

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES ACESSOS DE
CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schum.) *in natura*
EM REATOR ROTATIVO E POSTERIOR FERMENTAÇÃO
DOS AÇÚCARES LIBERADOS A ETANOL**

DAIANE MENEGOL

Caxias do Sul

2017

DAIANE MENEGOL

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES ACESSOS DE
CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schum.) *in natura*
EM REATOR ROTATIVO E POSTERIOR FERMENTAÇÃO
DOS AÇÚCARES LIBERADOS A ETANOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando à obtenção de grau de Doutora em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon

Caxias do Sul

2017

M541h Menegol, Daiane

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES ACESSOS DE
CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schum.) in natura EM
REATOR ROTATIVO E POSTERIOR FERMENTAÇÃO DOS
AÇÚCARES LIBERADOS A ETANOL / Daiane Menegol. – 2017.
181 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

1. produção de etanol. I. Camassola, Marli, orient. II. Dillon, Aldo
José Pinheiro, coorient. III. Título.

DAIANE MENEGOL

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES ACESSOS DE
CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schum.) *in natura* EM
REATOR ROTATIVO E POSTERIOR FERMENTAÇÃO DOS
AÇÚCARES LIBERADOS A ETANOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

TESE APROVADA EM 28 DE SETEMBRO DE 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Prof. Dr. Jürgen Andreas

Prof. Dr. Márcio Antonio Mazutti

Dra. Fernanda Bettin

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho aos meus pais Juarez e Elisia, ao meu irmão André e ao meu noivo Maicon, pelo apoio, incentivo e amor dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

Deixo meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, fizeram parte desta caminhada e que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho:

- primeiramente a Deus;
- aos meus orientadores, Dra. Marli Camassola e Dr. Aldo J. P. Dillon, pelo conhecimento compartilhado;
- à Roselei C. Fontana, técnica do laboratório, pela ajuda prestada;
- aos professores da banca de acompanhamento, Dr. Mauricio Moura da Silveira e Dra. Fernanda Bettin, pelas orientações prestadas;
- aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários do Instituto de Biotecnologia;
- aos colegas e, principalmente, aos amigos do Laboratório de Enzimas e Biomassas, pela convivência e por todos os momentos de descontração que compartilhamos;
- aos meus pais Juarez J. Menegol e Elisia M. C. Menegol, pelo incentivo, carinho e confiança depositados em mim. Ao meu irmão André e ao meu noivo Maicon, pelo apoio;
- ao apoio estrutural e financeiro da UCS, FAPERGS e CAPES;
- ao Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA), do Instituto de Biotecnologia da UCS;
- aos pesquisadores Juarez C. Machado, Ricardo A. D. C. Ferreira, Francisco J. S. Lédo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG, pelo apoio com a elaboração do segundo artigo;
- ao Dr. Luiz Humberto Gomes, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP, por ter cedido gentilmente a linhagem CAT-1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Etanol de segunda geração	5
2.2 Biomassa lignocelulósica	9
2.2.1 Celulose	12
2.2.2 Hemicelulose	13
2.2.3 Lignina	13
2.2.4 Compostos minoritários	14
2.3 Capim-elefante	15
2.4 Enzimas para hidrólise de biomassa	18
2.4.1 Celulases	19
2.4.2 Xilanases	22
2.4.3 Oxidases	24
2.5 Conversão da biomassa lignocelulósica em etanol	25
2.6 Métodos de pré-tratamento	28
2.6.1 Pré-tratamentos físicos	29
2.7 Reatores para hidrólise de biomassa	31
2.8 Hidrólise enzimática e fermentação	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Biomassa de capim-elefante	39
3.2 Microrganismos	39
3.2.1 Crescimento e manutenção das linhagens	40
3.3 Produção de celulases e xilanases em cultivos no estado sólido (CES)	40
3.4 Determinação das atividades enzimáticas	41
3.4.1 Atividade sobre papel filtro (FPA)	41
3.4.2 Endoglicanases	42
3.4.3 β -glicosidases	42
3.4.4 Xilanases	43

3.5 Determinação da adsorção das celulases e xilanases ao substrato	44
3.5.1 SDS-PAGE das soluções enzimáticas	44
3.5.2 Zimogramas para celulases	45
3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
3.7 Composição da biomassa	47
3.7.1 Determinação da massa seca de materiais celulósicos	47
3.7.2 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos	48
3.7.3 Determinação de extraíveis	48
3.7.4 Determinação do conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina	48
3.7.5 Determinação de nitrogênio total e proteínas	49
3.8 Hidrólise enzimática de capim-elefante	50
3.9 Fermentação alcoólica	51
3.10 Testes estatísticos	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
Relatório Descritivo de Patente de Invenção (Patente No. BR 102015016795-4) - Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, processo de obtenção de açúcares fermentescíveis e uso dos mesmos	55
Artigo 1 - Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids	79
Artigo 2 - Comparison of the enzymatic hydrolysis of different elephant grass accessions under optimized conditions in a rotating hydrolysis reactor followed by alcoholic fermentation	113
5 DISCUSSÃO GERAL	137
6 CONCLUSÕES	141
7 PERSPECTIVAS	143
8 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	145

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Emissões dos gases do efeito estufa por etanol produzido a partir de diferentes matérias-primas em comparação com a gasolina (baseado no ciclo de vida).** 6
- Figura 2: Produtos que podem ser obtidos na biorrefinaria de material lignocelulósico.** 8
- Figura 3: Parede da célula vegetal.** 11
- Figura 4: Capim-elefante.** 17
- Figura 5: Representação da atuação das celulases e enzimas acessórias.** 21
- Figura 6: Representação da atuação das enzimas hemicelulases sobre a matriz hemicelulósica.** 24
- Figura 7: Processamento bioquímico e termo-químico da biomassa lignocelulósica.** 26
- Figura 8: Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico.** 28
- Figura 9: Fragmentação mecânica e dissociação de biomassa lignocelulósica em diferentes escalas.** 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual da massa seca de lignocelulósicos.	10
---	-----------

RESUMO

O uso de biomassas lignocelulósicas, como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), é interessante para a produção de etanol de segunda geração, principalmente em regiões onde outras culturas energéticas, como a cana-de-açúcar, apresentam baixa produtividade. Estudos anteriores têm mostrado que a biomassa de capim-elefante pode ser empregada tanto na formulação de meios para a produção de complexos enzimáticos hidrolíticos, quanto na hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares redutores fermentescíveis. Neste trabalho, foram realizados estudos de hidrólise enzimática e fermentação de diferentes acessos de capim-elefante *in natura*, com a utilização de enzimas de *Penicillium echinulatum* S1M29 e formulações enzimáticas comerciais. Inicialmente, foi desenvolvido um equipamento - hidrolisador rotativo, que promove ação mecânica através do uso de esferas de aço sobre a biomassa, permitindo a ocorrência concomitante de pré-tratamento físico e hidrólise enzimática da biomassa. Na etapa de validação, o hidrolisador rotativo foi empregado na hidrólise da biomassa de *P. purpureum* var. Cameroon, utilizando-se diferentes concentrações (m/v) de capim-elefante, sendo empregado o complexo celulolítico de *P. echinulatum* S1M29, com carga de 10 FPU/g de substrato, durante 12 h. Nessas condições, a conversão de substrato em glicose foi de 15%. Na etapa de fermentação, empregou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e obteve-se, com 16% (m/v) de capim-elefante uma concentração máxima de etanol de 6,1 g/L, com 12 h de processo, equivalente a uma produtividade de 0,5 g/L/h. A microscopia eletrônica de varredura, mostrou que existiu desestruturação das fibras da biomassa quando submetidas ao hidrolisador rotativo. Ademais, foi verificada estabilidade das enzimas durante o processo de hidrólise. Posteriormente, foram avaliados o pré-tratamento e a hidrólise enzimática de cinco acessos de capim-elefante, em hidrolisador rotativo, fazendo o uso de preparados enzimáticos comerciais - Celluclast[®], Cellic CTec2[®] e Cellic HTec2[®], com diferentes cargas enzimáticas e tempos de processo, tendo a concentração de substrato sido fixada em 16% (m/v) de capim-elefante. A variedade Cameroon foi utilizada, *a priori*, para definição das condições ótimas de hidrólise, sendo possível alcançar uma produtividade máxima de 1 g/L/h de etanol, por meio da ação de 30 FPU Cellic CTec2[®]/g de capim-elefante. Após planejamento experimental, verificou-se que o tempo de processo de 8 h e a concentração enzimática de 50 FPU/g de capim-elefante foram ideais para máximas liberações de glicose, atingindo 29 g/L. Nessas condições, a conversão de substrato em glicose foi em torno de 40%. Observou-se que a carga da enzima empregada e a concentração de açúcares liberados são diretamente proporcionais até certo limiar, a partir do qual o aumento deixa de ser proporcional à carga da enzima. Adicionalmente, verificou-se que os acessos Taiwan A-146 e CPAC, quando submetidos à hidrólise enzimática com as formulações comerciais, foram os que resultaram nas maiores concentrações de etanol (13,86 g/L e 12,73 g/L, respectivamente), sendo que a conversão de substrato em glicose foi em torno de 40%. Os resultados indicam que maiores rendimentos na produção de etanol foram obtidos a partir dos açúcares liberados de capim-elefante quando a biomassa foi submetida ao hidrolisador rotativo na etapa de hidrólise. Esses dados indicam que houve mudanças na estrutura da biomassa que permitiram um maior rendimento de etanol. Esses aumentos demonstram que não só a biomassa, assim como as enzimas e a fermentação precisam ser trabalhadas para obter maiores concentrações de etanol.

Palavras-chave: *Pennisetum purpureum*, acessos, hidrólise enzimática, hidrolisador rotativo, produção de etanol.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomasses such as elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) is interesting for the production of second generation ethanol, especially in regions where another cultures, such as sugar cane presents low productivity. Previous studies showed that elephant grass biomass can be employed both in the formulation of media for hydrolytic enzymatic complexes and in the enzymatic hydrolysis to obtain reducing sugars fermentable. In this work, studies of enzymatic hydrolysis and fermentation of different untreated elephant grass accessions were carried out, with the use of *Penicillium echinulatum* S1M29 enzymes and commercial enzymes. Initially, was developed an equipment - rotating hydrolysis reactor, which promotes mechanical action through the use of steel spheres on the biomass, allowing the simultaneous occurrence of physical pretreatment and enzymatic hydrolysis of the biomass. In the validation step, the rotating hydrolysis reactor was used in the *P. purpureum* variety Cameroon hydrolysis, with different concentrations (w/v) of substrate, using the cellulolytic complex of *P. echinulatum* S1M29, with a load of 10 FPU/g substrate for 12 h. Under these conditions, the conversion of substrate to glucose was 15%. In the fermentation stage, *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 was used and with a 16% (w/v) substrate, obtained a maximum ethanol concentration of 6.1 g/L, with 12 h of process, which is equivalent to a productivity of 0.5 g/L/h. The electron microscopy shows restructuring of the biomass fibers submitted to the rotating hydrolysis reactor. In addition, the stability of the enzymes of *P. echinulatum* S1M29 was verified during the hydrolysis process. Subsequently, the pretreatment and enzymatic hydrolysis of five elephant grass accessions in a rotating hydrolysis reactor were evaluated, using commercial enzyme preparations, Celluclast[®], Cellic CTec2[®] e Cellic HTec2[®], with different enzymatic loading and processing times, and the substrate concentration was fixed at 16% (w/v). The Cameroon variety was used *a priori* to define the optimum hydrolysis conditions, and it was possible to achieve a maximum productivity of 1 g/L/h by the action of 30 FPU Cellic CTec2[®]/g elephant grass. After experimental design, it was verified that the process time of 8 h and the enzymatic concentration of 50 FPU/g elephant grass were ideal for maximum releases of glucose reaching 29 g/L. Under these conditions, the conversion of substrate to glucose was around 40%. It has been observed that the enzyme concentration employed and the concentration of released sugars is directly proportional up to a certain threshold, from which the increase is no longer proportional. Regarding to accessions, Taiwan A-146 and CPAC, when submitted to enzymatic hydrolysis with commercial mixtures, resulted in the highest concentrations of ethanol (13.86 g/L and 12.73 g/L, respectively), and the conversion of substrate to glucose was around 40%. The results indicate that higher ethanol yields were obtained from sugars released from elephant grass when the biomass was submitted to the rotating hydrolysis reactor. These data indicate that there have been changes in the biomass structure that allowed a higher ethanol yield. These increases demonstrate that not only biomass, enzymes and fermentation need to be improved up to obtain higher concentrations of ethanol.

Keywords: *Pennisetum purpureum*, accessions, enzymatic hydrolysis, rotating hydrolysis reactor, ethanol production.

1 INTRODUÇÃO

Para atender à demanda energética, ainda é grande a dependência da utilização de combustíveis fósseis, que contribuem para a liberação dos gases causadores do efeito estufa e para o aquecimento global. A conversão de biomassa lignocelulósica em combustíveis, como o etanol, é uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, por ser menos poluente com relação a emissão de gases causadores do efeito estufa, pela sua disponibilidade e baixo custo, além do interesse econômico na produção de etanol.

No Brasil, os avanços tecnológicos têm permitido ao etanol de cana-de-açúcar maior produtividade, competitividade e menores custos de produção em comparação a outras fontes alternativas, como etanol de milho e de beterraba, que também são comumente empregadas para a produção de açúcares fermentescíveis em outros países.

Um dos processos que compõem a tecnologia para o aproveitamento dos lignocelulósicos é a hidrólise enzimática, na qual se empregam enzimas – celulasas e hemicelulasas – que promovem a hidrólise de materiais lignocelulósicos com a liberação de açúcares que podem ser fermentados para produzir xaropes compostos majoritariamente de glicose e xilose que, posteriormente, possam ser fermentados a etanol ou outros metabólitos de interesse, como o xilitol. A hidrólise enzimática é mais promissora quando comparada à hidrólise ácida, devido à alta especificidade das enzimas ao substrato, ao uso de temperaturas mais brandas e à geração de compostos inibitórios ser nula ou mínima.

Entretanto, ainda existem gargalos que dificultam a viabilidade econômica do processo de produção de etanol de segunda geração, sendo os mais importantes a baixa eficiência dos pré-tratamentos disponíveis e a etapa relacionada ao processo de hidrólise enzimática. Além de uma etapa de pré-tratamento menos onerosa, é necessária a disponibilidade de um complexo enzimático econômico e a realização de hidrólises com elevadas concentrações de biomassa.

Como fonte do complexo enzimático, linhagens mutantes de *Trichoderma reesei* são descritas na literatura como as mais aptas ao processo, visto o seu potencial hidrolítico, bem como o custo de produção dessas enzimas, que já são conhecidos. Também, entre os microrganismos que produzem simultaneamente celulasas e xilanasas, linhagens mutantes de *Penicillium echinulatum* se destacam por apresentarem um complexo enzimático com estabilidade a 50 °C, condição relevante para aplicação dessas enzimas em hidrólise e, ainda, uma maior proporção da atividade de β -glicosidases com relação à FPA, comparado ao complexo enzimático de *T. reesei*.

Particularmente no Rio Grande do Sul, o etanol é importado de outros estados, aumentando o preço final desse combustível devido aos custos com transporte. Estudos têm mostrado que o clima desse Estado não permite ao cultivo de cana-de-açúcar alcançar produtividades de 80 t/ha/ano, como pode ser observado em outras regiões do país.

Uma alternativa para a produção de etanol no Rio Grande do Sul e em outros estados onde a produção de cana-de-açúcar não seja favorável, seria o uso de biomassa de *Pennisetum purpureum* (capim-elefante). Essa gramínea apresenta uma produção elevada de biomassa. Comparativamente, enquanto a produção de biomassa da cana-de-açúcar é de 22 t/ha/ano (massa seca), a de eucalipto é de 9 t/ha/ano (massa seca), a do capim-elefante é em torno de 40 t/ha/ano (massa seca) (Somerville *et al.*, 2010).

Apesar da sua alta produtividade, a hidrólise enzimática de capim-elefante ainda é limitada pela sua composição química, principalmente no que diz respeito ao conteúdo de lignina, cinzas e à quantidade de extraíveis. Contudo, a disponibilidade de diferentes acessos dessa espécie poderia permitir a seleção de cultivares que apresentem uma maior produtividade em biomassa, maiores rendimentos em açúcares fermentescíveis e sem a utilização de processos de pré-tratamentos onerosos, como os que utilizam ácidos e bases.

A utilização de maiores cargas de biomassa a serem submetidas à hidrólise enzimática também é importante para permitir a liberação de maiores concentrações de açúcares e, conseqüentemente, uma maior produção de etanol; sendo assim, equipamentos que comportem uma maior quantidade de biomassa são necessários. Neste contexto, a realização de estudos de hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos, como o capim-elefante, é de fundamental importância para o desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol de segunda geração.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi realizar estudos de hidrólise enzimática de diferentes acessos de capim-elefante, empregando o complexo enzimático de *P. echinulatum* S1M29 e enzimas comerciais, além de fermentações dos açúcares liberados de capim-elefante por *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, visando contribuir com o desenvolvimento de tecnologia para a produção de etanol a partir dessa gramínea, tendo como objetivos específicos:

- desenvolver um reator para hidrólise de elevadas concentrações de materiais lignocelulósicos;
- definir as condições mais adequadas de hidrólise enzimática, avaliando a concentração de substrato, o tempo de residência e a carga enzimática em hidrolisador rotativo, utilizando capim-elefante *in natura*;
- avaliar a estabilidade das enzimas de *P. echinulatum* S1M29 durante o processo de hidrólise;
- hidrolisar enzimaticamente diferentes acessos de capim-elefante *in natura*, em hidrolisador rotativo, utilizando enzimas de *P. echinulatum* e enzimas comerciais, a fim de identificar os acessos capazes de proporcionar as maiores liberações de açúcares redutores quando submetidos à hidrólise;
- produzir etanol a partir dos xaropes provenientes da hidrólise enzimática dos diferentes acessos de capim-elefante, utilizando a levedura *S. cerevisiae* CAT-1.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol de segunda geração

O consumo de energia aumentou nos últimos séculos devido ao aumento da população e à industrialização. O petróleo tem sido o principal recurso para satisfazer ao aumento da demanda por combustíveis. Com o aumento da utilização de produtos petrolíferos, como a gasolina, a quantidade de gases liberados para a atmosfera também têm aumentado (Sun & Cheng, 2002). Esse rápido desenvolvimento afeta a estabilidade dos ecossistemas, o clima global, bem como as reservas globais de petróleo, culminando em impactos ambientais e em aumento no preço do petróleo (Balat, 2011). Assim, buscam-se cada vez mais fontes alternativas de energia. Dentre os muitos recursos de energias renováveis (biomassa, solar, eólica, geotérmica, etc.), a biomassa lignocelulósica apresenta grande destaque, pois é a única fonte que pode ser utilizada diretamente para a produção de diferentes combustíveis, especialmente o etanol (Lynd *et al.*, 1991; Lynd *et al.*, 1999; Hoffert *et al.*, 2002; Dwivedi *et al.*, 2009; Scholl *et al.*, 2015). Além de etanol, outros produtos com alto valor agregado, como enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metano, hidrogênio, butanol e ração animal podem ser obtidos a partir de material residual (Pandey *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2003; Karimi & Taherzadeh, 2016).

