyveromyces marxianus*

### 3.3.2 Sacarificação e fermentação semissimultâneas (SSSF)

No processo de sacarificação e fermentação semissimultâneas (SSSF), a fase sólida da polpa de café pré-tratada passou por uma pré-hidrólise (24 horas, 50 °C e 150 rpm) com metade da concentração de enzimas. Transcorrido o período de pré-hidrólise, a temperatura foi abaixada a 37 °C e iniciaram-se a hidrólise e a fermentação simultâneas.

Os perfis das concentrações de açúcares redutores, glicose e etanol ao longo do tempo utilizando-se o processo SSSF são mostrados na Figura 6.

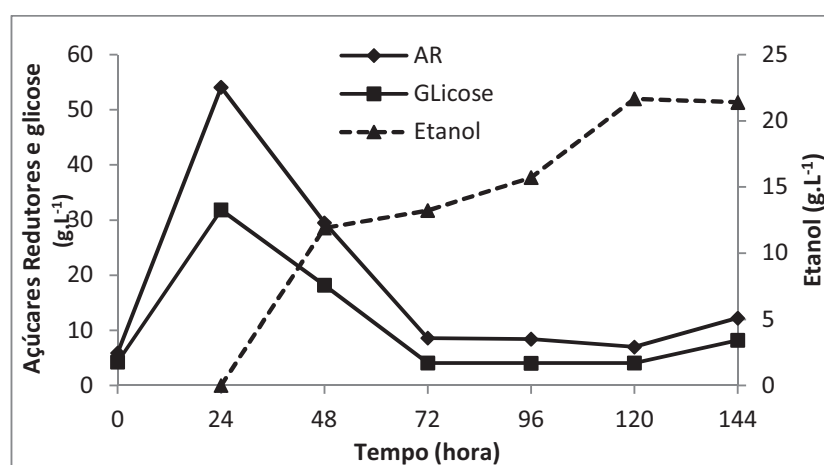


Figura 6 Consumo de açúcares redutores (AR) e glicose e produção de etanol durante o processo de sacarificação e fermentação semissimultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada utilizando *Kluyveromyces marxianus*, com pré-hidrólise de 24 horas

A fase sólida da polpa de café pré-tratada utilizada no experimento SSSF apresentou a concentração de açúcares redutores de  $5,9 \text{ g.L}^{-1}$  e um teor de glicose igual a  $4,21 \text{ g.L}^{-1}$ , antes da pré-hidrólise. Após 24 horas de pré-hidrólise, foram observadas as concentrações médias de açúcares redutores e de glicose de  $54,06 \text{ g.L}^{-1}$  e  $31,83 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente.

A partir de 24 horas, observou-se decréscimo na concentração de carboidratos (açúcares redutores e glicose) até 72 horas e, a partir desse tempo, até 120 horas, a concentração de carboidratos parece permanecer constante. Entretanto, ao se analisar a cinética de produção de etanol, verifica-se que

ocorreu um aumento contínuo da produção desse álcool até 120 horas de fermentação, indicando consumo de açúcares pela levedura.

A observação aparentemente contraditória descrita anteriormente se deve ao fato de que, no início da fermentação, a levedura utiliza o açúcar disponibilizado pela pré-hidrólise. No decorrer do processo SSSF, as enzimas celulolíticas degradam a celulose que resistiu à pré-hidrólise e o açúcar produzido pela hidrólise é consumido pela levedura e convertido a etanol, sendo detectados apenas os açúcares que a levedura não consumiu. Por essa razão, observam-se aumento na concentração de etanol e constância na concentração de açúcares.

O aumento na concentração de açúcares a partir de 120 horas indica continuação da atividade da celulase após a conclusão da fermentação pela levedura, o que também foi observado na pesquisa de Ballestros et al. (2004) e de Suryawati et al. (2008). O desempenho da *Kluyveromyces marxianus* pode ser afetado tanto pela baixa concentração de glicose, resultando em condições de estresse metabólico QUANTO pela toxicidade do etanol presente no meio de cultura (BALLESTROS et al., 2004).

O teor de etanol produzido aumentou até 120 horas de processo, quando atingiu a concentração de 21,66 g.L<sup>-1</sup> e, após 144 horas, a concentração média de etanol observada foi de 21,33 g.L<sup>-1</sup>. A partir de 144 horas, a concentração de etanol permaneceu praticamente invariável (dados não mostrados), o que incita a ideia de que o processo fermentativo cessou após 120 horas.