Os lignocelulósicos são a biomassa renovável mais abundante, com produção estimada em $1,0 \times 10^{10}$ milhões de toneladas por ano em todo o mundo (Sánchez & Cardona, 2008). A conversão biológica de diferentes matérias-primas lignocelulósicas em etanol oferece inúmeros benefícios, além de limitar a emissão de dióxido de carbono na atmosfera, prevenindo o efeito estufa, porém, seu desenvolvimento ainda é dificultado por aspectos econômicos e técnicos (Sánchez & Cardona, 2008; Kotarska *et al.*, 2015).

O processo de biotransformação de lignocelulósicos está centrado na hidrólise enzimática da fração de celulose em glicose, seguida de fermentação a etanol (Gan *et al.*, 2002). Porém, para uma eficiente conversão da biomassa em etanol, é necessário, também, o aproveitamento dos açúcares da fração hemicelulósica (Gupta *et al.*, 2012).

Tecnologias para o desenvolvimento da relação custo-benefício na produção de etanol combustível é uma prioridade em muitos centros de pesquisa, universidades, empresas privadas e mesmo de diferentes governos (Cardona *et al.*, 2007). Vários governos vêm desenvolvendo estratégias para buscar novas fontes de energia renovável (Dwivedi *et al.*, 2009). Assim, a produção de etanol combustível tem aumentado consideravelmente porque muitos países procuram redução das importações de petróleo, impulsionando as economias rurais e a melhoria da qualidade do ar (Sánchez & Cardona, 2008). Na Figura 1, são apresentados dados sobre as emissões de gases do efeito estufa resultantes da utilização de biocombustíveis em comparação com a gasolina.

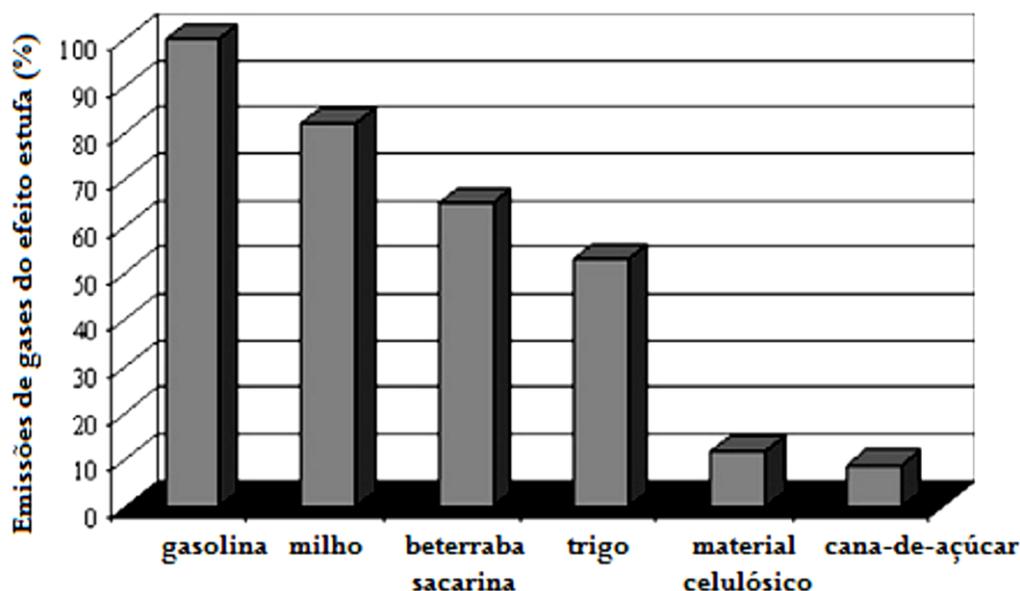


Figura 1. Emissões dos gases do efeito estufa por etanol produzido a partir de diferentes matérias-primas em comparação com a gasolina (baseado no ciclo de vida) (adaptado de Balat, 2011).

Poucos países têm recursos naturais para produzir grandes quantidades de culturas energéticas sem comprometer a produção de alimentos. No Brasil, 851 milhões de hectares são utilizados para a produção de combustíveis sem que haja competição com a produção de alimentos (Leite *et al.*, 2009). Porém, como no Brasil a geração de etanol está centrada na utilização de cana-de-açúcar, a geração de bagaço de cana-de-açúcar tem aumentado nos últimos anos. Para cada tonelada de cana-de-açúcar, são produzidos 270-280 kg de bagaço (50% de umidade) (Socol *et al.*, 2010). Em média, 50% dessa cana são destinados à produção de etanol e a outra metade é destinada à produção de açúcar (Santos *et al.*, 2011).

Com relação à produção de etanol de cana-de-açúcar, fazendo-se uma analogia com uma refinaria de petróleo, onde todas as frações do barril de petróleo são exploradas, toda a planta da cana-de-açúcar deve ser transformada na biorrefinaria (CGEE, 2009). Em uma biorrefinaria, processam-se diversos materiais lignocelulósicos, de forma sustentável, para a produção de uma série de produtos com valor agregado por meio da combinação de diferentes tecnologias (Carvalho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2015). Na Figura 2, verificam-se os produtos que podem ser obtidos a partir das frações principais da biomassa: hemicelulose, celulose e lignina (Santos *et al.*, 2011).

A eficiente conversão de materiais lignocelulósicos a etanol e outras substâncias com valor agregado ainda é um desafio e essa conversão é uma questão relevante para o desenvolvimento sustentável da indústria química em um futuro cenário pós-petróleo (Zhang, 2008; Menon & Rao, 2012).

De acordo com dados da British Petroleum (2013), a reserva mundial de petróleo até o final de 2012, era estimada em 265,3 bilhões de m³, sendo que essa reserva é capaz de suportar o consumo de energia por aproximadamente 51 anos, baseando-se no consumo atual.

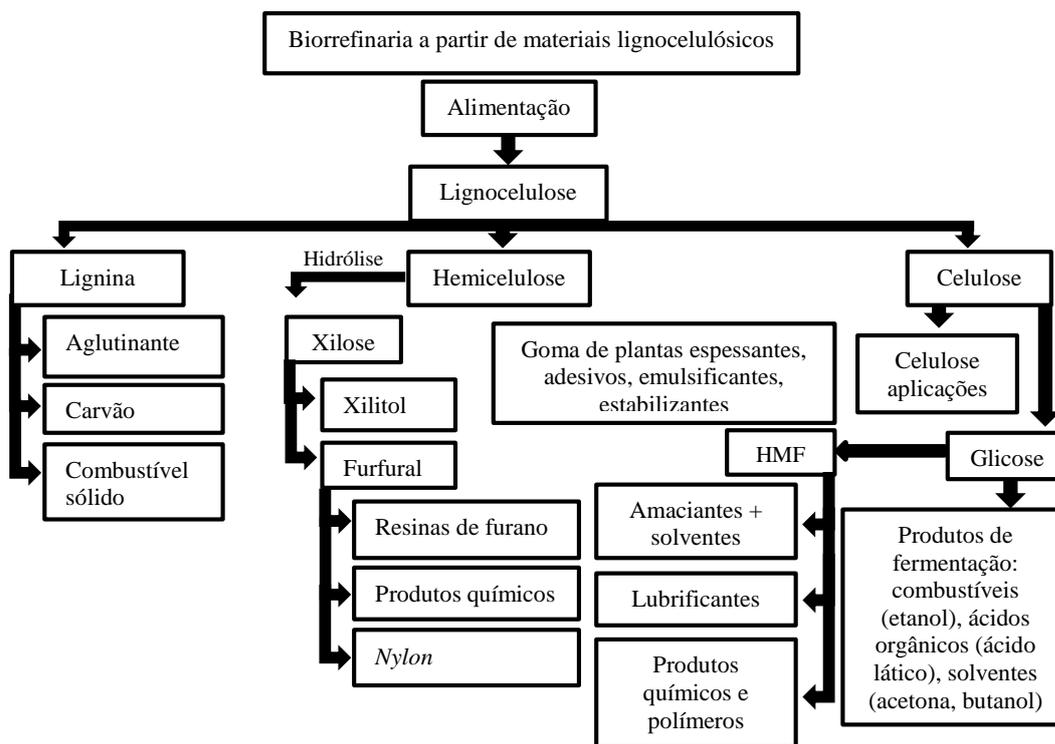


Figura 2. Produtos que podem ser obtidos na biorrefinaria de material lignocelulósico.

Adaptado de Santos *et al.* (2011).

Muitas plantas-piloto para a produção de etanol de segunda geração estão sendo construídas e a maioria está localizada nos EUA, mas países como Canadá, Suécia, Finlândia, Rússia e Japão também são sedes de algumas iniciativas (Santos *et al.*, 2011). De acordo com a Revista *Etanol Producer Magazine* (9 de outubro de 2013), entrou em funcionamento, na cidade de Crescentino, na Itália, a primeira planta de etanol resultante de uma interação entre a Beta Renewables, o Mossi Ghisolfi Group e a Novozymes. A empresa foi projetada e construída para a produção de etanol a partir de resíduos agrícolas e culturas energéticas, em escala comercial, usando a tecnologia de conversão enzimática. De acordo com Cannella & Jorgensen (2013), essas plantas-piloto contribuem para a construção do conhecimento e possuem a experiência necessária para compreender como a bioconversão de lignocelulose deve ser feita.

Uma das empresas que mais investem em pesquisa no segmento de energia é a Petrobras S.A. A empresa opera prioritariamente nas áreas de exploração, produção, refino, comercialização e transporte de petróleo e seus derivados, no Brasil e no exterior (Santos *et al.*, 2011). Ainda no Brasil, a Granbio de Alagoas e a Raízen de São Paulo construíram plantas para a produção de etanol de segunda geração.

Menon & Rao (2012) destacam algumas vantagens e desvantagens da utilização de matérias-primas lignocelulósicas. Entre as vantagens, encontra-se a localização geográfica da matéria-prima, onde as fontes são mais uniformemente distribuídas do que as fósseis, permitindo a segurança do fornecimento de matéria-prima, geração de menores quantidades de gases causadores do efeito estufa, regeneração dos solos e armazenamento de carbono. Entre as desvantagens, há a incerteza da viabilidade técnico-econômica na produção em larga escala e a problemática da disponibilidade, fornecimento ou armazenamento de matérias-primas para a produção em grande escala.

De acordo com Gerbrandt *et al.* (2016), o etanol proveniente de lignocelulósicos pode reduzir o ciclo de vida dos gases causadores do efeito estufa com relação ao etanol convencional. No entanto, esses autores abordam que uma melhor compreensão dos impactos ambientais do ciclo de vida do etanol lignocelulósico é fundamental antes da implantação em uma escala mais ampla.

2.2 Biomassa lignocelulósica

Os lignocelulósicos são os recursos renováveis mais abundantes na superfície da Terra, o que os torna matérias-primas atrativas para a produção de etanol e outros combustíveis alternativos (Broda, 1992; Kansoh *et al.*, 1999; Szengyel, 2000; Kalogeris *et al.*, 2003; Adsul *et al.*, 2004; Sánchez & Cardona, 2008).

Os materiais lignocelulósicos incluem diversos resíduos agrícolas, madeiras duras, madeiras moles e resíduos da indústria de papel. A composição desses materiais - celulose,

hemicelulose e lignina – apresenta proporções distintas em diferentes lignocelulósicos (Saha, 2003; Mosier *et al.*, 2005; Kumar & Murthy, 2011), como mostrado na Tabela 1. Outros compostos poliméricos como amido, pectina e outros compostos minoritários estão presentes em menores quantidades.

Tabela 1. Composição percentual da massa seca de lignocelulósicos.

Lignocelulósico	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referência
Sabugo de milho	37,5	22,4	17,6	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Palha de milho	14,2	16,8	8,4	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Madeira de <i>Pinus</i>	46,4	8,8	29,4	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Capim-elefante	30,9	30,7	8,5	Santos <i>et al.</i> (2001)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6	Cruz <i>et al.</i> (2000)
Bagaço de cana-de-açúcar	50,5	23,4	21,7	Kansoh <i>et al.</i> (1999)
Capim-elefante	35,9	22,4	20,7	Menegol <i>et al.</i> (2014a)

Zabed *et al.* (2016) divide a biomassa lignocelulósica em diferentes grupos, incluindo as culturas energéticas (gramíneas perenes e demais culturas energéticas), plantas aquáticas, biomassa florestal e resíduos florestais, resíduos agrícolas e fração orgânica dos resíduos sólidos municipais.

A biomassa lignocelulósica é constituída basicamente de holocelulose - celulose e hemicelulose, e lignina (Zabed *et al.*, 2016). A celulose, nos vegetais, permanece associada com a hemicelulose e a lignina (Martín *et al.*, 2007). A celulose e a hemicelulose são firmemente ligadas à lignina através de ligações covalentes e de hidrogênio, o que torna a estrutura recalcitrante à despolimerização (Limayem & Ricke, 2012). A estrutura cristalina da celulose confere elevada resistência, tornando esse biopolímero insolúvel em água e em outros solventes (Santos *et al.*, 2012), apesar da região amorfa da celulose adsorver água (Karimi & Taherzadeh, 2016).

A pectina, também presente na parede celular, tem alta complexidade estrutural e funcional (Glass *et al.*, 2013). Os polissacarídeos pécticos são importantes no controle da

porosidade da parede celular, na adesão de células subjacentes, na aderência intercelular na defesa da planta (Canteri *et al.*, 2012).

Na Figura 3, observa-se um esquema da distribuição da lignina, hemicelulose e celulose de um tecido vegetal.

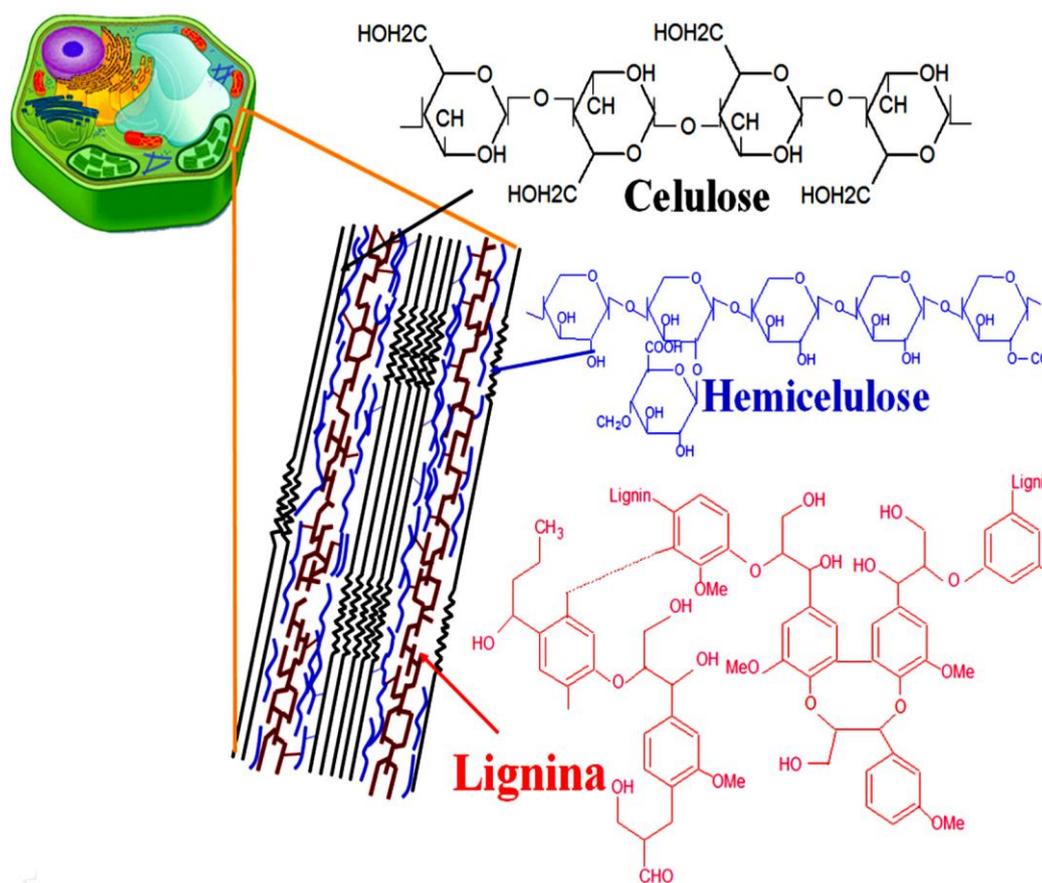


Figura 3. Parede da célula vegetal (elaborada por Camassola, 2009).

A estrutura química da biomassa lignocelulósica, que compreende basicamente polímeros de carboidratos e lignina, tornam a estrutura recalcitrante à desconstrução, restringindo, assim, a capacidade das enzimas para converter esses polímeros em açúcares fermentescíveis (Mupondwa *et al.*, 2017).

2.2.1 Celulose

A celulose é o composto orgânico mais abundante da Terra, sendo que a maior fração da biomassa lignocelulósica é composta por esse biopolímero (Medve, 1997; Morais *et al.*, 2015). É um homopolissacarídeo linear formado de unidades de glicose unidas por ligações do tipo β (1-4) (Galdeano, 2001). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Essa estrutura dissacarídica denomina-se celobiose (Fengel & Wegener, 1989). As moléculas de celulose estão unidas em microfibrilas que, por sua vez, formam fibrilas que podem enrolar-se umas nas outras, formando uma macrofibrila com até 500 mil moléculas de celulose. As fibras celulósicas da parede da célula vegetal dispõem-se em uma matriz reticulada de hemiceluloses e de substâncias pécnicas (Raven *et al.*, 1976).

As ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias das cadeias de celulose resultam na sua cristalinidade. As regiões cristalinas, onde as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (Galdeano, 2001). As regiões de celulose amorfa exibem baixa resistência, constituindo-se em pontos para ataques químicos e biológicos (Fan *et al.*, 1980).

Estudos desenvolvidos por Coughlan (1985) demonstraram que os sítios de menor organização molecular, localizados na superfície da estrutura cristalina, são mais susceptíveis ao ataque enzimático. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos são eficazes em catalisar a hidrólise da celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis, como a glicose e a celobiose. A celulose é sintetizada por todas as plantas superiores, por certas bactérias e por alguns protozoários (Medve, 1997).

De acordo com Morais *et al.* (2015), a resistência mecânica da planta se dá pela linearidade da celulose, pela sua cristalinidade e pela sua estrutura fibrosa.