Elevados teores de sólidos, sobretudo acima de 10% m/v (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009), são um grande problema, devido à elevada viscosidade do hidrolisado (BALLESTEROS et al., 2004), que dificulta a fermentação. Souza et al. (2012), ao pré-hidrolisarem bagaço de cana pré-tratado, utilizando a concentração de sólidos de 8% m/v, por 24 horas, a 50°C, obtiveram cerca de 20 g de glicose.L<sup>-1</sup> e, após 8 horas de fermentação a 37 °C, por *Kluyveromyces marxianus*, contataram a produção de cerca de 20 g de etanol.L<sup>-1</sup>. Costa (2011)

utilizou a mesma levedura empregada neste trabalho (*Kluyveromyces marxianus* CCT 4086) para a produção de etanol a partir de bagaço de cana pré-hidrolisado a 50 °C, por 72 horas, com concentração de sólidos de 8% m/v. Este autor obteve 35 g de glicose.L<sup>-1</sup> e, após a fermentação realizada a 37 °C, o teor de etanol produzido foi de 21,48 g.L<sup>-1</sup>, tendo os valores de glicose e etanol obtidos ficado muito próximos aos da presente pesquisa, comprovando a boa eficiência da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 em produzir etanol a partir de diferentes biomassas pré-hidrolisadas. Dessa maneira, fica evidente que a elevada concentração de sólidos (14% m/v) utilizada neste estudo não comprometeu a produção de etanol.

Na Figura 7 ilustra-se a variação do número de células ao longo do tempo de processo SSSF, por meio da qual nota-se o rápido aumento na concentração celular até 84 horas de processo, mantendo-se em fase estacionária até o tempo final. A fermentação iniciou-se com 5,5 x 10<sup>7</sup> células/mL de meio e 5 x 10<sup>7</sup> células viáveis/mL de meio. Observa-se que houve diminuição no número de células viáveis a partir de 120 horas de fermentação, o que concorda com os resultados observados para a produção de etanol. Após 120 horas de fermentação, as concentrações de células foram de 4,66 x 10<sup>8</sup> células/mL de meio e 4,16 x 10<sup>8</sup> células viáveis /mL de meio, sendo a porcentagem de células viáveis em relação às células totais de 89,47. No final da avaliação (144 horas) observou-se a concentração celular de 4,75 x 10<sup>8</sup> células/mL de meio, sendo 82,54% viáveis.

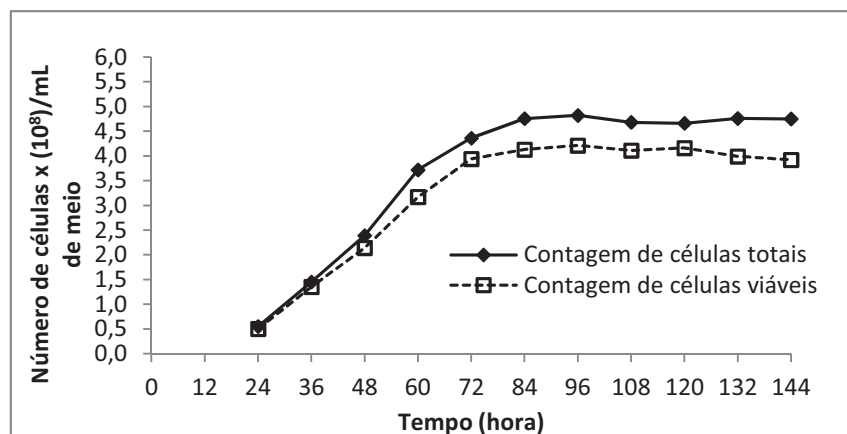


Figura 7 Variação da concentração e viabilidade celular de *Kluyveromyces marxianus*, ao longo do tempo da sacarificação e fermentação semissimultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada, com pré-hidrólise de 24 horas.

A pequena diferença existente entre o pH inicial (4,91) e o pH final (4,79), observada na Figura 8, durante o processo fermentativo SSSF da fase sólida da polpa de café pré-tratada, demonstra o elevado o potencial tamponamento exercido tampão citrato (pH=4,8, 50 mM) adicionado no início do processo. O pequeno acréscimo observado nos tempos 24 e 36 horas pode ser explicado pela adição do inóculo e dos suplementos para a fermentação.