2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ou heteropolímeros presentes na parede celular vegetal primária e secundária, que correspondem de 10 a 40% da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos (Fengel & Wegener, 1989; Parisi, 1989; Morais *et al.*, 2015). São formadas por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcares ácidos. As xilanas, as hemiceluloses mais abundantes, são constituídas por unidades de β -D-xilopiranosas unidas por ligações do tipo β -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo β -1,3. Além de xilose, a xilana pode conter arabinose, ácido glucurônico e seu 4- σ -metil-éter e grupo acetil (Saha, 2003).

As hemiceluloses são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Ramos, 2003). Todos os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis, sendo mais susceptíveis à hidrólise do que a celulose (Pérez *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2015).

Pelo fato da hemicelulose ser mais susceptível à hidrólise do que a celulose, produtos de degradação são produzidos durante os processos de pré-tratamento da biomassa. A desidratação de hexoses produz 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF) e a degradação de pentoses produz furfural. Ácido acético é formado a partir dos grupos acetil presentes na fração hemicelulósica e os ácidos fórmico e levulínico, derivados da degradação do furfural e HMF, também podem ser formados (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Alvira *et al.*, 2010).

2.2.3 Lignina

A lignina é a segunda macromolécula mais abundante da Terra e apresenta uma estrutura molecular bastante complexa. É um heteropolímero amorfo de alta massa molecular, constituído por unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações (Pérez *et al.*,

2002). É formada pela união covalente de vários monômeros fenólicos. Essas ligações são do tipo éter (Jung *et al.*, 1996). Devido à sua composição química, a lignina é hidrofóbica e extremamente resistente à decomposição (Pérez *et al.*, 2002). A lignina liga-se à hemicelulose por ligações covalentes (Morais *et al.*, 2015). Considera-se que a lignina e a respectiva ligação covalente com os polissacarídeos da parede celular sejam os principais obstáculos ao ataque enzimático da fibra (Jung *et al.*, 1996).

Essa macromolécula é derivada dos álcoois hidroxicinâmicos, *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, também denominados monolignóis (Endt *et al.*, 2000). Dependendo do grau de metoxilação do anel aromático, diz-se que a unidade básica é *p*-hidroxifenil (não metoxilada, derivada do álcool *p*-cumarílico), guaiacil (apresentando uma metoxila, derivada do álcool coniferílico) ou siringil (apresentando duas metoxilas, derivadas do álcool sinapílico) (Fengel & Wegener, 1989; Moraes *et al.*, 2015). A composição e a distribuição da lignina são importantes, assim como a sua concentração. Algumas madeiras moles são mais recalcitrantes do que madeiras duras. Isso pode estar relacionado ao tipo de lignina, guaiacil ou siringila. Sugere-se que a guaiacil restringe o acesso das enzimas à fibra mais do que a siringila (Ramos *et al.*, 1992).

A lignina está presente na madeira em cerca de 20 a 30%, agindo como material adesivo, agente de enrijecimento e barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (Fengel & Wegener, 1989). A utilização eficaz dos componentes da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina) desempenha um papel significativo na viabilidade econômica do etanol celulósico (Menon & Rao, 2012).

2.2.4 Compostos minoritários

Os compostos minoritários representam uma fração menor na composição química dos materiais lignocelulósicos. São formados por amido, pectina, resinas, ácidos graxos, ceras, terpenos e compostos fenólicos (Fengel & Wegener, 1989; Martín *et al.*, 2007).

A presença desses componentes pode ser devido a fatores genéticos e climáticos. Esses componentes dividem-se em duas classes. A primeira engloba os extrativos, por serem extraíveis em água e solventes orgânicos neutros ou volatilizados por arraste de vapor. Já a segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas. A presença de alguns materiais limita o acesso aos carboidratos, causando hidrólise incompleta. Os solventes e o número de extrações necessárias para remover todos os materiais não estruturais variam de acordo com o tipo de biomassa. Em gramíneas, por exemplo, extração com água remove sacarose, enquanto extração com etanol e hexanos remove clorofila, proteínas, gorduras e óleos. A ordem das etapas de extração também é importante para uma extração mais eficiente (Ramos, 2003; Hames, 2011).

2.3 Capim-elefante

A espécie *Pennisetum purpureum*, conhecida como capim-elefante ou capim-napier-elefante, pertence à família Graminae (Poaceae), subfamília Panicoideae, tribo: Paniceae, gênero: *Pennisetum* L. Rich e espécie: *P. purpureum*, Schumacher (Stebbins & Crampton, 1961).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2010), essa espécie caracteriza-se por ser perene, de porte ereto e com talos grossos, de até 4,5 m de altura. É encontrada em áreas de solo úmido, com precipitação anual acima de 1000 mm, apresenta melhor crescimento em solos profundos e de textura moderada a muito pesada. É tolerante a secas breves, sendo a gramínea forrageira mais amplamente cultivada. Essa espécie rende grandes quantidades de matéria seca e apresenta alta produção de forragem quando submetida a cortes frequentes, adubação e irrigação. É plantada da mesma forma que a cana-de-açúcar (em sulcos), exige poucos nutrientes complementares para o crescimento e pode ser colhida até quatro vezes por ano (Osava, 2007).

Durante o período das chuvas e quando manejado intensivamente, o capim-elefante pode atingir produções diárias superiores a 200 kg/ha de matéria seca (Gomide, 1994). Por outro lado, a estacionalidade da produção de forragem durante o período seco do ano é bastante acentuada, constituindo-se numa das principais limitações dessa espécie. Assim, para a maioria das cultivares existentes, somente 10-15% da produção anual de forragem são produzidos durante o período da seca (Botrel & Alvim, 1992).

De acordo com Pereira (1992), as cultivares de capim-elefante podem ser agrupadas de acordo com algumas características, como por exemplo, época de florescimento, largura da folha e constituição genética. Os grupos básicos são:

- grupo Anão: as cultivares deste grupo são mais adaptadas para pastejo em função do menor comprimento dos entrenós; as plantas desse grupo apresentam porte baixo (1,5 m) e elevada relação lâmina/colmo, sendo o principal representante deste grupo a cultivar Mott;

- grupo Cameroon: apresentam plantas de porte ereto, colmos grossos, predominância de perfilhos basilares, folhas largas, florescimento tardio (maio a julho) ou ausente e touceiras densas; têm-se como exemplo as cultivares Cameroon, Piracicaba, Vruckwona e Guaçú;

- grupo Mercker: caracterizado por apresentar menor porte, colmos finos, folhas finas, menores e mais numerosas e época de florescimento precoce (março a abril); as cultivares Mercker, Mercker comum, Mercker Pinda, entre outras, fazem parte deste grupo;

- grupo Napier: as cultivares deste grupo apresentam variedades de plantas com colmos grossos, folhas largas, época de florescimento intermediária (abril a maio) e touceiras abertas; têm-se como exemplo as cultivares Napier, Mineiro e Taiwan A-146;

- grupo dos Híbridos: resultantes do cruzamento entre espécies de *Pennisetum*, principalmente *P. purpureum* e *Pennisetum americanum*.

De acordo com Rodrigues *et al.* (2001), o capim-elefante (Figura 4) chegou ao Brasil por volta do ano de 1920, após ter sido descoberto pelo Coronel Napier, em 1905, na África

Tropical. Inicialmente, essa espécie era utilizada como alimento para o gado. No Rio Grande do Sul, é relatado que essa espécie tenha sido introduzida em 1920, com estacas oriundas dos Estados Unidos (Farias, 1994).



Figura 4. Capim-elefante.

Fonte: http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/capimelefante/Index.htm

P. purpureum é uma espécie tropical, que apresenta metabolismo C4. Ela tem sido considerada como uma nova alternativa para as culturas energéticas em alguns países e espera-se que esta espécie forneça recursos abundantes e sustentáveis de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis. Entretanto, a presença de lignina dificulta a degradação de polissacarídeos da parede celular em açúcares simples que seriam destinados à fermentação em etanol e biogás (Xie *et al.*, 2011).

Um aspecto interessante do capim-elefante é a sua produtividade quando comparada à de outras culturas no que diz respeito à capacidade de gerar energia. O capim-elefante apresenta

uma produtividade de 40 toneladas de matéria seca por ha/ano (Woodard & Prine, 1993). Comparando sua produtividade com outras culturas, pode-se verificar o potencial desta gramínea para a produção de etanol. Os dados mostram que o milho produz de 7 a 10 toneladas de matéria seca por ha/ano, enquanto *Agave* spp. produz de 10 a 34 toneladas de matéria seca por ha/ano (Somerville *et al.*, 2010).

Por ser uma espécie de rápido crescimento e de alta produção de biomassa vegetal, o capim-elefante apresenta um alto potencial como fonte alternativa de energia e também para a obtenção de carvão vegetal. Além disso, deve-se destacar que o capim-elefante, por apresentar um sistema radicular bem desenvolvido, contribui de forma eficiente para aumentar o conteúdo de matéria orgânica do solo e para o sequestro de carbono (Urquiaga *et al.*, 2006).

2.4 Enzimas para hidrólise de biomassa

A degradação de materiais lignocelulósicos em açúcares monoméricos por meio da ação de enzimas celulolíticas tem grande importância, uma vez que os açúcares podem ser utilizados como matéria-prima em diferentes processos biotecnológicos. Recentemente, a investigação para encontrar substratos adequados para a produção de biocombustíveis é de particular interesse. O substrato ideal deve ser de baixo custo, facilmente processado e disponível em grandes quantidades. A produção de celulases *in situ* pode melhorar a economia do processo em comparação com a utilização de enzimas comerciais (Lawford & Rousseau, 2003).

A conversão de biomassa requer uma mistura de diferentes enzimas, incluindo celulases (endoglicanases, exoglicanases, celobiohidrolases), β -glicosidases e hemicelulases (Couto & Sanromán, 2005; Hansen *et al.*, 2015). Vários fatores influenciam a produção dessas enzimas, destacando-se o microrganismo, o meio de cultivo e o controle adequado de parâmetros físico-químicos durante o processo (Dillon, 2004). A formulação de um meio efetivo, de baixo custo e que permita a manutenção e o crescimento do microrganismo é de extrema importância (Smits *et al.*, 1996).

Existem dois tipos de processos para a produção de enzimas: cultivo submerso (CS) e cultivo em estado sólido (CES) (Schmidell & Facciotti, 2001). A escolha do tipo de cultivo depende da adaptação fisiológica do organismo (Silva *et al.*, 2005).

Os processos submersos são amplamente conhecidos, estudados, aplicados e apresentam variáveis na forma de condução, sendo utilizados em regimes de operação descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo e contínuo (Schmidell & Facciotti, 2001). O processo de fermentação submersa possui relativa facilidade de aplicação em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração e concentração de oxigênio dissolvido no meio, principalmente se monitorados por sensores adequados (Couto & Sanromán, 2006).

Denomina-se cultivo em estado sólido (CES) qualquer processo fermentativo realizado em material insolúvel, que atua tanto como suporte físico como fonte de nutrientes para o microrganismo, sendo que o meio de cultura não contém água livre, apenas umidade suficiente para o crescimento do microrganismo (Chahal, 1985; Pandey, 1992; Pandey, 2003; Singhania *et al.*, 2009). O crescimento do microrganismo e a formação de produtos ocorrem na superfície e/ou dentro do sólido (Considine *et al.*, 1987; Singhania *et al.*, 2009). O crescimento do fungo se dá na forma micelial, havendo a formação de hifas (Biesebeke *et al.*, 2002). O CES parece ser ideal quando o substrato a ser utilizado é insolúvel e quando o microrganismo empregado é um fungo filamentosos (Rao *et al.*, 1983).

2.4.1 Celulases

As celulases constituem um complexo de enzimas encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias, e estão presentes também no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes. Nos ruminantes e em alguns insetos xilófagos, a degradação da celulose é consequência da atividade enzimática proveniente da secreção de fungos e bactérias simbiotes (Kubicek *et al.*, 1993; Rolle, 1998).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia de acordo com a celulase avaliada (Henrissat, 1991). Esse complexo enzimático é capaz de hidrolisar a celulose em moléculas de glicose (Kubicek *et al.*, 1993; Rolle, 1998). Devido à sua ação hidrolítica, as celulases atacam diretamente a estrutura da celulose, causando perda de massa e diminuindo seu grau de polimerização. As celulases são proteínas sensíveis a mudanças de pH e de temperatura. Especialmente em pH alcalino em temperaturas acima de 80 °C, elas desnaturam e perdem sua atividade catalítica (Andreaus, 2001).

O complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endo- β -1,4-glicanases, as celobiohidrolases (exoglicanases) e as β -glicosidases, que não são consideradas celulases legítimas (Medve, 1997; Andreaus & Cavaco-Paulo, 2008). As celulases mais estudadas e usadas são produzidas por fungos e são celulases extracelulares, obtidas mais facilmente (Andreaus, 2001).

Entre os complexos celulolíticos de bactérias e fungos já estudados, o mais conhecido é o de *Trichoderma reesei*. Martinez *et al.* (2008) verificaram que o genoma de *T. reesei* tem apenas sete genes que codificam celulases, apresentando duas celobiohidrolases e oito endoglicanases. Os métodos de separação de moléculas e os estudos sobre a ação dos componentes das celulases têm mostrado que esse complexo enzimático é constituído por um conjunto de três enzimas hidrolíticas (Figura 5): as endo- β -1,4-glicanases [EG I (1), EG II (2), EG III(1), EG IV (3) e EG V (1); EC 3.2.1.4], que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose, nas partes amorfas do polímero, diminuindo o grau de polimerização da celulose; as exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases [CBH I (1) e CBH II (1); EC 3.2.1.91], que agem nas extremidades redutoras (CBH I) e as que hidrolisam terminais não redutores (CBH II) de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando oligossacarídeos e celobiose, podendo atuar em celulose cristalina; e as β -1,4-glicosidases (BG I e BG II; EC

3.2.1.21), que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose a glicose (Bisaria & Ghose, 1981; Messner & Kubicek, 1991; Zeilinger *et al.*, 2000; Andreaus, 2001; Martinez *et al.*, 2008).

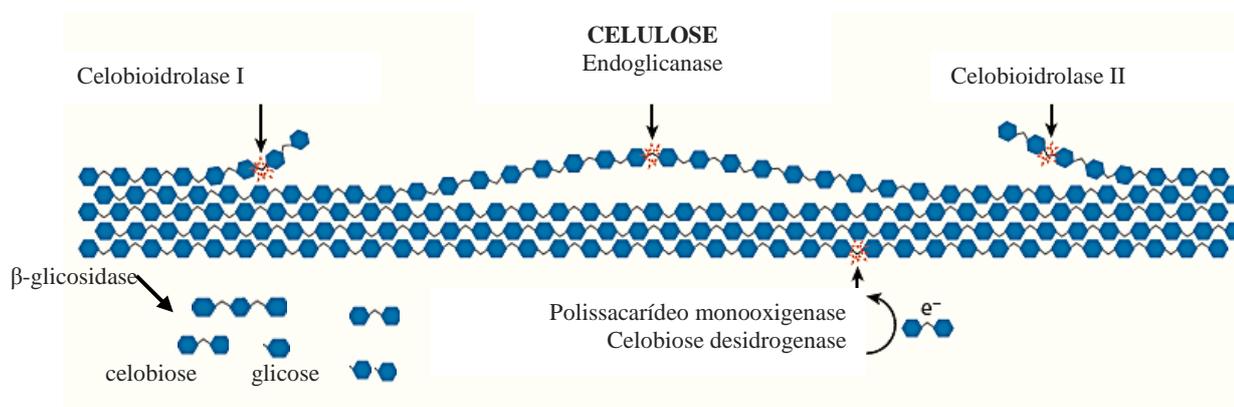


Figura 5. Representação da atuação das celulases e de enzimas acessórias

(adaptado de Glass *et al.*, 2013).

Esses três componentes atuam de forma sinérgica na hidrólise da celulose (Dillon, 2004; Singhania, 2010). As celulases são induzidas, havendo a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose (Kubicek *et al.*, 1993).

O complexo enzimático produzido por *T. reesei* é conhecido por possuir baixa atividade β-glicosidásica e uma grande quantidade de exoglucanases, que correspondem a cerca de 80% do total de proteínas secretadas por este fungo (Teeri, 1997).

De acordo com Martins *et al.* (2005), o complexo enzimático de *P. echinulatum* apresenta uma quantidade de β-glicosidases superior ao de *T. reesei*. Esse fato demonstra a potencialidade dessa espécie para uma sacarificação mais completa da celulose, desde que, com a diminuição da concentração de celobiose no meio reacional, ocorre uma diminuição da inibição enzimática e um aumento da eficiência da hidrólise enzimática (Sun & Cheng, 2002). Gusakov (2011) e Gusakov & Sinitsyn (2012) apontam que o complexo enzimático de diferentes espécies de *Penicillium* promove uma maior conversão da celulose e maiores

rendimentos em glicose do que o complexo enzimático de *T. reesei*, especialmente pelo fato de ter uma maior atividade de β -glicosidasases.

As principais aplicações das celulasas destinam-se às áreas têxtil e de detergentes. No setor têxtil, as celulasas são utilizadas para desenvolver o aspecto de usado e desbotado (bioestonagem) em tecidos de algodão tingidos com índigo e, também, para a retirada das regiões de desorganização de microfibrilas de celulose (“peeling”) e amaciamento dos tecidos. Como componentes de detergentes, essas enzimas vêm sendo utilizadas desde o início dos anos 90, contribuindo para o branqueamento de tecidos de algodão e para a remoção de saliências na superfície dos tecidos. As celulasas, ainda, podem ser utilizadas na preparação do malte de cerveja e em processos de extração de sucos, óleos vegetais, pigmentos, alcaloides e amido. Na área de alimentação animal, são comercializadas como componentes de indutores de silagem e, em ração para aves e suínos, com a finalidade de aumentar a digestibilidade de alimentos ricos em fibras de celulose (Dillon, 2004; Andreaus *et al.*, 2014).

Entretanto, o maior uso para as celulasas, ainda que potencial, está destinado à produção de xaropes de glicose provenientes da hidrólise de substratos lignocelulósicos. Todavia, alguns problemas ainda necessitam ser resolvidos com relação à produção de hidrolisados de lignocelulósicos para tornar a tecnologia viável, sendo o principal a alta relação enzima/substrato que é necessária para a hidrólise da celulose (Mandels, 1982). A conversão dos componentes celulósicos da biomassa em açúcares fermentescíveis é, ainda, o principal gargalo tecnológico e econômico na produção de combustíveis ou outros produtos com valor agregado. Têm-se, ainda, outros fatores como o custo das enzimas, dos açúcares produzidos e da produção do etanol (Viikari *et al.*, 2012).

2.4.2 Xilanases

As xilanases são produzidas por diversos organismos, tais como bactérias, algas, fungos, protozoários, gastrópodes e artrópodes. Fungos filamentosos produtores de xilanases, são

particularmente interessantes, uma vez que secretam maiores quantidades de enzima em relação a bactérias e leveduras. Ainda, as xilanases fúngicas são produzidas associadas às celulases (Dekker & Richards, 1976; Ball & McCarthy, 1989; Gilbert & Hazlewood, 1993; Sunna & Antranikian, 1997; Liu *et al.*, 1999; Beg *et al.*, 2001).

A biodegradação de xilana requer a ação de diversas enzimas (Figura 6): endoxilanases (E.C. 3.2.1.8), que hidrolisam aleatoriamente a cadeia principal de xilana, produzindo uma mistura de xilooligosacarídeos; xilosidases (E.C. 3.2.1.37), que liberam xilose de oligossacarídeos curtos; α -L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), que removem L-arabinofuranose das cadeias laterais; α -D-glicuronidases (E.C. 3.2.1.139), que hidrolisam os resíduos de metil glicuronato; acetil xilana esterases (E.C. 3.1.1.72), que hidrolisam grupos acetato da cadeia principal; feruloil/cumaril esterases (E.C. 3.1.1.73), que hidrolisam os respectivos ácidos aromáticos ligados aos resíduos de arabinofuranoside (Chávez *et al.*, 2006).

As xilanases (1,4- β -D-xilana xilanoidrolase, E.C. 3.2.1.8) constituem um grupo de enzimas com aplicações industriais, particularmente na indústria de alimentos para animais, mas também são utilizadas nas indústrias de polpa e papel (biobranqueamento) e processamento de alimentos (Xiong *et al.*, 2005). As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes que não foram degradados ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por fibras. Isso resulta em diminuição da viscosidade, possibilitando uma utilização mais eficiente do alimento (Xiong *et al.*, 2005). Essas enzimas também são utilizadas para melhorar a eficiência na produção de silagens (Kulkarni *et al.*, 1999). Houve um crescente interesse industrial pelas hemicelulases e por fungos produtores de xilanases extracelulares nas últimas décadas, principalmente nas indústrias química e farmacêutica (Sun *et al.*, 2004). Berlin *et al.* (2005) verificaram que as hemicelulases também atuam auxiliando as celulases na conversão de biomassa.

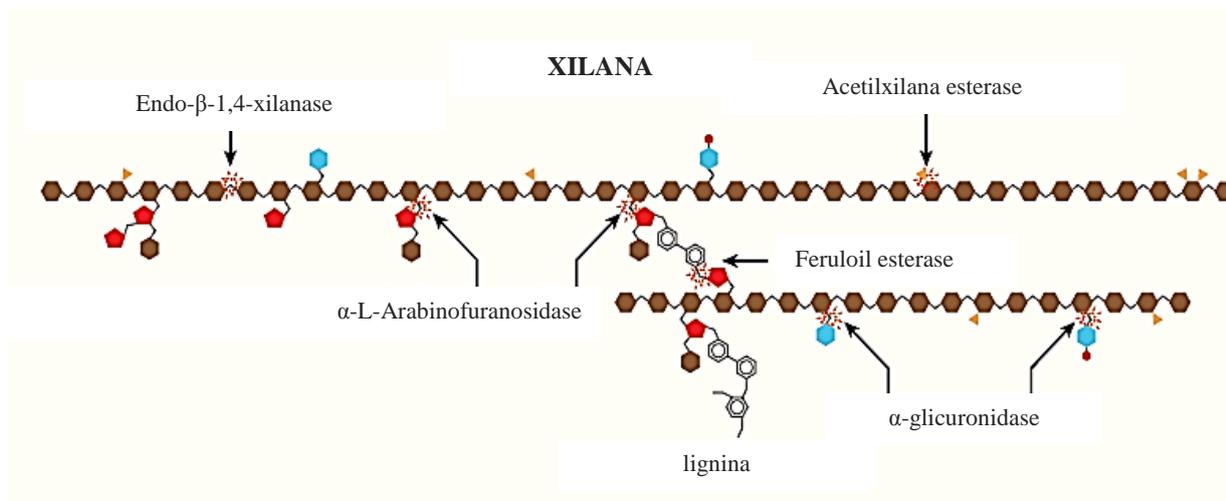


Figura 6. Representação da atuação das enzimas hemicelulases sobre a matriz hemicelulósica (adaptado de Glass *et al.*, 2013).

2.4.3 Oxidases

Estudos sugerem um novo paradigma para a degradação enzimática de celulose, onde a ação das enzimas hidrolíticas clássicas é facilitada pela ação de monooxigenases - CBM33 e GH61, que são oxidases Cu-dependentes (Horn *et al.*, 2012). Essas enzimas podem acelerar a conversão enzimática de biomassa, reduzindo, assim, a carga de enzima e o tempo de processamento. Além disso, elas podem agir sobre materiais mais compactos e inacessíveis, podendo afetar positivamente os custos da etapa de sacarificação enzimática, mas, também, otimizar o processo de pré-tratamento e o desenho de processos em geral (Horn *et al.*, 2012).

Celobiose-desidrogenase (CDH) é outra enzima extracelular que participa do complexo celulolítico de alguns fungos com atividade oxidativa que, em combinação com as monooxigenases, facilitam a degradação de celulose (Henriksson *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2017).

2.5 Conversão da biomassa lignocelulósica em etanol

O etanol é um combustível renovável que contribui para a redução dos impactos ambientais gerados pela utilização de combustíveis fósseis (Cardona & Sánchez, 2007). Esse combustível pode ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos, desde que estes sofram hidrólise ácida ou enzimática. Em ambos os processos, realizam-se as mesmas etapas principais: hidrólise da celulose e da hemicelulose em monômeros de açúcares, fermentação, recuperação e concentração do produto por destilação (Galbe & Zacchi, 2002).

A hidrólise ácida pode ser realizada com vários tipos de ácidos, incluindo sulfúrico, clorídrico, fosfórico, nítrico e fórmico, que podem ser concentrados ou diluídos (Galbe & Zacchi, 2002). Já a hidrólise enzimática apresenta potencial de rendimentos mais elevados e redução da formação de compostos tóxicos com relação à hidrólise ácida. No entanto, se as enzimas celulolíticas são adicionadas à celulose nativa, a conversão de celulose em açúcar pode ser extremamente lenta, já que a celulose está protegida pela matriz de hemicelulose e lignina (Galbe & Zacchi, 2002).

Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos nas frações celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) podem ser utilizados para a produção de etanol por via fermentativa. Entretanto, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes na forma de monômeros com elevado grau de pureza (Sun & Cheng, 2002).

A obtenção de elevadas concentrações de açúcares monoméricos pelo processo de obtenção de etanol de segunda geração (a partir de lignocelulósicos) é mais difícil do que a partir do processo de primeira geração (a partir de caldo de cana-de-açúcar, beterraba ou amido). Portanto, embora o custo da biomassa lignocelulósica seja inferior ao dos açúcares da cana, beterraba ou amido, o custo de obtenção de açúcares a partir de tais materiais para a

fermentação em etanol tem sido demasiado elevado para atrair o interesse industrial. Assim, é crucial resolver os problemas envolvidos na conversão de lignocelulósicos em açúcar e em etanol. Entretanto, a heterogeneidade de matérias-primas e a influência de diferentes condições no processo de produção de enzimas torna complexo o processo de transformação da biomassa em etanol (Galbe & Zacchi, 2002).

Extensa investigação sobre a conversão de materiais lignocelulósicos a etanol foi realizada nas duas últimas décadas (Azzam, 1989; Cadoche & López, 1989; Reshamwala *et al.*, 1995; Bjerre *et al.*, 1996; Duff & Murray, 1996; Wright, 1998; Sassner *et al.*, 2006; Laopaiboon *et al.*, 2009; Wanderley *et al.*, 2013; Kelbert *et al.*, 2015; Kotarska *et al.*, 2015; Mupondwa *et al.*, 2017). Três tipos de energia podem ser produzidos a partir de resíduos lignocelulósicos: combustíveis líquidos, tais como o etanol ou o óleo de pirólise, combustíveis gasosos, como o biogás (metano) e energia elétrica (Figura 7) (Menon & Rao, 2012).

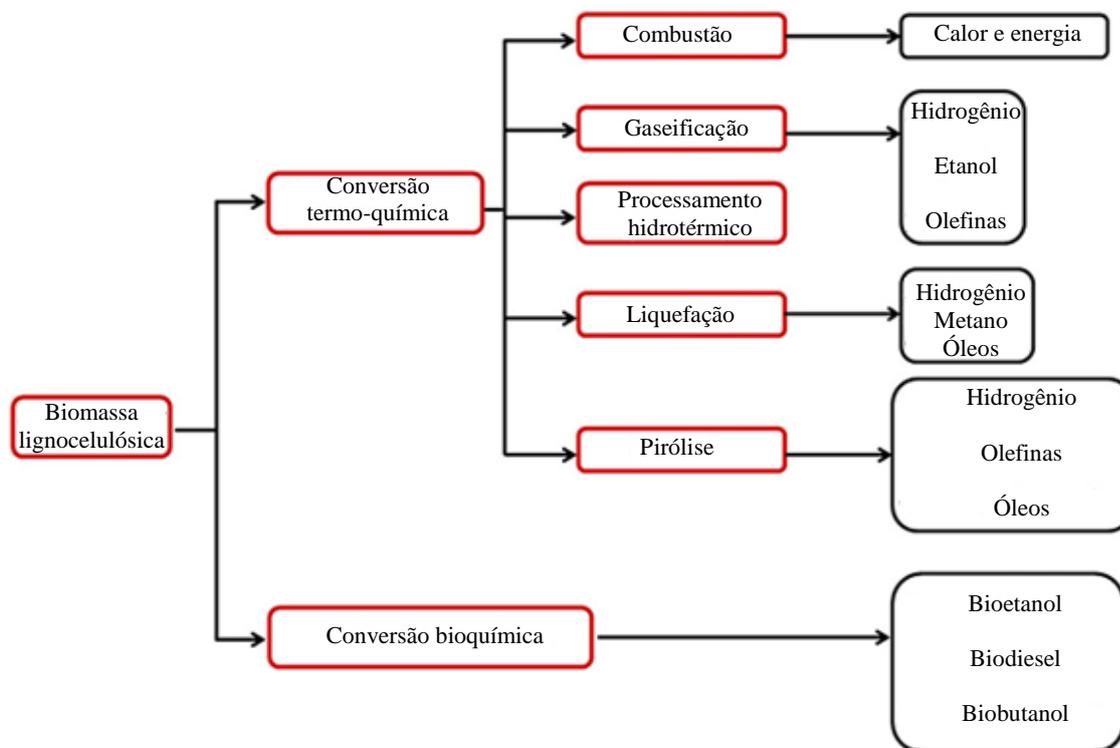


Figura 7. Processamento bioquímico e termo-químico da biomassa lignocelulósica
(adaptado de Menon & Rao, 2012).

O processo de conversão de biomassa em etanol envolve algumas etapas: a escolha de uma biomassa adequada, um pré-tratamento eficaz, produção de enzimas hidrolíticas - celulases e hemicelulases juntamente com as enzimas acessórias, hidrólise da biomassa e a fermentação dos açúcares - hexoses e pentoses (Menon & Rao, 2012).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma das principais etapas na produção de biocombustíveis, porém, a composição da biomassa e a interação entre as suas diferentes frações fazem com que a estrutura do material lignocelulósico seja muito complexa e resistente à desconstrução (Morais *et al.*, 2015). Os processos de pré-tratamento geralmente visam aumentar a área de superfície interna da biomassa, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade, separando as ligações estruturais entre a lignina e carboidratos e modificando a estrutura da lignina. Vários métodos de pré-tratamento têm sido utilizados, incluindo metodologias químicas e físicas (Kim *et al.*, 2013).

Geralmente, um processo de pré-tratamento é necessário para remover os componentes da lignina e promover uma maior digestibilidade enzimática dos componentes celulósicos, porém, o custo desses processos é muitas vezes superior ao dos biocombustíveis (Alvira *et al.*, 2010). Por outro lado, para aumentar o rendimento de etanol a partir de materiais lignocelulósicos sem a utilização de um pré-tratamento, a fermentação de pentoses é um pré-requisito (Saha, 2003).

Na produção de etanol de segunda geração devem ser considerados os valores dos diferentes produtos derivados da biomassa (etanol e outros biocombustíveis, bioeletricidade, entre outros). Além disso, o custo das enzimas a serem utilizadas em larga escala, tais como previsto para os biocombustíveis, ainda é desconhecido. A geração integrada de etanol de primeira e segunda geração diminuiria o custo de produção do etanol, já que a atual tecnologia de hidrólise apresenta rendimentos relativamente reduzidos, uso de um baixo teor de sólidos e não fermentação de pentoses (Dias *et al.*, 2011).

2.6 Métodos de pré-tratamento

O principal desafio na conversão de biomassa em etanol é a etapa de pré-tratamento, que deve satisfazer os seguintes requisitos: (1) melhorar a capacidade de liberação de açúcares, (2) evitar a degradação ou a perda de carboidratos, (3) evitar a formação de subprodutos inibitórios para a hidrólise e a fermentação e (4) ser rentável (Sun & Cheng, 2002). O pré-tratamento deve amenizar a interação entre os principais componentes da biomassa e os tornar susceptíveis à conversão em (bio) combustíveis e/ou em insumos para a indústria química (Ramos, 2003).

O pré-tratamento da matéria-prima (Figura 8) é necessário para expor a celulose ou modificar os poros do material, permitindo que as enzimas penetrem nas fibras e hidrolisem a celulose em açúcares monoméricos (Galbe & Zacchi, 2002; Mosier *et al.*, 2005).

O objetivo da realização do pré-tratamento é quebrar o invólucro de lignina e desfazer a estrutura cristalina da celulose (Mosier *et al.*, 2005), tornando-a mais susceptível ao ataque enzimático (Halliwell, 1977). Porém, o pré-tratamento é considerado uma das etapas mais onerosas no processo de conversão da biomassa lignocelulósica (Mosier *et al.*, 2005).

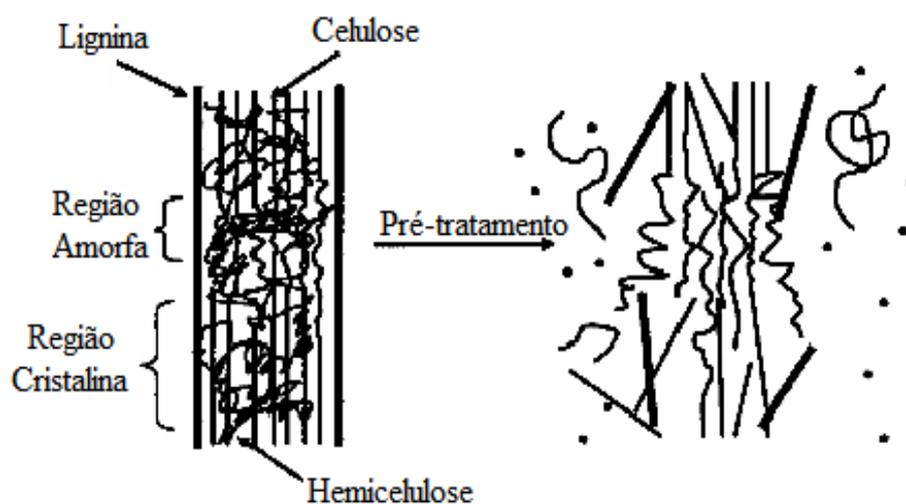


Figura 8. Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico
(adaptado de Mosier *et al.*, 2005).

A adoção de tecnologias de pré-tratamentos baseadas nas propriedades de cada matéria-prima lignocelulósica é necessária, uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes propriedades físico-químicas. Além disso, a escolha do pré-tratamento tem um grande impacto nas etapas subsequentes, em termos de digestibilidade da celulose, geração de compostos inibitórios para a etapa de fermentação, demanda de energia e tratamento de águas residuais (Galbe & Zacchi, 2007).

Existem diversos tipos de pré-tratamentos, como físicos, químicos e biológicos. Exemplos típicos de pré-tratamentos químicos incluem tratamentos com ácidos diluídos (Galbe & Zacchi, 2002, Mathew *et al.*, 2011b), álcalis (Kansoh *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2010; Mathew *et al.*, 2011a), solventes orgânicos (Varshney & Patel, 1988), amônia (Kurakake *et al.*, 2001), além de anidrido sulfuroso e dióxido de carbono (Hamelinck *et al.*, 2003). Esses métodos têm como vantagem o alto rendimento em glicose, porém, como desvantagens, o custo elevado e necessidade de recuperação dos ácidos, problemas de corrosão, além da formação de inibidores (Alvira *et al.*, 2010). Os métodos biológicos compreendem técnicas em que se utilizam fungos da podridão branca, que são microrganismos capazes de degradar a lignina (Lee, 1997; Graf & Koehler, 2000). Fungos da podridão marrom atacam principalmente a celulose, enquanto fungos da podridão branca e macia atacam tanto celulose como lignina (Fan *et al.*, 1987; Sánchez, 2009). Esses métodos são mais lentos e têm um baixo rendimento de hidrólise (Alvira *et al.*, 2010).

2.6.1 Pré-tratamentos físicos

Os pré-tratamentos físicos são baseados na redução do tamanho da partícula por ação mecânica (Sousa *et al.*, 2009). Um dos processos comumente utilizados é a moagem, que causa redução do tamanho da partícula aumentando o desempenho da enzima pelo aumento da área superficial e, em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, além de serem mínimos os impactos ambientais causados por esse tipo de pré-

tratamento (Fan *et al.*, 1981, Sun & Cheng, 2002; Sousa *et al.*, 2009). Nesse tipo de pré-tratamento, nenhum inibidor, tal como furfural ou hidroximetilfurfural, é produzido (Silva *et al.*, 2010). O tamanho dos materiais é geralmente de 10-30 mm depois de lascar e de 0,2-2 mm após a moagem ou trituração (Sun & Cheng, 2002). Fan *et al.* (1980) mostraram que o índice de cristalinidade da Solka Floc[®] diminuiu de 74% para 5% utilizando moinho de bolas. A exigência de energia mecânica vai depender do tamanho final da partícula e das características dos resíduos de biomassa (Sun & Cheng, 2002). Os consumos específicos de energia para moer palha de trigo em moinho de martelo com tamanhos de tela de 0,8 e 3,2 mm foram de 51,6 e 11,4 kW/h/t, respectivamente (Talebnia *et al.*, 2010). Na Figura 9, pode-se verificar a fragmentação e dissociação por ação mecânica da biomassa lignocelulósica (Barakat *et al.*, 2015).