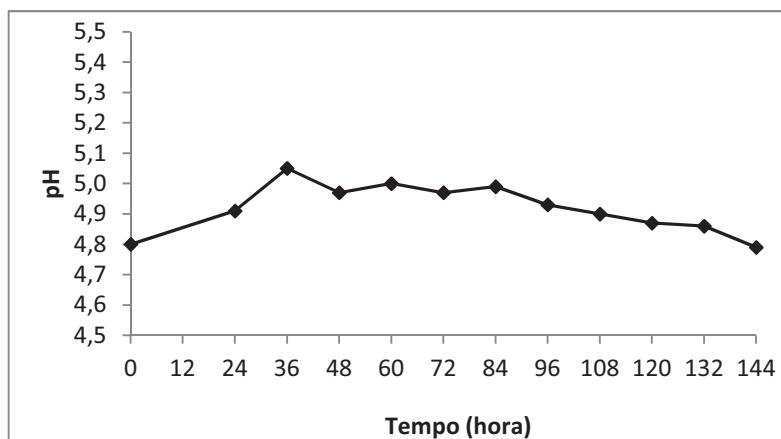


Figura 8 Variação do potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do tempo do processo de sacarificação e fermentação semissimultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada, com pré-hidrólise de 24 horas, utilizando-se, para a fermentação, a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

### 3.3.3 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

A hidrólise e a fermentação foram realizadas simultaneamente, a 42 °C. As cinéticas de consumo de açúcares redutores e glicose e da produção de etanol encontram-se na Figura 9.

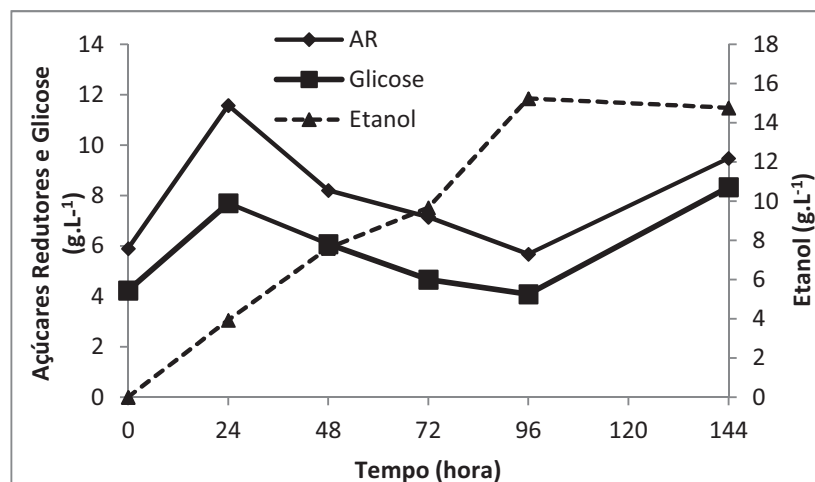


Figura 9 Cinéticas do consumo de açúcares redutores (AR) e glicose e da produção de etanol durante o processo de sacarificação e fermentação simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada, utilizando *Kluyveromyces marxianus*

No início do processo de hidrólise e fermentação simultâneas ocorre baixa produção de etanol, em virtude da pequena concentração de açúcares disponíveis. No tempo de 24 horas, observam-se as maiores concentrações de açúcares redutores ( $11,58 \text{ g.L}^{-1}$ ) e de glicose ( $7,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) de todos os tempos analisados, demonstrando que a hidrólise se processa mais rapidamente que a fermentação, nos períodos iniciais. Os decréscimos observados nos teores de açúcares acompanhados do aumento da concentração de etanol demonstram intensa atividade fermentativa e boa performance da *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, que consome o açúcar produzido durante a hidrólise.

No tempo de 96 horas de fermentação e hidrólise simultâneas, obteve-se a concentração de etanol de  $15,24 \text{ g.L}^{-1}$ , permanecendo constante após esse período, sendo a concentração de etanol igual a  $14,6 \text{ g.L}^{-1}$ , no tempo 144 horas. Dessa maneira, assumiu-se o tempo de 96 horas como o fim do processo SSF. O aumento na concentração de açúcares observado a partir de 96 horas de



fermentação confirma o fim da fermentação e a continuação da atividade da celulase, conforme discutido no processo SSSF.

Os teores de etanol encontrados ao final de 96 horas de fermentação estão próximos aos 16 g de etanol.L<sup>-1</sup>, observados por Ballestros et al. (2004), após 82 horas de fermentação, a 42 °C, da palha de milho pré-tratada por explosão a vapor, hidrolisada e fermentada por *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 e aos 14,8 de etanol.L<sup>-1</sup>, obtidos a partir de gramíneas switchgrass pré-tratadas, hidrolisadas e fermentadas, a 41 °C, por 72 horas, no trabalho de Suryawati et al. (2008).

Avaliando-se a concentração celular (Figura 10) em termos do número de células totais e do número de células viáveis presentes no meio de fermentação, observou-se um rápido aumento de ambas as variáveis, até 60 horas de hidrólise e fermentação simultâneas. As concentrações de células totais e viáveis no início do processo SSF foram iguais a  $5,4 \times 10^7$  células/mL de meio e  $4,8 \times 10^7$  células viáveis /mL de meio, respectivamente, com a porcentagem de viabilidade igual a 90,23%. A partir de 96 horas, observou-se um pequeno decréscimo no número de células viáveis. Após 120 horas de fermentação, a concentração celular observada foi de  $4,56 \times 10^8$  células/mL de meio, sendo 85,59% destas células viáveis. A contagem de células em placa apontou as concentrações  $6 \times 10^7$  UFC/mL de meio no início do processo e 4,53 UFC /mL de meio após 144 horas.

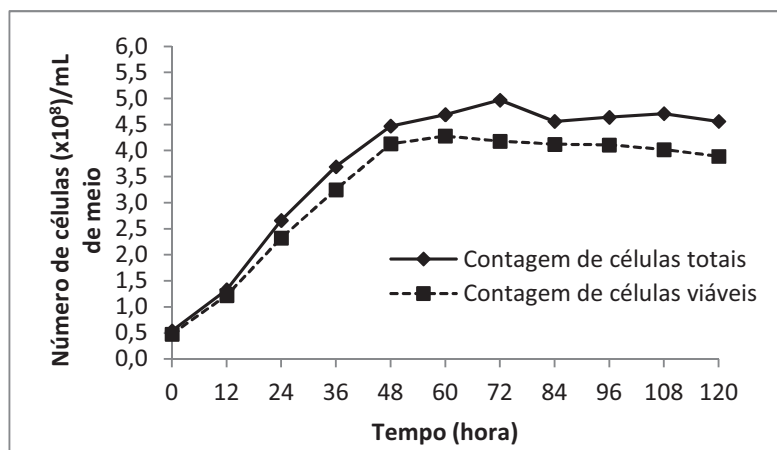


Figura 10 Variação da concentração e viabilidade celular de *Kluyveromyces marxianus* ao longo do tempo da sacarificação e fermentação simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada

Como pode ser visto na Figura 11, o pH, durante o processo SSF, ficou bastante estável, sendo o igual a 4,79 e o final de 4,86, mantendo-se constante o pH de 4,8 do tampão citrato.

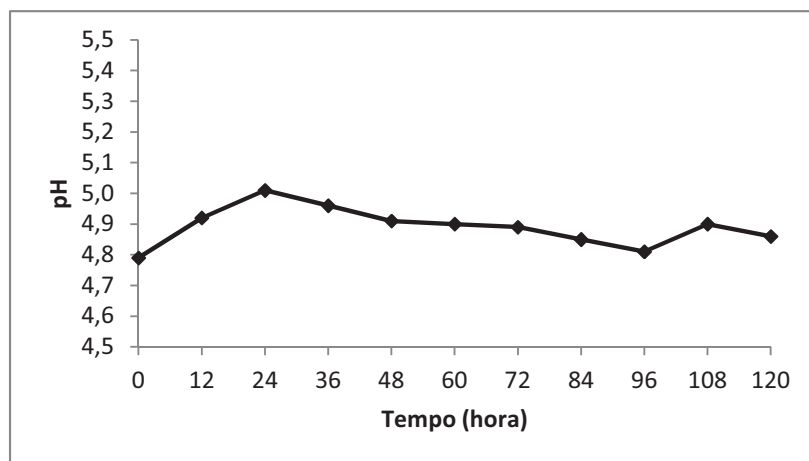


Figura 11 Variação do potencial hidrogeniônico (pH) ao longo do tempo do processo de sacarificação e fermentação simultâneas da fase sólida da polpa de café pré-tratada utilizando-se para a fermentação a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086

### 3.3.4 Parâmetros fermentativos

Os diferentes processos de sacarificação e fermentação da fase sólida da polpa de café pré-tratada foram comparados quanto à produção final de etanol, à produtividade volumétrica e à conversão do substrato (celulose) em etanol. Como, nos processos SSS e SSF, a glicose é continuamente liberada a partir da celulose, não se torna possível o cálculo da conversão da glicose em etanol, tampouco o cálculo da eficiência fermentativa, como mencionado anteriormente. Por essa razão, tal parâmetro foi calculado apenas para SHF. Os valores médios e os respectivos desvios padrões dos parâmetros fermentativos avaliados encontram-se na Tabela 6 e os resumos das ANOVAs estão disponíveis nas Tabelas 32A a 34A.

O tempo final de cada processo fermentativo foi de 60 horas para SHF, 120 horas para SSSF e 96 horas para SSF, selecionados com base no consumo de açúcares ou na estabilização do teor de etanol produzido.