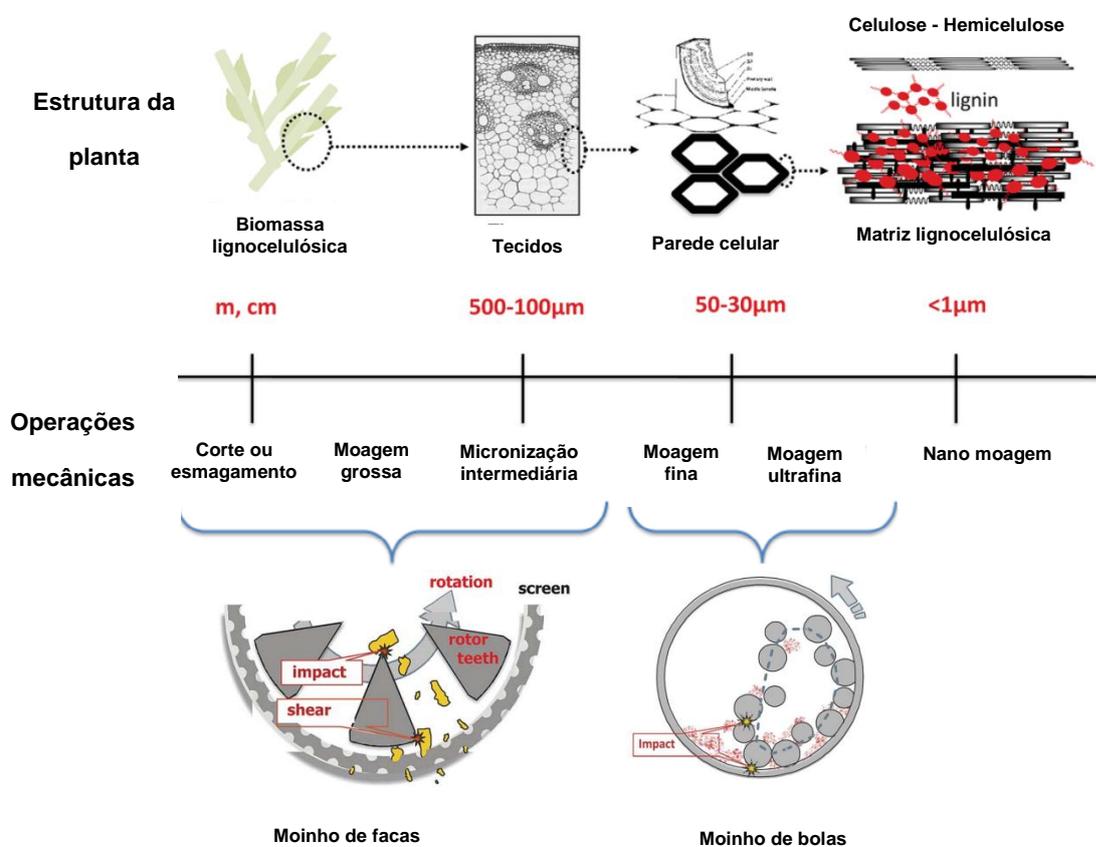


Figura 9. Fragmentação mecânica e dissociação de biomassa lignocelulósica em diferentes escalas (adaptado de Barakat *et al.*, 2015).

A heterogeneidade estrutural, a complexidade dos constituintes da parede celular e a associação dos tecidos são alguns dos motivos do aumento da exigência energética. Já foi relatado que quanto maior o teor de umidade, maior o requerimento energético, já que com o aumento no teor de umidade há um aumento da resistência ao corte do material (Barakat *et al.*, 2013; Barakat *et al.*, 2015). Barakat *et al.* (2013) também observaram que quanto maior a cristalinidade da celulose e o teor de lignina, menor é o requerimento energético. A porção cristalina da celulose e a lignina tem uma estrutura rígida, sendo, portanto, mais fáceis de quebrar durante a ação mecânica.

Outros tipos de pré-tratamentos, como, por exemplo, pré-tratamentos químicos, têm sido extensivamente estudados. Porém, a utilização de ácidos/álcalis podem danificar equipamentos e um passo de neutralização posterior é necessário para o tratamento dos efluentes. Além disso, a formação de inibidores das etapas de sacarificação e fermentação é inevitável quando pré-tratamentos químicos são empregados (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Para Ramos *et al.* (2000), alguns aspectos importantes sobre a viabilidade econômica dos pré-tratamentos ainda persistem: (1) o elevado custo e a baixa atividade específica das enzimas necessárias à sacarificação da celulose, ainda indispensáveis para acelerar a produção de açúcares fermentescíveis a partir do substrato, (2) a perspectiva de aumento do custo da fonte renovável, motivada pelo eventual aumento da demanda e pelos problemas associados ao transporte destes materiais, geralmente bastante volumosos, (3) a inexistência de um modelo biológico que permita a fermentação simultânea e em alto rendimento dos açúcares gerados pela sacarificação química e/ou enzimática da biomassa (pentoses, hexoses e oligossacarídeos) e (4) a falta de legislação no setor, particularmente no que se refere à questão ambiental.

2.7 Reatores para hidrólise de biomassa

As plantas industriais atuais ainda apresentam entraves técnicos e econômicos na conversão de biomassa em etanol. Nesse sentido, há a necessidade de desenvolvimento de

novas tecnologias. Na literatura científica, encontram-se alguns documentos que descrevem reatores.

O documento de patente US 5733758A versa sobre um aparelho para a hidrólise enzimática e a fermentação de material lignocelulósico pré-tratado, sob a forma de um biorreator de torre segmentado, contendo misturadores para homogeneização do material e aquecimento. Neste equipamento, a digestão do material ocorre devido à agitação intermitente existente nas três zonas de agitação compreendidas pelo biorreator. O equipamento apresentado no documento não compreende totalmente uma solução para a digestão da biomassa, sendo necessário que o material seja previamente tratado para então ser enzimaticamente hidrolisado no equipamento (Nguyen, 1998).

O documento EP 1824985 A1 descreve um reator de decantação com fluxo ascendente para hidrólise enzimática de celulose pré-tratada e um processo utilizando o referido reator. (Foody *et al.*, 2005). O documento PI 0500534-5 apresenta um aperfeiçoamento da produção de açúcares por hidrólise ácida de materiais. O documento em questão trata também de um vaso de digestão e um reator de hidrólise compreendendo segregação entre a etapa de digestão (ou pré-tratamento físico) com a hidrólise enzimática, em que a digestão ocorre por intermédio de um solvente que consegue extrair a lignina da biomassa. Tal documento não apresenta uma solução para a redução das etapas processuais e pelo fato de não apresentar uma alternativa ao uso do solvente na etapa de digestão da biomassa (Bulla *et al.*, 2005).

O documento PI 0505212-2 versa sobre a hidrólise ácida de material lignocelulósico em reator de hidrólise para formação de açúcares e separação da lignina. O documento não apresenta uma solução para o pré-tratamento da biomassa antes da etapa de hidrólise, ainda pelo fato de ser restrito à hidrólise ácida e, por fim, por não apresentar uma solução na redução das etapas processuais (Hilst, 2005).

Liguori *et al.* (2016), em artigo de revisão, descrevem diversos biorreatores para a conversão de lignocelulósicos. Como exemplo, é feita uma comparação entre um reator rotativo horizontal (HRR) e um reator de tanque com agitação vertical (VSTR), em que a mistura do material foi realizada por uma lâmina. Observou-se uma redução mais rápida da viscosidade em HRR, com uma maior degradação do material. Ainda, é relatada a influência do sistema de ultrassom de fluxo contínuo sobre o rendimento em açúcares e sobre o tamanho de partícula, verificando-se um aumento de 2-3 vezes de rendimento em açúcares nas amostras sonicadas. Os autores descrevem que reatores do tipo tambor rotativo representam uma estratégia interessante para melhorar a homogeneização da biomassa lignocelulósica pré-tratada em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e concluem que altas cargas de substrato apresentam vantagens econômicas e operativas, como a diminuição da perda de açúcares e da geração de resíduos, devido à maior concentração do produto. No entanto, novos desenvolvimentos na configuração de biorreatores combinados com novos sistemas eficientes de agitação e condições operacionais ótimas são necessários para aplicação em escala piloto ou industrial.

2.8 Hidrólise enzimática e fermentação

A hidrólise enzimática é conduzida em condições amenas de pH e de temperatura (pH de 4,5-5,0 e temperatura de 45-50 °C), além de ser reduzida a formação de compostos tóxicos, não apresentando problemas de corrosão, como observado nas hidrólises com ácidos e/ou com bases (Duff & Murray, 1996; Szengyel, 2000). Esses compostos tóxicos (inibidores) são subprodutos gerados durante a hidrólise e podem ser divididos em três grandes grupos de acordo com a sua origem: derivados do furano (furfural e hidroximetilfurfural), derivados da lignina (compostos fenólicos) e ácidos fracos (acético, fórmico e levulínico) (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). Esses compostos retardam a fermentação microbiana, afetando a taxa de

produção de etanol. Estudo desenvolvido por Martinez *et al.* (2001) mostrou que o tratamento do hidrolisado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ seria um método efetivo para a detoxificação.

A definição de condições ideais para a hidrólise enzimática não é precisa, pois essa pode se alterar dependendo de alguns fatores, como índice de matéria seca, pH, temperatura e tempo de hidrólise. De um modo geral, quanto menor o tamanho dos sólidos, maior será o rendimento da hidrólise. A concentração das celulases também tem um impacto elevado na conversão da celulose (Galbe & Zacchi, 2002).

Gregg & Saddler (1996) consideram a existência de uma relação inversa entre concentração do substrato e rendimento da hidrólise e que os mais altos rendimentos ocorrem nas primeiras 24 h. Altas concentrações de sólidos, por outro lado podem produzir altas concentrações de açúcares, diminuindo custos operacionais nas etapas de hidrólise e fermentação e reduzindo o consumo de energia durante a destilação (Zhang *et al.*, 2009).

Altas concentrações de enzimas geralmente são necessárias para atingir uma alta conversão de celulose e a reciclagem das enzimas é difícil, devido à adsorção das enzimas à lignocelulose residual (Eriksson *et al.*, 2002). Uma dosagem de celulases de 10 FPU/g de celulose é frequentemente utilizada em estudos de laboratório, porque fornece um perfil de hidrólise com elevados níveis de rendimento de glicose em um período de tempo que varia entre 48 h e 72 h com um custo reduzido. O aumento da quantidade de enzimas permite a diminuição do tempo necessário para a hidrólise, sugerindo-se adições acima de 25 FPU/g de substrato (Gregg & Saddler, 1996).

A fermentação de hidrolisados lignocelulósicos a etanol requer a presença de microrganismos que fermentem tanto hexoses quanto pentoses. Portanto, a utilização de microrganismos isolados e/ou consórcios de microrganismos que fermentem ambos os açúcares a etanol é bastante desejável (Margeot *et al.*, 2009).

A glicólise é a principal via metabólica envolvida na fermentação a etanol, na qual uma molécula de glicose é metabolizada e são produzidas duas moléculas de piruvato. Sob condições limitadas de oxigênio, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂. O fator de conversão teórico em etanol e CO₂ é de 0,511 g/g e 0,489 g/g, respectivamente, para uma base de massa de glicose metabolizada (Bai *et al.*, 2008).

Entre os microrganismos disponíveis para a fermentação de açúcares, pode-se citar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que metaboliza glicose, porém, não metaboliza xilose, o segundo açúcar mais abundante em hidrolisados lignocelulósicos (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Dentre as principais espécies descritas como fermentadoras de xilose estão: *Candida shehatae*, *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Scheffersomyces stipitis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Schizosaccharomyces pombe*, entre outras (Walker, 1998; Stambuck *et al.*, 2008).

A produção de etanol pode ser realizada pelos processos discutidos a seguir.

* Sacarificação e fermentação (SF) - a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas em reatores separados. A vantagem de realizar cada etapa separadamente é a possibilidade de melhor adequação das condições para a hidrólise enzimática a 45-50 °C e para a fermentação a 30 °C, enquanto o principal inconveniente da SF é a inibição causada sobre as enzimas pelos açúcares liberados durante a hidrólise (Galbe & Zacchi, 2002).

* Sacarificação e fermentação simultâneas (SFS) - a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas simultaneamente, no mesmo reator. Assim, a glicose produzida é consumida imediatamente pelo microrganismo fermentador, por exemplo, a levedura *S. cerevisiae*, evitando a inibição da β-glicosidase pelo produto final, a glicose. Todavia, o etanol produzido também pode agir como um inibidor na hidrólise, mas não tão fortemente quanto a celobiose ou a glicose (Galbe & Zacchi, 2002). De acordo com Holzberg *et al.* (1967), não houve inibição de crescimento abaixo de uma concentração de etanol de 26 g/L, porém, a inibição foi completa acima de 68,5 g/L. Os dados sugerem que o crescimento foi limitado, não

só pelo álcool, mas também algum outro fator, como deficiência nutricional. Outra vantagem de SFS em relação à SF é a integração do processo, obtida quando a hidrólise e a fermentação são executadas em um único reator. A principal desvantagem da SFS é a dificuldade em reciclar e reutilizar as leveduras, pois estes microrganismos se misturam com os resíduos da lignina (Szczo drak & Targonski, 1989; Wyman *et al.*, 1992; Grohmann, 1993; Krishna *et al.*, 1999; Krishna *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005). A temperatura ideal para o SFS é em torno de 38 °C, ficando entre as temperaturas ideais para a hidrólise (45-50 °C) e a fermentação (30 °C) (Philippidis, 1996). Leveduras termotolerantes e bactérias têm sido usadas no processo SFS para aumentar a temperatura próxima à temperatura ótima de hidrólise (Sun & Cheng, 2002). Os microrganismos comumente utilizados na SFS são o fungo *T. reesei* e a levedura *S. cerevisiae* (Philippidis, 1996).

* Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SCFS) - nesse processo, a fermentação de pentoses e hexoses ocorre no mesmo reator (Teixeira *et al.*, 2000). É considerada como uma alternativa viável para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos ricos em xilose; a sacarificação simultânea da celulose e da hemicelulose e a cofermentação de produtos finais, como glicose e xilose, é realizada por microrganismos geneticamente modificados (Menon & Rao, 2012).

* Bioprocesso consolidado (BPC) - esse processo oferece potencial para menor custo e maior eficiência, já que tanto a produção de enzimas quanto a de etanol são conduzidas em um único reator, sendo os processos realizados pelo mesmo microrganismo. Ocorre a produção de enzimas (celulases e hemicelulases), hidrólise da celulose e da hemicelulose a açúcares monoméricos e fermentação desses açúcares (hexoses e pentoses) (Taherzadeh & Karimi, 2007; Menon & Rao, 2012).

Para a etapa de fermentação, diversas linhagens de leveduras e/ou de bactérias estão disponíveis. Dentre essas, a levedura *S. cerevisiae*, tradicionalmente conhecida como eficiente

na produção de etanol a partir de glicose, é amplamente utilizada na produção de etanol nas indústrias, sendo que as linhagens mais usadas no Brasil são CAT-1, PE-2 e BG-1 (Costa *et al.*, 2014). Essa levedura tem como vantagens alta tolerância a etanol e a inibidores, tolera pH baixo, altos teores de açúcares e altas concentrações de etanol, o que diminui o risco de contaminação (Nevoigt, 2008), porém, não consegue metabolizar xilose; já *Scheffersomyces stipitis* tem se mostrado eficiente na produção de etanol a partir de xilose (Olsson & Hahn-Hägerdal 1996; Rudolf *et al.*, 2008). *Spathaspora arborariae*, utilizada isoladamente ou em cocultura com *S. cerevisiae*, também se mostrou interessante para a conversão de pentoses e hexoses em etanol (Cunha-Pereira *et al.*, 2011).

A incapacidade da levedura *S. cerevisiae* de fermentar xilose pode ser revertida através do uso de xilose isomerase exógena ou por transformação gênica (Walker, 1998).

Chandel *et al.* (2011) utilizaram cocultura de *S. stipitis* NCIM 3498 e uma linhagem termotolerante de *S. cerevisiae* VS3 e verificaram um aumento significativo na produção de etanol, utilizando como material lignocelulósico a espécie de cana-de-açúcar selvagem *Saccharum spontaneum*, uma alternativa menos onerosa para a produção de etanol de segunda geração.

Hickert *et al.* (2013) utilizaram *Candida shehatae*, *S. cerevisiae* ou uma combinação das duas linhagens para conversão de hidrolisados de casca de arroz a etanol. Nos experimentos realizados em frascos mantidos sob agitação, rendimentos de etanol ($Y_{P/S}$) de 0,42 g/g e 0,51 g/g foram alcançados com a utilização de coculturas em meio sintético e em hidrolisados de casca de arroz, respectivamente, sendo que glicose e xilose foram completamente esgotadas, enquanto culturas puras de *C. shehatae* alcançaram rendimentos de etanol de 0,40 g/g. Já em experimentos em biorreator, foram testadas condições de anaerobiose e de limitação de oxigênio, sendo que, quando se utilizaram as coculturas, rendimentos semelhantes foram produzidos em ambas as condições (0,50 g/g e 0,51 g/g, respectivamente) em meio sintético,

enquanto que em hidrolisados de casca de arroz, foram obtidos rendimentos de 0,48 g/g e 0,44 g/g, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados maiores detalhes sobre a metodologia empregada neste trabalho. As mesmas informações são repetidas, de forma mais resumida, nos artigos que compõem o capítulo de “Resultados e Discussão”.

3.1 Biomassa de capim-elefante

Foram utilizados cinco acessos de capim-elefante provenientes da Embrapa Gado de Leite, (Juiz de Fora/MG) - Cubano de Pinda, Taiwan A-146, Elefante Cachoeiro Itapemirim, CPAC e CAC-262, além de uma amostra de capim-elefante obtida na cidade de Nova Petrópolis/RS - CENP, sendo que essa já havia sido utilizada em trabalhos anteriores (Menegol *et al.*, 2014a; Menegol *et al.*, 2014b). O corte das plantas foi realizado após seis meses de plantio. Esse material foi inicialmente desidratado a 60 °C durante três dias e, após, triturado em moinho de facas, obtendo-se uma granulometria entre 200 e 4 *mesh*. A biomassa de capim-elefante foi armazenada em temperatura ambiente até a utilização.

3.2 Microrganismos

Para a produção de enzimas - celulasas e xilanasas – a serem utilizadas na hidrólise enzimática de capim-elefante (amostra CENP), foi utilizada a linhagem S1M29 obtida a partir da linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (microrganismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942). Essa linhagem foi obtida a partir de mutagênese empregando peróxido de hidrogênio e seleção dos mutantes em meio com 2-deoxiglicose (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Para a fermentação das hexoses, foi utilizada a linhagem CAT-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Humberto Gomes da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo – Piracicaba/SP, sendo essa uma das linhagens utilizadas nas usinas de São Paulo.

3.2.1 Crescimento e manutenção das linhagens

As culturas de *P. echinulatum* foram desenvolvidas em tubos de ensaio contendo ágar-celulose (C-ágar). Essa solução constituiu-se de 40 mL de suspensão de celulose intumescida, 10 mL de solução mineral, 0,1 g de proteose peptona, 2 g de ágar e água destilada para completar o volume final de 100 mL. Essas foram mantidas por sete dias a 28 °C até a formação de conídios e, então, estocadas a 4 °C (Dillon *et al.*, 2006). A levedura *S. cerevisiae* foi mantida em meio YEPD (*yeast extract peptone dextrose*) com a seguinte composição (por litro): 5 g de extrato de levedura, 10 g de peptona, 10 g de glicose e 20 g de ágar.