Tabela 6 Valores médios e desvios padrões para concentração final de etanol, produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ ), fator de conversão da celulose em etanol ( $Y_{E/C}$ ), fator de conversão da glicose em etanol ( $Y_{E/G}$ ) e eficiência fermentativa (Ef) dos diferentes processos de sacarificação e fermentação da fase sólida da polpa de café pré-tratada.

Tratamento	Etanol final (g/L)	$Q_p$ (g etanol/ L.h)	$Y_{E/C}$ (g etanol/g celulose)	$Y_{E/G}$ (g etanol/g glicose)	Ef %
SHF	21,71±1,00 <sup>a</sup>	0,36±0,02 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	0,34±0,02	66,03±3,63
SSSF	21,66±0,96 <sup>a</sup>	0,22±0,01 <sup>b</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	--	--
SSF	15,24±2,37 <sup>b</sup>	0,16±0,03 <sup>c</sup>	0,22±0,03 <sup>b</sup>	--	--
CV(%)	5,60	8,36	5,52	--	--

Médias seguidas de mesma letra na coluna não apresentaram diferenças estatísticas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Abreviaturas utilizadas: SHF = sacarificação e fermentação separadas; SSSF = sacarificação e fermentação semissimultâneas e SSF = sacarificação e fermentação simultâneas.

Os tratamentos SHF e SSSF apresentaram médias de etanol e conversão de celulose em etanol estatisticamente semelhantes e superiores à média observada para o tratamento SSF. Os valores de conversão de celulose em etanol observados são superiores aos relatados por Costa (2011), ao utilizar a mesma levedura desta pesquisa (*Kluyveromyces marxianus* CCT 4086), em um processo SSSF, a 37 °C e a 42 °C, obtendo 0,27 g etanol/g celulose e 0,17 g etanol/g celulose, respectivamente, utilizando bagaço de cana-de-açúcar; e se aproximam dos encontrados por Ballesteros et al. (2004), utilizando *Kluyveromyces*

*marxianus* CECT 10875, para um processo SSF a 42 °C (0,31-0,36 g etanol/g celulose). Os maiores teores de etanol e de conversão de celulose em etanol foram obtidos nos processos SHF e SSSF, cuja principal vantagem é a hidrólise (ou pré-hidrólise) realizada nas condições ótimas das enzimas (KULOYO, 2012), o que possibilita o início da fermentação com uma concentração de açúcar superior à inicial do processo SSF.

Com relação à produtividade volumétrica de etanol, que relaciona a concentração final com o tempo do processo, observou-se a maior média para o tratamento SHF, seguido pelo SSSF e, por fim, menor média foi observada para o tratamento SSF. Os maiores valores de produtividade volumétrica de etanol observados durante os processos SHF e SSSF, em comparação ao processo SSF, podem ser atribuídos ao maior grau de hidrólise enzimática, como discutido no parágrafo anterior e, também, à solubilização da biomassa antes da inoculação do microrganismo, o que torna o meio menos viscoso, facilitando a transferência de massa (KULOYO, 2012).

Entretanto, os valores para a produtividade em etanol foram calculados baseando-se apenas no tempo de fermentação, ou seja, a partir do momento em que a levedura foi adicionada. Dessa maneira, o processo SSF leva desvantagem em relação ao tempo total de tratamento (maior tempo). Se a produtividade fosse calculada com base nos tempos de hidrólise somados ao tempo de fermentação para cada processo, seriam obtidos, para SHF, SSSF e SSF, os valores de produtividade de 0,16 g etanol/ L.h; 0,18 g etanol/ L.h e 0,16 g etanol/ L.h, aproximando os tratamentos SHF e SSF. Os dados não foram calculados dessa forma pelo entendimento de que a produtividade só deve ser contada a partir do momento que a fermentação se inicia. Tais cálculos foram mostrados apenas para se comparar a produtividade em termos do tempo global dos processos, lembrando que, para a realização de SHF, foram necessários maior tempo de

hidrólise, inativação das enzimas e clarificação do meio por centrifugação, o que levou a um maior consumo de energia.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa mostraram a possibilidade de se obter etanol a partir da biomassa de polpa de café (na forma de sua fase sólida) utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086, recebendo destaque os processos de fermentação e hidrólise separadas e fermentação e hidrólise semissimultâneas. A termoestabilidade da levedura foi comprovada, obtendo-se maiores concentrações celulares a 37 °C e a 42 °C. Por meio da comparação da hidrólise enzimática da fase sólida da polpa de café pré-tratada com NaOH 4% m/v com a da fase sólida da polpa de café pré-tratada com água, a eficiência do pré-tratamento alcalino ficou comprovada, obtendo-se elevado teor de glicose. No entanto, os resultados obtidos para etanol ainda são baixos para processos industriais. Dessa maneira, mais estudos são necessários, para que se atinja um processo rentável, e processos em batelada continuamente alimentada parecem ser alternativas promissoras. Contudo, comprovou-se mais uma aplicabilidade biotecnológica da polpa de café (na forma de sua fase sólida), que é a produção de um combustível renovável.

## REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, July 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 1298 p.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 551-573, Oct. 2008.
- BALLESTEROS, M. et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 1843–1848, 2004.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n.3, p. 257-270, May, 1992.
- BERLIN, A. et al. Weak lignin-binding enzymes: a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121-124, p.163-170, Spring 2005.
- COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.



GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOERING, H. K.; SOEST, P. J. van. **Agricultural handbook**. Washington: ARS USDA, 1970.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p. 103–110, July 2004.

KULOYO, O. O. **Ethanol production by yeast fermentation of an *Opuntia ficus-indica* biomass hydrolysate**. 2012. 174 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Bioquímica e Biotecnologia de Alimentos)-University of the Free State, Bloemfontein, 2012.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, 2010.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 11, p. 641-649, 1981.

LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 17, p. 3367–3374, Dec. 2007.

MADRID, L. M.; DÍAZ, J. C. Q. Ethanol production from paper sludge using *Kluyveromyces marxianus*. **Dyna**, Medellín, v. 78, n. 170, p. 185-191, Dec. 2011.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 17, p. 6718–6727, Sept. 2010.

MEJÍA, C. C.; GUTIÉRREZ, A.J.; EL-HALWAGI, M. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 90, n. 3, p. 189-202, May 2012.

MENEZES, E. G. T. **Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido do café**. 2012. 236 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 138f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

NLEWEM, K. C.; THARASH Jr., M. E. Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 14, p. 5426–5430, July 2010.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 1, p. 33-43, Jan. 2011.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Modeling semi simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1098-1107, 2010.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: UFV, 1998.

SOUZA, C. J. A. et al. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 109, p. 63-69, Apr. 2012.

SOEST, P. J. van. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, London, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.

SURYAWATI, L. et al. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 101, n. 5, p. 894-902, Dec. 2008.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, v. 88, n. 11, p. 2142–2147, Nov. 2009.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, May 2011.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, n. 1, p. 87-116, 1988.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demanda mundial por processos sustentáveis indica a necessidade de estudos alternativos para o aproveitamento de resíduos agrícolas cujo destino atual contribui para a poluição ambiental.

No presente trabalho constatou-se a viabilidade científica de utilização da polpa de café na obtenção de etanol por via fermentativa, utilizando-se a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086.

O uso da fase líquida da polpa de café na produção de etanol, como diluente do melaço e do caldo de cana-de-açúcar, mostrou-se interessante, do ponto de vista econômico, uma vez que economiza água e também matéria-prima, devido ao fato de essa fase conter açúcares. O tamponamento observado nos meios fermentativos contendo fase líquida da polpa de café não pode ser atribuído aos ácidos málico, cítrico, succínico e oxálico; entretanto, pesquisas sobre outros compostos que podem estar presentes na fase líquida da polpa de café (ácidos clorogênicos, por exemplo) estão sendo realizadas.

A utilização da fase líquida da polpa de café em sua forma pura, para a obtenção de etanol, indicou a possibilidade de se produzir uma bebida fermentada utilizando essa fase em combinação com a levedura *Kluyveromyces marxianus*. Estudos realizados nessa área possibilitarão a obtenção de um novo produto.

O uso da fase sólida da polpa de café para a produção de etanol utilizando a *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 também foi viável, cientificamente. A etapa hidrolítica é a mais onerosa do processo de conversão de materiais lignocelulósicos a etanol. O uso de culturas mistas, contendo microrganismos que secretem enzimas no meio de cultura, tem sido amplamente pesquisado e parece ser uma alternativa promissora para a obtenção de etanol lignocelulósico.

A viabilidade econômica da obtenção do etanol a partir da polpa de café, utilizando a *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 será estudada e os resultados serão divulgados assim que os estudos estiverem concluídos.