3.3 Produção de celulasas e xilanases em cultivos no estado sólido (CES)

Os meios de produção de celulasas foram constituídos de capim-elefante *in natura*, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, embebidos em solução mineral (SM 10X). A solução mineral foi baseada na formulação de Mandels & Reese (1957), composta por: KH_2PO_4 (2 g); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,3 g); ureia (0,3 g); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g); CaCl_2 (0,3 g); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,56 mg); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4 mg); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,002 g). Esses sais foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada, sendo a suspensão autoclavada e armazenada a 4 °C.

Os CES foram conduzidos em bandejas contendo 200 g de substrato (50% m/m de farelo de trigo, 25% m/m de capim-elefante *in natura* e 25% m/m de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*) embebido com 200 mL de solução mineral. Esses sistemas foram inicialmente autoclavados (1 atm por 1 h). Após, cada sistema foi inoculado com 1×10^6 conídios/g de massa

seca. Em seguida, foram mantidos em câmara com umidade relativa em torno de 90% e temperatura de 28-30 °C, durante quatro dias.

Para a extração enzimática, 600 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 em temperatura de 4 °C foram adicionados a cada sistema. Esses foram agitados a 200 rpm durante 30 min a 4 °C. Os sólidos foram removidos por filtração e os filtrados centrifugados a 3000 × g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado e liofilizado para testes posteriores de hidrólise enzimática.

3.4 Determinação das atividades enzimáticas

3.4.1 Atividade sobre papel filtro (FPA)

Para a dosagem de celulasas, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro (FPA), conforme Ghose (1987), de acordo com as modificações propostas por Camassola & Dillon (2012). Em placas de 96 poços com volume total de 2 mL, foram adicionados 50 µL da amostra ou diluição apropriada e 100 µL de tampão citrato 50 mmol/L pH 4,8. As placas foram colocadas em banho a 50 °C, durante 10 min, com a finalidade de elevar o meio contendo a enzima até sua temperatura ideal de hidrólise. Foram adicionados, em cada poço, 5 mg de papel-filtro *Whatman* nº1 em tiras de 1 cm x 0,6 cm, mantendo-os por 60 min em banho-maria a 50 °C. Em seguida, adicionaram-se 300 µL da solução do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e as placas foram colocadas em banho-maria a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em temperatura ambiente, 100 µL da amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços para leitura óptica com a adição de 200 µL de água e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de FPA presentes nas amostras foram determinadas através de curva padrão construída a partir de uma solução de glicose em concentrações de 0, 0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2 mg/mL, por meio de regressão linear.

Uma unidade de atividade de FPA foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol/L}$ de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959). A solução para dosagens de açúcares redutores foi descrita por Miller (1959), sendo composta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico (7,48 g/L), hidróxido de sódio (13,83 g/L), tartarato de sódio e potássio (216,02 g/L), fenol (5,36 g/L) e metabissulfito de sódio (5,85 g/L); esses reagentes foram dissolvidos em água destilada.

3.4.2 Endoglicanases

A determinação da atividade de endoglicanases, segundo Ghose (1987), com modificações, foi realizada empregando-se de 10 μL da amostra diluída (1:9) e 40 μL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 em cada poço da placa de 96 poços, com volume total de 2 mL. A placa foi colocada em banho a 50 °C por 10 min, a fim de elevar a temperatura do meio até a temperatura ideal de hidrólise dessa enzima. Em seguida, foram adicionados a cada poço 50 μL de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), previamente aquecida a 50 °C, mantendo-se as placas por 30 min em banho a 50 °C. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μL da solução do reagente DNS e a placa foi colocada a 100 °C por 5 min.

A leitura, em espectrofotômetro, e a determinação da atividade de endoglicanases foram realizadas tal como para FPA.

Uma unidade de atividade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol/L}$ de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.4.3 β -glicosidases

Para a determinação da atividade de β -glicosidases foi utilizado o substrato p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p NPG), empregando-se a metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma mistura reacional (100 μL) contendo 5 μL de água destilada, 5 μL de solução enzimática e 90 μL de p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (p NPG 4 mmol/L) foi incubada a 50 °C por 30

min, sendo interrompida com a adição de 200 μL de uma solução 10% (m/v) de Na_2CO_3 . A leitura das amostras foi estimada espectrofotometricamente por leitura da absorbância de ρNPG a 405 nm e a determinação da atividade foi realizada através de curva de calibração construída com soluções de p -nitrofenol (ρNP) com concentrações de 0; 0,04; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 e 2 mmol/L, por meio de regressão linear.

Uma unidade de atividade de β -glicosidase utilizando-se como substrato o ρNPG foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 $\mu\text{mol/L}$ de ρNPG por minuto.

3.4.4 Xilanases

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 10 μL de caldo enzimático juntamente com 50 μL de uma solução de xilana 1% (m/v) previamente aquecida a 50 °C. A placa foi mantida em banho a 50 °C por 5 min. A reação foi interrompida adicionando-se 300 μL de DNS e a placa foi mantida a 100°C por 5 min.

Após resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μL de amostra em placa de 96 poços e adicionados 200 μL de água destilada; a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 545 nm.

As concentrações de xilanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída com soluções de xilose 0,01 mol/L com concentrações de 0, 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L/mL}$, por meio de regressão linear.

Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol/L}$ de xilose por minuto.

3.5 Determinação da adsorção das celulasas e xilanases ao substrato

A fim de verificar a adsorção das celulasas e xilanases em substratos lignocelulósicos, foram realizadas hidrólises de diferentes substratos (capim-elefante, bagaço de cana-de-açúcar, Avicel[®] e papel filtro) em frascos Duran[®] de 50 mL, a 50 °C, por 1 h e 6 h, utilizando-se diferentes concentrações de substrato. Após a hidrólise, esse material foi filtrado em tecido de poliéster e centrifugado por 20 min a $9800 \times g$, sendo realizados géis de proteínas totais e zimogramas para detecção das atividades de endoglicanases, exoglicanases, xilanases e β -glicosidases. Um controle com enzima e tampão citrato, sem adição de substrato foi realizado.

3.5.1 SDS-PAGE das soluções enzimáticas

Para a determinação da massa molecular das celulasas, foi realizada eletroforese não redutora em gel de poliacrilamida (8,5 cm x 7,5 cm x 0,1 cm) contendo 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), com 1,5 cm de gel de concentração 12% (m/v) e 6,0 cm de gel para separação das proteínas 4% (m/v), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por aproximadamente 1 h.

O tampão da amostra para proteína nativa possuiu a seguinte composição: 2,5 mL de glicerol; 2,0 mL de solução SDS 10% (m/v); 0,2 mL de solução azul de bromofenol 0,5% (m/v), 1,25 mL de tampão Tris-HCl pH 6,8 e 3,55 mL de água destilada; foi acrescentado à amostra até o volume final de 25 μ L e, após, aplicado na canaleta do gel. Não foi adicionado 2-mercaptoetanol.

As amostras foram liofilizadas e, em seguida, solubilizadas em tampão amostra. Após, essas foram homogeneizadas em vórtex e aplicadas na canaleta do gel.

Como marcador de massa molecular, foi utilizado o marcador *Precision Plus Protein[™] Standards All Blue (Bio Rad)*. Para a corrida eletroforética, foi utilizada uma solução tampão

Tris-glicina pH 8,3, composto de 30,3 g de Tris base; 144 g de glicina e 10 g de SDS, sendo o volume completado para 1 L com água destilada (Laemmli, 1970).

A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical *Bio Rad Mini-Protean*[®] Tetra System. A revelação das bandas do gel foi realizada com a incubação do gel durante 30 min em uma solução de 0,2% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético. Após, o gel foi lavado com água destilada e imerso em uma solução de 50% (v/v) de etanol e 10% (v/v) de ácido acético por 30 min. Esse processo foi realizado sob agitação de 60 rpm e repetido até que bandas fossem visualizadas.

3.5.2 Zimogramas para celulases

A detecção de atividade de endoglicanases de amostras provenientes da hidrólise enzimática, em gel de poliacrilamida (8,5 cm x 7,5 cm x 0,1 cm) foi baseada em Sun *et al.* (2008). A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por aproximadamente 1 h.

O gel separador 12%T foi preparado segundo Laemmli (1970), adicionando-se solução de carboximetilcelulose 2% (m/v) a fim de obter a concentração final de 0,2% no gel.

Em microtubos de 2 mL foi realizada a preparação das amostras que, inicialmente, foram solubilizadas em tampão de amostra e, após, aplicadas na canaleta do gel. Após, foi realizada a corrida eletroforética. Para a remoção do SDS, o gel foi lavado durante 30 min em solução 25% (v/v) de isopropanol em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e, após, lavado por mais 10 min no mesmo tampão, sendo ambos os processos realizados sob agitação de 60 rpm e temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi incubado por 10 min a 40 °C em solução de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8. O gel foi corado com solução de 0,1% (m/v) de vermelho congo durante 30 min e revelado com solução de NaCl 1 mol/L. As bandas claras no fundo vermelho indicaram a degradação da carboximetilcelulose.

Para xilanases, foi empregada a mesma metodologia, porém, foi adicionada solução de xilana ao invés de carboximetilcelulose.

Para a detecção de atividade de β -glicosidases em gel de poliacrilamida, a metodologia foi baseada em Schwarz *et al.* (1987). Os géis de separação e de concentração foram preparados assim como para proteínas totais.

As amostras foram inicialmente liofilizadas, em seguida solubilizadas em tampão de amostra e, após, aplicadas na canaleta do gel. A corrida eletroforética ocorreu tal como para proteínas totais.

Para a remoção do SDS e renaturação das proteínas, o gel foi lavado durante 30 min em solução 25% (v/v) de isopropanol em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e, após, lavado por mais 10 minutos no mesmo tampão; o gel foi imerso em uma solução de esculina 0,2% (m/v) em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8, por 30 min, sendo os processos realizados sob agitação de 60 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi removido da solução. Para a revelação foi utilizada uma solução 1% (m/v) de FeCl_3 . Bandas escuras em um fundo claro são indicativas da atividade de β -glicosidase, sendo que os géis foram fotografados nos primeiros 15 min de reação.

A detecção de atividade de exoglicanases (celobiohidrolases) em gel de poliacrilamida foi baseada na metodologia de Schwarz *et al.* (1987). Os géis foram elaborados tal como para proteínas totais. As amostras foram liofilizadas e, após, solubilizadas em tampão da amostra. Em seguida, aplicadas na canaleta do gel. Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados por 30 min em solução de isopropanol 25% (v/v), seguido de incubação por 30 min em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 e, então, submersos em solução 1 mmol/L de MUC (4-metilumbeliferil β -D-celobiosídeo) em tampão citrato 50 mmol/L, pH 4,8. Após 30 min de incubação a 50 °C, a atividade de celobiohidrolases foi detectada por fluorescência com iluminação a 340 nm, consequência da liberação do grupo fluorescente.

Os géis foram fotodocumentados em *Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ Imaging System (Bio Rad)*.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As mudanças na estrutura física do capim-elefante durante a hidrólise enzimática foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. A análise foi realizada de acordo com a metodologia empregada no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCMAT) da Universidade de Caxias do Sul, baseada no processo chamado *magnetron-sputtering* a plasma, mais conhecido como deposição física a vapor de ouro (PVD - *Physical Vapour Deposition*), de acordo com Schneider *et al.* (2014).

As amostras de capim-elefante foram depositadas em *stubs* de alumínio e esses colocados em estufas a 60 °C para a retirada máxima de umidade das amostras. Em seguida, as amostras foram mantidas em câmara sob vácuo até atingir a pressão base de 5×10^{-12} mbar. Durante a diminuição de pressão, o gás da câmara e das superfícies foi removido e, pela baixa pressão, componentes voláteis e água remanescentes também foram retirados das amostras.

Após, injetou-se uma atmosfera rarefeita de argônio, alcançando pressão de trabalho de 1×10^{-1} mbar. A pressão parcial de argônio é a diferença entre a pressão de trabalho e a pressão de base.

A fonte de tensão e a corrente foram ligadas, com corrente de 20 mA e tensão de 350 V. A atmosfera de argônio ionizou-se dando início ao processo de PVD, que durou 2,5 min. Os átomos arrancados de um alvo de ouro são acelerados na direção da superfície da amostra, gerando camadas nanométricas, uniformes e condutivas de ouro metálico.

Preparadas as amostras, as mesmas foram observadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura, modelo *Shimadzu Supercan SSX-550*.

3.7 Composição da biomassa

3.7.1 Determinação da massa seca de materiais celulósicos

Foram colocadas em pesa filtro, previamente pesado, 300 mg de amostra. Este material

foi colocado em estufa a 105 °C por 2 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador, pesado e o peso seco foi calculado com relação à massa do material original.

3.7.2 Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos

As amostras de capim-elefante foram analisadas de acordo com metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL – TP – 510 – 42621), onde 500 mg de amostra foram acondicionados em cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinado em mufla a uma temperatura de 575 °C por 2 h. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expresso com relação à quantidade de amostra inicial.

3.7.3 Determinação de extraíveis

Inicialmente, as diferentes amostras de capim-elefante foram submetidas a um processo de extração em um aparelho Tecnal TE-044-8/50, utilizando como solvente etanol 95%, seguido por extração com água quente, segundo metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL – TP – 510 – 42619) para quantificação de extraíveis. Após a extração, o solvente foi removido por evaporação e o resíduo foi seco em frascos previamente tarados. Por diferença de massas, pode-se obter o percentual do extrato com relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

3.7.4 Determinação do conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina

A determinação da composição foi realizada de acordo com o método proposto pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL – TP – 510 – 42618) para a determinação de lignina. Uma quantidade conhecida de amostra seca foi tratada com ácido sulfúrico 72% (v/v) a 25 °C por um período de 1 h sob agitação constante. Após esse tempo, a mistura foi diluída

até uma concentração de 4% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave (1 atm) por 1 h para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Posteriormente, a mistura foi filtrada a vácuo em cadinho de Gooch com porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra. O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 100 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectrofotometria em ultravioleta.

Já a composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada no hidrolisado resultante. Alíquotas dos hidrolisados foram centrifugadas a $10000 \times g$, filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 μm e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC20AD, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 20A3, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 20A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-20A com rede de fotodiodos para espectrofotometria em ultravioleta, utilizando-se o software LC Solution. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H_2SO_4 5 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (celobiose, glicose, xilose e arabinose).

3.7.5 Determinação de nitrogênio total e proteínas

A análise de proteínas totais foi realizada pelo Laboratório de Análises e Pesquisas em Alimentos (LAPA), IB-UCS, de acordo com método Kjeldahl - AOAC INTERNATIONAL (2011).

Inicialmente, foi feita a digestão de 1 g de amostra com 12 mL de ácido sulfúrico e mistura catalítica (7 g de K_2SO_4 e 0,8 g de CuSO_4), onde ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio. Após, foi feita a destilação da amostra para liberação de

amônia, que foi fixada em solução ácida (ácido bórico 4% (m/v)) e titulada com uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L até atingir a cor violeta. Foi feito um branco com os reagentes e sem amostra.

Para obtenção dos resultados, foi utilizada a seguinte Equação:

$$\text{Equação 1: \% proteínas} = \frac{(V-V_b).M.f.F.0,0140067.100}{m}$$

onde:

V= volume de solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gasto na amostra em mL;

V_b= volume de solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L gasto na prova em branco;

M= molaridade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

f= fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L;

m= massa da amostra em gramas;

F= fator de conversão da relação nitrogênio/proteína (para vegetais=5,75).

3.8 Hidrólise enzimática de capim-elefante

Os cinco acessos de *P. purpureum*, pertencentes ao banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Leite), Juiz de Fora/MG e o capim-elefante de Nova Petrópolis (CENP) foram submetidos à hidrólise enzimática.

As hidrólises foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Adsul *et al.* (2005), com algumas modificações. As amostras de capim-elefante foram incubadas com caldo enzimático e tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mmol/L). Essa mistura foi mantida a 50 °C, que é a condição ótima para a atividade enzimática de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004), sob agitação de 150 rpm.

Foram utilizadas diferentes concentrações de substrato e diferentes concentrações de enzima. Amostras foram coletadas em diversos intervalos de tempo, para análises dos açúcares.

Foram determinadas as atividades do caldo enzimático que foi empregado nas hidrólises realizadas com enzimas de *P. echinulatum* e com as enzimas comerciais.

Os açúcares e o ácido acético foram analisados por HPLC, utilizando coluna Aminex HPX-87H (*Bio Rad*) a 60 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado - celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético.

A porcentagem de conversão em glicose obtida após hidrólise enzimática foi calculada conforme a Equação 2.

$$\text{Equação 2: Rendimento glicose (\%)} = \frac{0,9 ([\text{glicose}]/[\text{biomassa}])}{f} \times 100$$

onde: 0,9 é a correção anidro para a conversão de açúcares monoméricos em açúcares poliméricos e *f* é a fração de glucana na biomassa seca.

3.9 Fermentação alcoólica

A produção de etanol foi realizada pelo processo de sacarificação e fermentação (hidrólise enzimática e fermentação realizadas em reatores separados). Os experimentos foram realizados em tubos Falcon[®] de 15 mL contendo 13 mL do hidrolisado de capim-elefante obtido em hidrolisador rotativo. Foi empregada a linhagem CAT-1 de *S. cerevisiae* na concentração de 1x10⁸ células viáveis por mL de mosto por até 48 h. Foi feita suplementação para a obtenção de uma concentração final de 4 mg/mL de Prodex[®] e 1 mg/mL de (NH₄)₂SO₄, a 28 °C em regime estático.

Coletas foram realizadas para determinação de cinética de consumo dos açúcares e produção de etanol. As amostras foram filtradas em filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 µm para análise dos açúcares liberados e a concentração de etanol por HPLC, empregando

coluna Aminex HPX-87H por detector por índice de refração, a 55 °C, H₂SO₄ 5 mmol/L (fase móvel), fluxo de 0,6 mL/min.

O rendimento teórico em etanol foi definido como 0,511 g de etanol por g de glicose (2 mol de etanol por 1 mol de glicose). O rendimento teórico em etanol foi calculado de acordo com Pessani *et al.* (2011) (Equação 3).

$$\text{Equação 3: Rendimento glicose (\%)} = \frac{[\text{etanol}]}{0,511 \times f[\text{biomassa}] \times 1,11} \times 100$$

onde: 1,11 é o fator de conversão de açúcares poliméricos em açúcares monoméricos, 0,511 é o fator de conversão de glicose em etanol e f é a fração de glucana na biomassa seca.