## APÊNDICE

**CAPÍTULO 2- PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FASE LÍQUIDA DA POLPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR *Kluyveromyces marxianus* CCT4086**

Tabela 1A Resumo da análise de variância para a variável amido.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	15,329120	3,832280	0,0000
Erro	15	0,402575	0,026838	
Total corrigido	19	15,731695		
CV (%) = 16,46				

Tabela 2A Resumo da análise de variância para a variável pectina total.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	0,888308	0,222077	0,0000
Erro	15	0,002510	0,000167	
Total corrigido	19	0,890817		
CV (%) = 3,82				

Tabela 3A Resumo da análise de variância para a pectina solúvel.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	0,098223	0,024556	0,0000
Erro	15	0,012158	0,000811	
Total corrigido	19	0,110380		
CV (%) = 22,4				

Tabela 4A Resumo da análise de variância para a variável polifenóis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	0,142482	0,035621	0,0000
Erro	15	0,000249	0,000017	
Total corrigido	19	0,142731		
CV (%) = 2,71				

Tabela 5A Resumo da análise de variância para a variável açúcares redutores totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	1,429630	0,357407	0,0013
Erro	15	0,681550	0,045437	
Total corrigido	19	2,111180		
CV (%) = 3,69				

Tabela 6A Resumo da análise de variância para a variável açúcares redutores.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	4,717970	1,179493	0,0177
Erro	15	4,212125	0,280808	
Total corrigido	19	8,930095		
CV (%) = 2,49				

Tabela 7A Resumo da análise de variância para comparação da consumo de açúcares entre F1 e F2.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	102,950074	102,950074	0,8615
Erro	64	214650,428370	3353,912943	
Total corrigido	65	214753,378444		
CV (%) = 77,54				

Tabela 8A Resumo da análise de variância para comparação da consumo de açúcares entre F3 e F4.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	149,319075	149,319075	0,7961
erro	46	101720,300525	2211,310881	
Total corrigido	47	101869,619600		
CV (%) = 54,01				

Tabela 9A Resumo da análise de variância para comparação do pH entre F1 e F2.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	0,610947	0,610947	0,1050
Erro	64	14,456079	0,225876	
Total corrigido	65	15,067026		
CV (%) = 10,76				

Tabela 10A Resumo da análise de variância para comparação do pH entre F3 e F4.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	1,029602	1,029602	0,0000
Erro	46	1,586846	0,034497	
Total corrigido	47	2,616448		
CV (%) = 3,72				

Tabela 11A Resumo da análise de variância para a contagem total entre F1 e F2.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	0,000024	0,000024	0,9973
Erro	64	132,451679	2,069557	
Total corrigido	65	132,451703		
CV (%) = 40,77				

Tabela 12A Resumo da análise de variância para a contagem total entre F3 e F4.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	0,060919	0,060919	0,8646
Erro	46	95,346579	2,072752	
Total corrigido	47	95,407498		
CV (%) = 51,67				



Tabela 13A Resumo da análise de variância para a contagem das unidades formadoras de colônia para F1, F2, F3, F4 e F5.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	8,046667	2,011667	0,1230
Tempo	1	56,033333	56,033333	0,0000
Tratamento*Tempo	4	7,846667	1,961667	0,1306
Erro	20	19,440000	0,972000	
Total corrigido	29	91,366667		

CV (%) = 15,7

Tabela 14A Resumo da análise de variância para o teor de etanol de F1 e F2.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	57,614912	57,614912	0,6448
Erro	28	7428,427844	265,300994	
Total corrigido	29	7486,042756		

CV (%) = 74,06

Tabela 15A Resumo da análise de variância para o teor de etanol de F3 e F4.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	4,606001	4,606001	0,8519
Erro	28	3632,992068	129,749717	
Total corrigido	29	3637,598068		

CV (%) = 104,79

Tabela 16A Resumo da análise de variância para o rendimento em etanol.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	0,020898	0,005225	0,0004
Erro	15	0,008066	0,000538	
Total corrigido	19	0,028965		

CV (%) = 10,86

Tabela 17A Resumo da análise de variância para o rendimento em etanol.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	816,357880	204,089470	0,0004
Erro	15	308,286375	20,552425	
Total corrigido	19	1124,644255		
CV (%) = 10,84				

Tabela 18A Resumo da análise de variância para produtividade volumétrica de etanol.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	4	0,548430	0,137108	0,0000
Erro	15	0,011425	0,000762	
Total corrigido	19	0,559855		
CV (%) = 8,15				

### **CAPÍTULO 3: PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FASE SÓLIDA DA POLPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Tabela 19A Resumo da análise de variância da DQO dos ciclos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Ciclos	4	25171,531120	6292,882780	0,0000
Erro	15	7,059000	0,470600	
Total corrigido	19	25178,590120		
CV (%) = 0,86				

Tabela 20A Resumo da análise de variância do pH dos ciclos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Ciclos	4	43,632820	10,908205	0,0000
Erro	15	0,009700	0,000647	
Total corrigido	19	43,642520		
CV (%) = 0,21				

Tabela 21A Resumo da análise de variância dos sólidos totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Ciclos	4	2,113636591e+0009	528409147,777	0,0000
Erro	15	36826666,667525	2455111,1111	
Total corrigido	19	2,150463258e+0009		
CV (%) = 1,74				

Tabela 22A Resumo da análise de variância dos sólidos totais fixos.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Ciclos	4	224532090,556070	56133022,639018	0,1399
Erro	15	412367674,592625	27491178,306175	
Total corrigido	19	636899765,148695		
CV (%) = 12,33				

Tabela 23A Resumo da análise de variância dos sólidos totais voláteis.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Ciclos	4	2,752226330e+0009	688056582,497537	0,0000
Erro	15	197399724,592625	13159981,639508	
Total corrigido	19	2,949626055e+0009		
CV (%) = 7,76				

Tabela 24A Resumo da análise de variância para a variável teor remanescente de celulose.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	1040,626415	1040,626415	0,0000
Tempo	3	1,229029	0,409676	0,9599
Tratamento*Tempo	3	8,883519	2,961173	0,5520
Erro	24	99,223616	4,134317	
Total corrigido	31	1149,962578		
CV (%) = 2,69				

Tabela 25A Resumo da análise de variância para a variável teor remanescente de hemicelulose.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	130,952836	130,952836	0,0000
Tempo	3	3654,460212	1218,153404	0,0000
Tratamento*Tempo	3	108,622442	36,207481	0,0000
Erro	24	72,166779	3,006949	
Total corrigido	31	3966,202270		

CV (%) = 2,98

Tabela 26A Resumo da análise de variância para a variável teor remanescente de lignina.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	541,032289	541,032289	0,0000
Tempo	3	5755,489061	1918,496354	0,0000
Tratamento*Tempo	3	185,479051	61,826350	0,0000
Erro	24	100,420953	4,184206	
Total corrigido	31	6582,421353		

CV (%) = 5,54

Tabela 27A Resumo da análise de variância para a variável rendimento em massa.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	270,513800	270,513800	0,0000
Tempo	3	689,957062	229,985687	0,0000
Tratamento*Tempo	3	9,750225	3,250075	0,0009
Erro	24	10,203200	0,425133	
Total corrigido	31	980,424287		

CV (%) = 2,25

Tabela 28A Resumo da análise de variância para a variável teor de glicose.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	4,793382	4,793382	0,0000
Tempo	3	714,808579	238,269526	0,0000
Tratamento*Tempo	3	2,795884	0,931961	0,0050
Erro	24	4,059694	0,169154	
Total corrigido	31	726,457539		
CV (%) = 4,39				

Tabela 29A Resumo da análise de variância para a variável conversão de celulose em glicose.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	1	0,102039	0,102039	0,8600
Tempo	3	2333,556695	777,852232	0,0000
Tratamento*Tempo	3	10,096530	3,365510	0,3895
Erro	24	77,086587	3,211941	
Total corrigido	31	2420,841850		
CV (%) = 6,69				

**CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 UTILIZANDO FASE SÓLIDA DA POLPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) POR PROCESSOS DE SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SEPARADAS, SIMULTÂNEAS E SEMISSIMULTÂNEAS**

Tabela 30A Resumo da análise de variância para a variável contagem total de células (teste de termotolerância).

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	3	77,758608	25,919536	0,0000
Erro	104	159,365665	1,532362	
Total corrigido	107	237,124273		
CV (%) = 47,78				

Tabela 31A Resumo da análise de variância para a variável contagem contagem em placas.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Temperatura	3	12,650859	4,216953	0,0000
Tempo	1	59,814453	59,814453	0,0000
Temperatura*Tempo	3	12,499609	4,166536	0,0000
Erro	24	7,399175	0,308299	
Total corrigido	31	92,364097		
CV (%) = 33,06				

Tabela 32A Resumo da análise de variância para a variável etanol final.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	2	193,896343	96,948171	0,0000
Erro	18	21,554286	1,197460	
Total corrigido	20	215,450629		
CV (%) = 5,60				

Tabela 33A Resumo da análise de variância para a variável produtividade volumétrica de etanol.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	2	0,165783	0,082892	0,0000
Erro	18	0,007613	0,000423	
Total corrigido	20	0,173396		
CV (%) = 8,36				

Tabela 34A Resumo da análise de variância para a variável conversão de celulose em etanol.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr>Fc
Tratamento	2	0,038811	0,019405	0,0000
Erro	18	0,004190	0,000233	
Total corrigido	20	0,043001		
CV (%) = 5,32				