3.10 Testes estatísticos

Os dados de fermentação foram analisados utilizando-se o software *PrismGraphPad* 5.0, para análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, para um $p < 0,05$. *Statistica* 8.0 foi utilizado para o planejamento experimental, usando ANOVA com $p < 0,05$ como limite de significância. O teste t - Student foi usado quando necessário.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram organizados em três partes, consistindo de um pedido de patente ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e dois artigos científicos, sendo que um deles já foi publicado.

1. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, processo de obtenção de açúcares fermentescíveis e uso dos mesmos. Daiane Menegol, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola. – Pedido de patente (BR 102015016795-4). 2015.

2. Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids. Daiane Menegol, Roselei Claudete Fontana, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola. Artigo publicado na revista *Bioresource Technology*. 2016 (Fator de impacto – 5,6).

3. Comparison of the enzymatic hydrolysis of different elephant grass accessions under optimized conditions in a rotating hydrolysis reactor followed by alcoholic fermentation. Daiane Menegol, Juarez Campolina Machado, Ricardo Augusto Diniz Cabral Ferreira, Francisco José da Silva Lédo, Roselei Claudete Fontana, Aldo José Pinheiro Dillon e Marli Camassola. Artigo a ser submetido a periódico.

14/07/2015 860150148929
09:48 NPWB



0000221504252327

Protocolo



BR 10 2015 016795 4

Número



Código QR



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Diretoria de Patentes
Sistema e-Patentes/Depósito

	Tipo de Documento:	Recibo de Peticionamento Eletrônico	DIRPA	Página:	1 / 2
	Título do Documento:	Recibo DIRPA-FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	Código: RECIBO	Versão:	01
			Modo:	Produção	

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial informa:

Este é um documento acusando o recebimento de sua petição conforme especificado abaixo:

Dados do INPI:

Número de processo: BR 10 2015 016795 4
 Número da GRU principal: 00.000.2.2.15.0425232.7 (serviço 200)
 Número do protocolo: 860150148929
 Data do protocolo: 14 de Julho de 2015, 09:48 (BRT)
 Número de referência do envio: 121185

Dados do requerente ou interessado:

Tipo de formulário enviado: DIRPA-FQ001 v.006
 Referência interna: Hidrolisador
 Primeiro requerente ou interessado: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
 CNPJ do primeiro requerente ou interessado: 88.648.761/0001-03
 Número de requerentes ou interessados: 1
 Título do pedido: REATOR ROTATIVO PARA HIDRÓLISE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS E USO DOS MESMOS



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA PATENTES	Tipo de Documento:	Formulário Eletrônico	DIRPA	Página: 1 / 3
	Título do Documento:		Código: FQ001	Versão: 6
Depósito de Pedido de Patente			Procedimento: Não Aplicável	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
1.2 CNPJ: 88.648.761/0001-03
1.3 Endereço Completo: R. Francisco Getúlio Vargas 1130, Bloco A, Sala 301, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
1.4 CEP: 95070-560
1.5 Telefone: +55(11)30878200
1.6 Fax: ---
1.7 E-mail: patents@remer.com.br

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

REATOR ROTATIVO PARA HIDRÓLISE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS E USO DOS MESMOS

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº: ---

5. Prioridade:

Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito	Data do depósito	Tipo
---	---	---	---

6. Inventor (72):

6.1 Nome: Marli Camassola
6.2 Qualificação: Bióloga
6.3 CPF: 890.834.400-44
6.4 Endereço Completo: Rua 20 de Setembro, 2223 - apto. 64, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
6.5 CEP: 95020-450
6.6 Telefone: +55(11)30878200
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: patents@remer.com.br

6.1 Nome: Daiane Menegol
6.2 Qualificação: Bióloga
6.3 CPF: 011.286.740-50
6.4 Endereço Completo: Rua Antonio Rigon, 147, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
6.5 CEP: 95098-060
6.6 Telefone: +55(11)30878200
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: patents@remer.com.br

6.1 Nome: Aldo José Pinheiro Dillon
6.2 Qualificação: Biólogo
6.3 CPF: 015.890.548-22
6.4 Endereço Completo: Estrada Municipal Olímpio Miotto, 262, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
6.5 CEP: 95060-000
6.6 Telefone: +55(11)30878200
6.7 Fax: ---
6.8 E-mail: patents@remer.com.br

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:

Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

Relatório descritivo de patente de invenção (Patente No. BR 102015016795-4) - reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, processo de obtenção de açúcares fermentescíveis e uso dos mesmos

Campo da invenção

A presente invenção descreve um reator rotativo para a hidrólise de biomassa lignocelulósica, um processo de obtenção de açúcares fermentescíveis e uso de material hidrolisado, obtido pelo referido processo, em processo de fermentação. A presente invenção se situa nos campos da bioquímica, engenharia bioquímica e engenharia química.

Antecedentes da invenção

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis vem cada vez mais ganhando espaço já que se apresentam menos poluentes com relação aos combustíveis fósseis. Além disso, os lignocelulósicos são uma importante fonte de energia e substrato para a liberação de açúcares para o consumo direto ou para a produção de produtos biotecnológicos, além de disponíveis e de baixo custo.

No Brasil, os esforços atuais para atender o aumento da demanda por biocombustíveis, em especial, o etanol, está focado basicamente na construção de novas usinas e no aumento da área para o cultivo da cana-de-açúcar.

Entretanto, as plantas industriais atuais, ainda apresentam entraves técnicos e econômicos na conversão de biomassa. Nesse sentido, há a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias e da utilização de diferentes materiais lignocelulósicos alternativos à cana-de-açúcar para suprir as necessidades, principalmente durante os períodos entressafra, gerando, conseqüentemente, um aumento na produção de etanol.

A produção de etanol, atualmente, ainda é realizada a partir de amido e açúcares, porém há uma discussão sobre a sua sustentabilidade. Nesse contexto, reforça-se que a produção de

etanol a partir de biomassa lignocelulósica apresenta-se como uma alternativa interessante, já que esses materiais não competem com as culturas alimentares e também são menos onerosos do que as matérias-primas agrícolas convencionais.

A partir de um processo de hidrólise, que pode ser ácida ou enzimática, ocorre o aproveitamento desses lignocelulósicos para a liberação de açúcares fermentescíveis. Na hidrólise enzimática, empregam-se enzimas – celulasas e xilanases – capazes de hidrolisar a celulose em açúcares que podem ser, posteriormente, fermentados a etanol ou outros produtos biotecnológicos, como o xilitol.

Um dos gargalos da produção de etanol e de outros produtos biotecnológicos a partir de biomassa lignocelulósica consiste em determinar o melhor processo para obtenção de açúcares e ser economicamente viável, desde a investigação de substratos adequados, enzimas hidrolíticas eficientes, processos de pré-tratamento menos onerosos e organismos que fermentem eficientemente tanto hexoses como pentoses em etanol.

Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

O documento US 5733758 versa sobre um aparelho para a hidrólise enzimática e a fermentação de material lignocelulósico pré-tratado, sob a forma de um biorreator de torre segmentado, contendo misturadores para homogeneização do material e aquecimento. No presente documento, a digestão do material ocorre devido à agitação intermitente, existente nas três zonas de agitação compreendidas pelo biorreator. O equipamento apresentado pelo referido documento não compreende totalmente uma solução para a digestão da biomassa, sendo necessário que a mesma seja previamente tratada para então ser utilizada no equipamento apresentado para uma hidrólise enzimática.

O documento EP 1824985 A1 versa sobre um reator de decantação com fluxo ascendente para hidrólise enzimática de celulose pré-tratada, e um processo utilizando o

referido reator. O equipamento apresentado pelo referido documento não compreende uma solução para a digestão da biomassa por meio de um tratamento físico, com o intuito em aumentar a atividade enzimática no processo de hidrólise.

O documento WO2009/005390A1 versa sobre um método de produção de etanol a partir de material lignocelulósico por intermédio de um processo “mecanoquímico (mecanoenzimático)”, sendo tal processo “mecanoenzimático” um tratamento físico (moagem por esferas) em conjunto com um tratamento bioquímico (complexo enzimático) que garante uma reatividade alta da hidrólise enzimática. Tal documento apresenta como desvantagem o fato de compreender etapas separadas para o tratamento físico das amostras de lignocelulósicos antes da etapa de hidrólise dos lignocelulósicos, resultando em maior complexidade e tempo ao processo.

O documento EP 1954798 B1 versa sobre um processo para a produção de produtos de fermentação, como o bioetanol, a hidrólise enzimática e fermentação de frações de resíduos, contendo mono e/ou polissacáridos, tendo um teor de matéria seca relativamente elevada. No referido documento, o processo compreende etapa de pré-tratamento físico com esferas de aço, aplicado simultaneamente com a etapa de hidrólise enzimática. Tal documento apresenta como desvantagem o fato da etapa de fragmentação apresentar baixa eficiência quando em conjunto com a etapa de hidrólise, chegando a demandar 98 h para o processo, enquanto que a presente invenção é realizada em 12 h.

O documento PI 0500534-5 versa sobre um o aperfeiçoamento da produção de açúcares por hidrólise ácida de materiais. O documento em questão trata também de um vaso de digestão e um reator de hidrólise compreendendo segregação entre a etapa de digestão (ou pré-tratamento físico) com a hidrólise enzimática, em que a digestão ocorre por intermédio de um solvente que consegue extrair a lignina da biomassa. Tal documento não apresenta uma solução

para a redução das etapas processuais, e pelo fato de não apresentar uma substituição ao uso do solvente na etapa de digestão da biomassa.

O documento PI 0505212-2 versa sobre a hidrólise ácida de material lignocelulósico em reator de hidrólise para formação de açúcares e separação da lignina. Tal documento não apresenta uma solução para o pré-tratamento da biomassa antes da etapa de hidrólise, ainda pelo fato de ser restrito à hidrólise ácida, e por fim, por não apresentar uma solução na redução das etapas processuais.

O documento PI 0801505-8 versa sobre um sistema de dois vasos para a hidrólise de cavacos de madeira com método de lavagem química apropriado. Contudo, tal documento não apresenta uma solução para a redução das etapas processuais em hidrólise, tampouco uma solução no que se refere ao pré-tratamento da biomassa, para otimização da hidrólise.

Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

A presente invenção tem por objetivo a apresentação de um novo reator rotativo para hidrólise de biomassa lignocelulósica, o qual reduz etapas processuais, bem como apresenta uma solução para o pré-tratamento da biomassa e, assim, melhorar a hidrólise da mesma.

Sumário da invenção

Dessa forma, a presente invenção vem resolver os problemas constantes no estado da técnica, no que se refere ao pré-tratamento físico de biomassa lignocelulósica aplicada em processos de hidrólise para a obtenção de açúcares fermentescíveis, sendo estes preferencialmente aplicados em processo de fermentação alcoólica para a produção de etanol. Ainda, a presente invenção apresenta processo de obtenção de açúcares fermentescíveis compreendendo número de etapas reduzidas quando comparado com o estado da técnica, otimizando, assim, o processo em questão.

Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um reator rotativo para a hidrólise de material lignocelulósico, compreendendo:

- pelo menos um meio de rotação;
- pelo menos um meio de controle de temperatura;
- pelo menos um meio digestor do dito material lignocelulósico;

em que a homogeneização do material lignocelulósico é realizada pelo movimento rotativo do referido reator rotativo.

Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de material lignocelulósico compreendendo etapa de pré-tratamento físico e etapa de hidrólise, sendo a referida etapa de hidrólise realizada simultaneamente com o pré-tratamento físico do material lignocelulósico.

Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso de produto hidrolisado em processo de fermentação sendo o produto hidrolisado obtido por processo de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de material lignocelulósico, conforme definido acima.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve descrição das figuras

Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as seguintes figuras:

A Figura 1A mostra o equipamento de hidrólise da presente invenção, sendo indicado: cilindro de aço inox (1), abertura frontal (2), abertura lateral (3) e a engrenagem (4).

A Figura 1B mostra o equipamento de hidrólise da presente invenção, conforme apresentado pela Figura 1A, sendo indicado: a tampa traseira (5), o eixo (6) e o retentor (7).

A Figura 1C mostra um equipamento de hidrólise da presente invenção em uma vista perspectiva, conforme apresentado pelas Figuras 1A e 1B.

A Figura 2 mostra um gráfico comparativo da glicose liberada de apimelefante *in natura* (10% m/v) em 12 h, em equipamento hidrolisador rotativo, com e sem a utilização de esferas, sem enzimas.

A Figura 3 mostra concentração de glicose liberada a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* em 12 horas, em hidrolisador rotativo, com a utilização de esferas, utilizando diferentes concentrações de substrato (5 a 20% m/v de substrato).

A Figura 4 mostra um gráfico comparativo da liberação de glicose a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante *in natura* em 12 horas, em hidrolisador rotativo e em frascos de 3,6 L, utilizando diferentes concentrações de substrato (5 a 25% m/v).

A Figura 5 mostra um gráfico comparativo para 5% de substrato da concentração de açúcares (xilose), consumo de glicose e produção de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-elefante *in natura* submetidos ao hidrolisador e em frascos de 3,6 L. Sendo: glicose (●), Xilose (▲) e Etanol (■).

A Figura 6 mostra um gráfico comparativo para 10% de substrato da concentração de açúcares (xilose), consumo de glicose e produção de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-elefante *in natura* submetidos ao hidrolisador e em frascos de 3,6 L. Sendo: glicose (●), Xilose (▲) e Etanol (■).

A Figura 7 mostra um gráfico comparativo para 15% de substrato da concentração de açúcares (xilose), consumo de glicose e produção de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-elefante *in natura* submetidos ao hidrolisador e em frascos de 3,6 L. Sendo: glicose (●), Xilose (▲) e Etanol (■).

A Figura 8 mostra um gráfico comparativo para 20% de substrato da concentração de açúcares (xilose), consumo de glicose e produção de etanol a partir da fermentação dos

hidrolisados de capim-elefante *in natura* submetidos ao hidrolisador e em frascos de 3,6 L. Sendo: glicose (●), Xilose (▲) e Etanol (■).

A Figura 9 mostra um gráfico comparativo para 25% de substrato da concentração de açúcares (xilose), consumo de glicose e produção de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados de capim-elefante *in natura* submetidos ao hidrolisador e em frascos de 3,6 L. Sendo: glicose (●), Xilose (▲) e Etanol (■).

A Figura 10 mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 400 vezes de capim-elefante *in natura* em hidrolisador rotativo. A - 12 h sem esferas e sem enzimas. B - 12 h com esferas e sem enzimas. C - 12 h com esferas e com enzimas.

Descrição detalhada da invenção

As descrições que seguem são apresentadas a título de exemplo e não limitativas ao escopo da invenção e farão compreender de forma mais clara o objeto do presente pedido de patente.

Reator rotativo para hidrólise de biomassa

A presente invenção revela um reator rotativo (Figura 1) para hidrólise de material lignocelulósico, em especial o capim-elefante para a liberação de açúcares fermentescíveis, compreendendo:

- pelo menos um meio de rotação;
- pelo menos um meio de controle de temperatura;
- pelo menos um meio digestor do dito material lignocelulósico; em que a

homogeneização do material lignocelulósico é realizada pelo movimento rotativo do referido reator rotativo.

O reator apresenta controles de temperatura, rotação e esferas que contribuem para realizar hidrólises enzimáticas de lignocelulósicos em menores tempos e com maiores concentrações de açúcares.

Para o controle de temperatura é utilizado sistema interno de resistências associado a termostato. Para a seleção da rotação adequada para o processo de hidrólise utiliza-se controlador e motor de passo. Para o controle da digestão há um sistema de abertura para a coleta de amostras e monitoramento.

O reator rotativo da presente invenção permite realizar o pré-tratamento físico da biomassa (ou material lignocelulósico) ao mesmo tempo em que ocorre a hidrólise deste. Sendo o referido pré-tratamento físico realizado pelo meio digestor, sendo escolhido dentre: dentes, esferas em aço com revestimento em poliamida (5 a 50 mm de diâmetro, preferencialmente) ou uma combinação entre os mesmos. Enquanto que a hidrólise é selecionada dentre: hidrólise enzimática, hidrólise ácida ou uma combinação entre as mesmas. A presente invenção apresenta, em relação ao estado da técnica, as seguintes vantagens:

- hidrolisa todo tipo de biomassa lignocelulósica a monossacarídeos e oligossacarídeos, quando associada à presença de enzimas e/ou ácidos;
- possibilita a obtenção de açúcares em menores tempos que em reatores de hidrólise convencionais;
- possibilita a hidrólise de elevadas concentrações de biomassa;
- utiliza o processo de hidrólise enzimática com o emprego de celulases e/ou xilanases e/ou enzimas acessórias produzidas em cultivo líquido ou em estado sólido, porém, pode-se utilizar também hidrólise ácida (com ácidos diluídos);
- o equipamento possibilita o controle da temperatura e da agitação para a melhor ação das enzimas na hidrólise de lignocelulósicos;

- o presente processo possibilita o pré-tratamento físico do material concomitantemente com a hidrólise enzimática e/ou fermentação.

O processo de obtenção de açúcares em hidrolisador rotativo da presente invenção é uma alternativa aos processos conhecidos, pois torna a produção mais econômica e possibilita a utilização de substratos que podem ser cultivados em diferentes regiões geográficas.

O design do equipamento com aberturas frontais, laterais e na parte posterior permite a alimentação com material lignocelulósico com maior facilidade, bem como facilita a limpeza do equipamento, evitando possíveis contaminações durante o processo de hidrólise dos lignocelulósicos.

Processo de obtenção de açúcares fermentescíveis

Processo de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de material lignocelulósico caracterizado por compreender etapa de pré-tratamento físico e etapa de hidrólise, sendo a referida etapa de hidrólise realizada simultaneamente com o pré-tratamento físico do material lignocelulósico, em que tal processo é realizado em reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, conforme definido acima.

Preferencialmente, o processo de obtenção de açúcares fermentescíveis compreende o uso de hidrólise do tipo: hidrólise enzimática, porém não limitado ao mesmo, podendo ser utilizada hidrólise ácida.

Ainda, é um objeto da presente invenção o uso de produto hidrolisado em processo de fermentação caracterizado pelo fato do produto hidrolisado ser obtido por processo de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de material lignocelulósico, conforme definido acima. Preferencialmente, o processo de fermentação com o produto hidrolisado obtido pelo processo da presente invenção, compreende um processo de fermentação para a obtenção de etanol.

Exemplo 1 – Realização

Em uma realização preferencial, conforme observado na Figura 2, o capim-elefante *in natura* foi utilizado como material lignocelulósico para utilização no reator da presente invenção, com e sem esferas para verificação do efeito das esferas sobre o material. Em seguida, testou-se o emprego de capim-elefante *in natura* com esferas e com enzimas (Figura 3) de *P. echinulatum*, sendo, neste caso, um processo de hidrólise enzimática.

Em um aspecto da invenção, sendo, portanto, um de seus objetos, a utilização preferencial de hidrólise enzimática, utilizando celulasas e/ou hemicelulasas e/ou outras enzimas, mas não unicamente, sendo que hidrólises ácidas também podem ser realizadas.

Outro aspecto da invenção, sendo, portanto, outro de seus objetos, a presente invenção proporciona a utilização de substratos lignocelulósicos preferencialmente, *in natura* ou pré-tratado.

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo 1.1

A fim de diminuir os custos de produção, capim-elefante foi utilizado como uma alternativa de baixo custo para a liberação de açúcares.

Capim-elefante é inserido no reator com tampão citrato de sódio, podendo-se utilizar concentrações de até 50% de substrato. Essa mistura é submetida a temperaturas na faixa de 20 a 100 °C por 12 h ou período de tempo necessário para a liberação dos açúcares. Coletas são realizadas em diversos intervalos de tempo para análise de açúcares e outros componentes, pois diferentes biomassas apresentam diferentes tempos de cinéticas de liberação de açúcares redutores.

Exemplo 1.2

Capim-elefante é inserido no reator com tampão citrato de sódio e esferas de aço na faixa de 5 a 50 mm de diâmetro (para escalonamento, há aumento proporcional da quantidade e tamanho das esferas). Essas são utilizadas para melhorar a liberação de açúcares da biomassa e diminuir o tamanho de partícula. Essa mistura é submetida a temperaturas na faixa de 20 a 100 °C por 12 h ou período de tempo necessário para a liberação dos açúcares. Coletas são realizadas em diversos intervalos de tempo para análise de açúcares e outros componentes, pois diferentes biomassas apresentam diferentes tempos de cinéticas de liberação de açúcares redutores.

Exemplo 1.3

Fermentação dos hidrolisados de capim-elefante in natura submetidos à hidrólise enzimática com o uso de esferas em hidrolisador rotativo e em frascos de 3,6 L, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Conforme apresentado nas Figuras 5 a 9.

Os hidrolisados de 12 horas tanto a partir do hidrolisador, como a partir dos frascos de 3,6 L foram fracionados em tubos de centrífuga de 15 mL e inoculados com uma suspensão de 10^8 células de *S. cerevisiae* e suplementados com sulfato de amônio e Prodex[®]. A fermentação ocorreu durante 48 h a 28 °C.

Exemplo 1.4

Análise da fibra de capim-elefante in natura submetida ao hidrolisador rotativo. O capim-elefante in natura previamente moído é submetido ao hidrolisador rotativo, a 50 °C, por um tempo médio de 12 horas. Compara-se a utilização ou não de esferas na morfologia da fibra. Posteriormente, verifica-se a utilização de esferas com a concomitante utilização de enzimas. As esferas são utilizadas para diminuir o tamanho de partícula e facilitar a ação das enzimas.

Evidencia-se, pela Figura 10, que sem a utilização das esferas (A), a estrutura apresenta-se mais compacta e de superfície lisa, com a estrutura preservada, já nas Imagens B e C, observa-se que a utilização das esferas promoveu mudanças estruturais na fibra de capim-elefante, pode-se observar fissuras e fragmentações da fibra. Observa-se, ainda, a presença de lacunas e a exposição da estrutura interna (Imagem C).

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico caracterizado pelo fato de compreender:

- pelo menos um meio de rotação;

- pelo menos um meio de controle de temperatura;

- pelo menos um meio digestor do dito material lignocelulósico; em que a homogeneização do material lignocelulósico é realizada pelo movimento rotativo do referido reator rotativo.

2. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado pelo fato do meio digestor compreender tratamento físico ao material lignocelulósico, sendo escolhido dentre: dentes internos, esferas, ou uma combinação entre os mesmos.

3. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, de acordo com a Reivindicação 2, caracterizado pelo fato do meio digestor compreender esferas, sendo tais esferas de aço com revestimento em poliamida.

4. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato do referido reator realizar simultaneamente pré-tratamento físico e hidrólise do material lignocelulósico.

5. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato da hidrólise ser escolhida dentre: hidrólise enzimática, hidrólise ácida, ou uma combinação entre as mesmas.

6. Reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, de acordo com a Reivindicação 5, caracterizado pelo fato da hidrólise ser do tipo hidrólise enzimática.

7. Processo de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de material lignocelulósico caracterizado por compreender etapa de pré-tratamento físico e etapa de hidrólise, sendo a

referida etapa de hidrólise realizada simultaneamente com o pré-tratamento físico do material lignocelulósico.

8. Processo, de acordo com a Reivindicação 7, caracterizado pelo fato de ser realizado em reator rotativo para hidrólise de material lignocelulósico, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações 1 a 6.

9. Processo, de acordo com a Reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato da hidrólise ser escolhida dentre: hidrólise enzimática, hidrólise ácida, ou uma combinação entre as mesmas.

10. Uso de produto hidrolisado em processo de fermentação caracterizado pelo fato do produto hidrolisado ser obtido por processo de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de material lignocelulósico, conforme definido em qualquer uma das Reivindicações 7 a 9.

11. Uso de produto hidrolisado em processo de fermentação de acordo com a Reivindicação 10, caracterizado pelo fato do processo de fermentação ser aplicado na obtenção de etanol.

Resumo

A presente invenção se situa nos campos da bioquímica, engenharia bioquímica e engenharia química e vem descrever um equipamento para hidrólise de biomassa, bem como um processo de obtenção de produto hidrolisado pelo referido equipamento, e o uso do referido produto hidrolisado em processos de fermentação para a produção de etanol. A presente invenção apresenta como vantagens a redução das etapas processuais envolvidas na hidrólise de biomassa, bem como apresenta uma solução para a digestão da biomassa.

Figuras

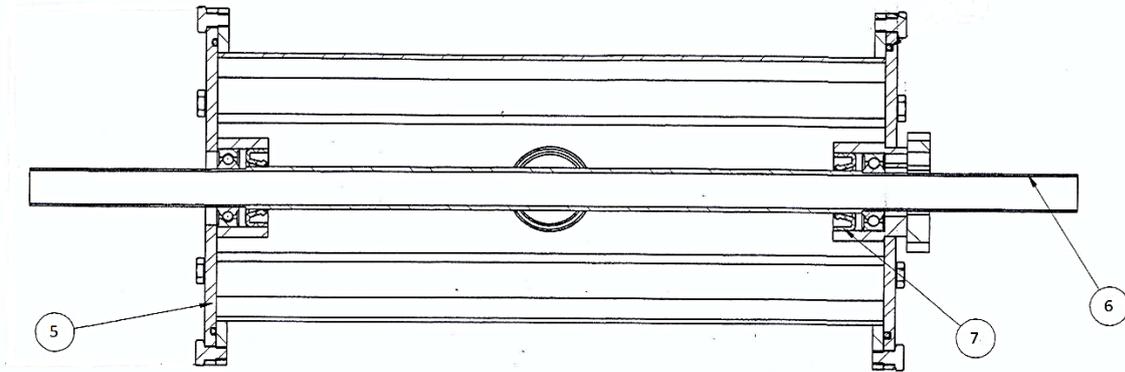


Figura 1A

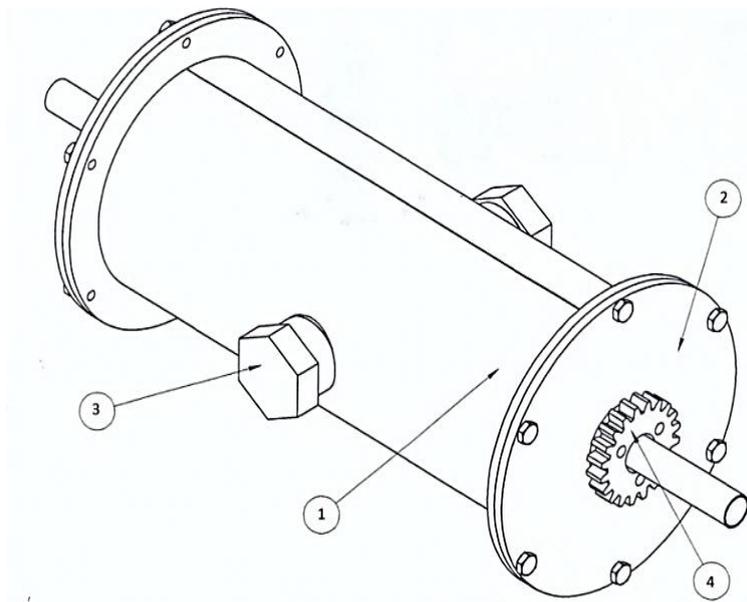


Figura 1B

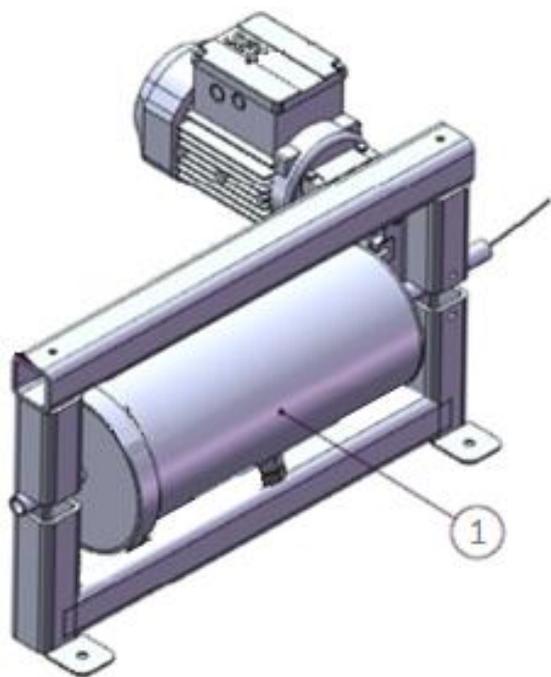


Figura 1C

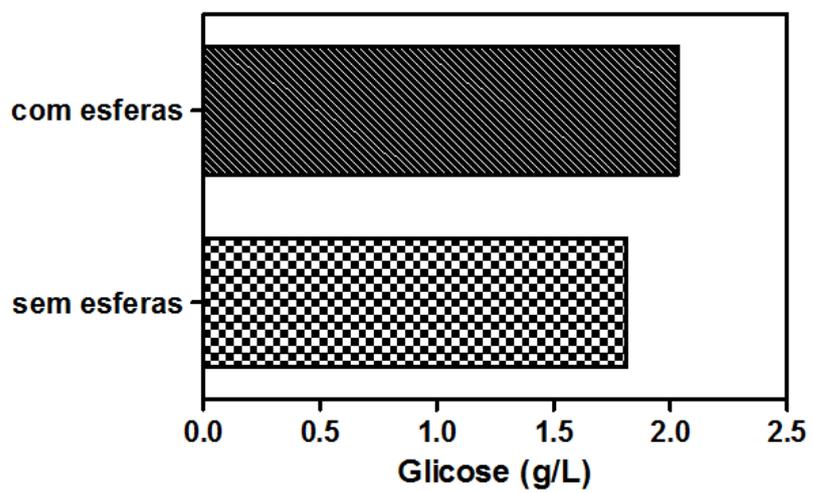


Figura 2



Figura 3

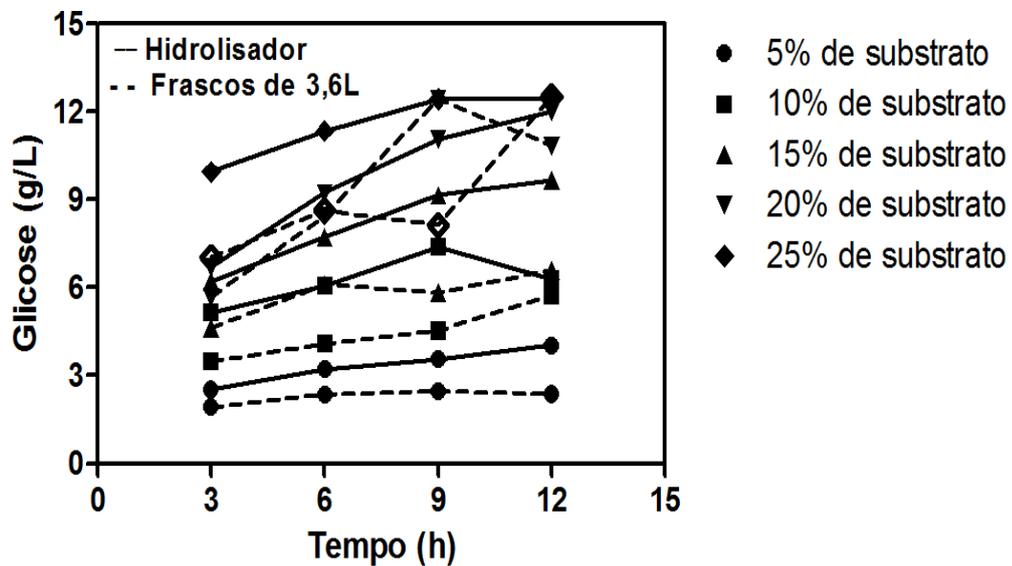


Figura 4

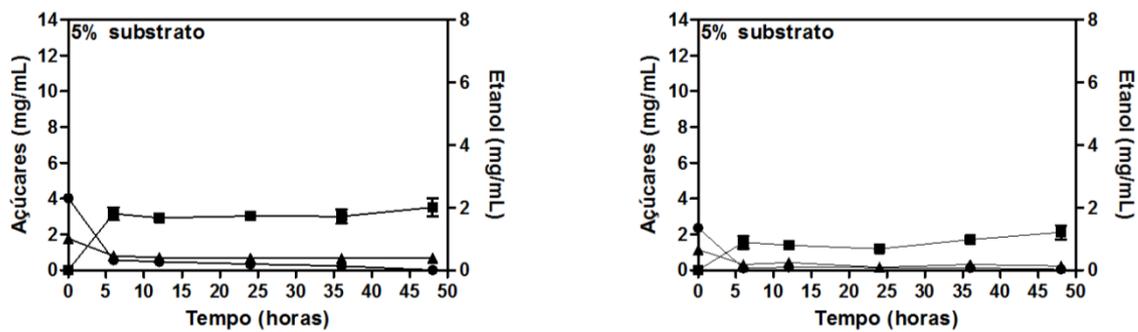


Figura 5

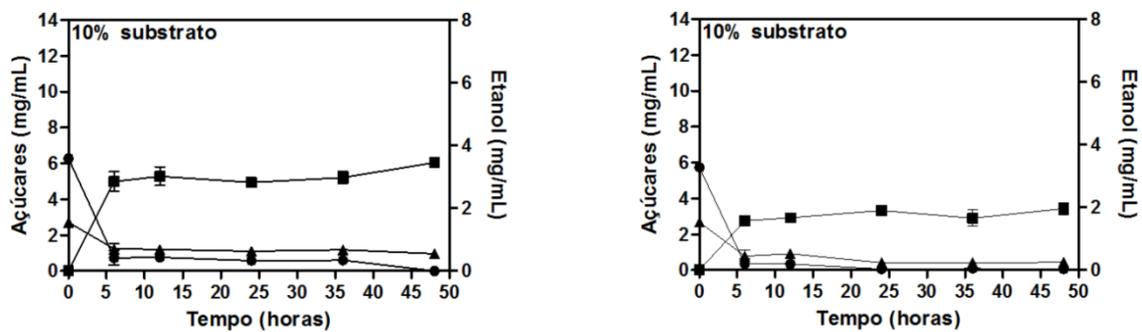


Figura 6

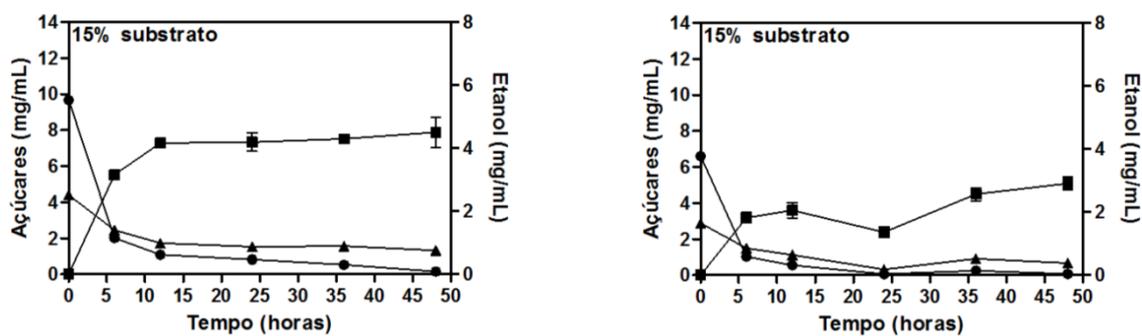


Figura 7

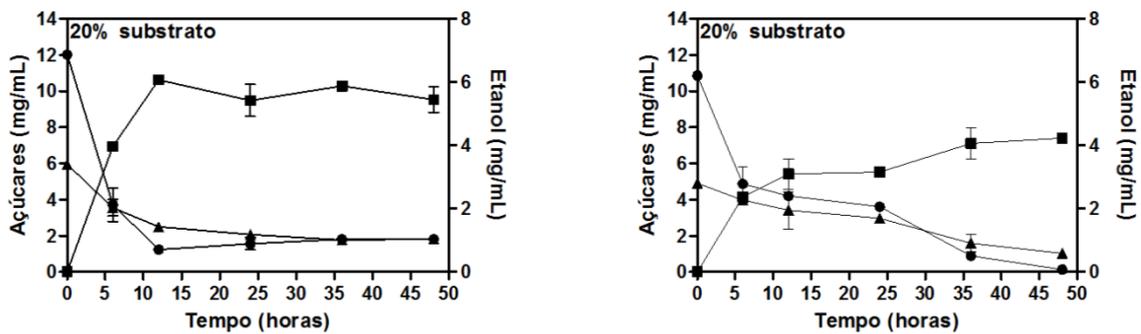


Figura 8

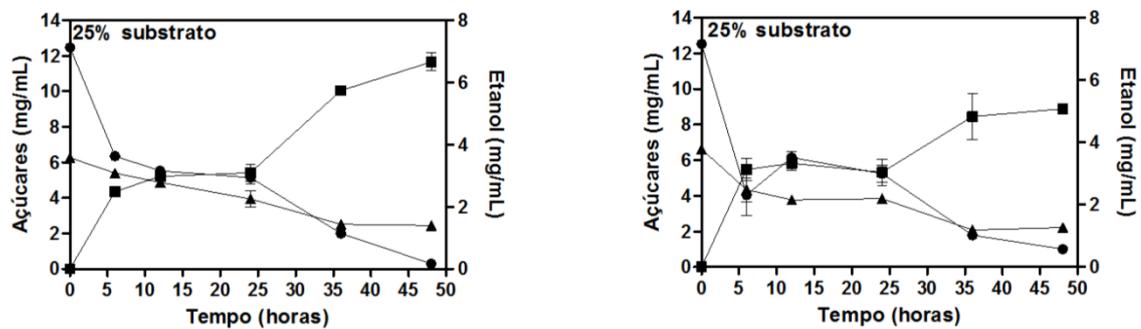


Figura 9

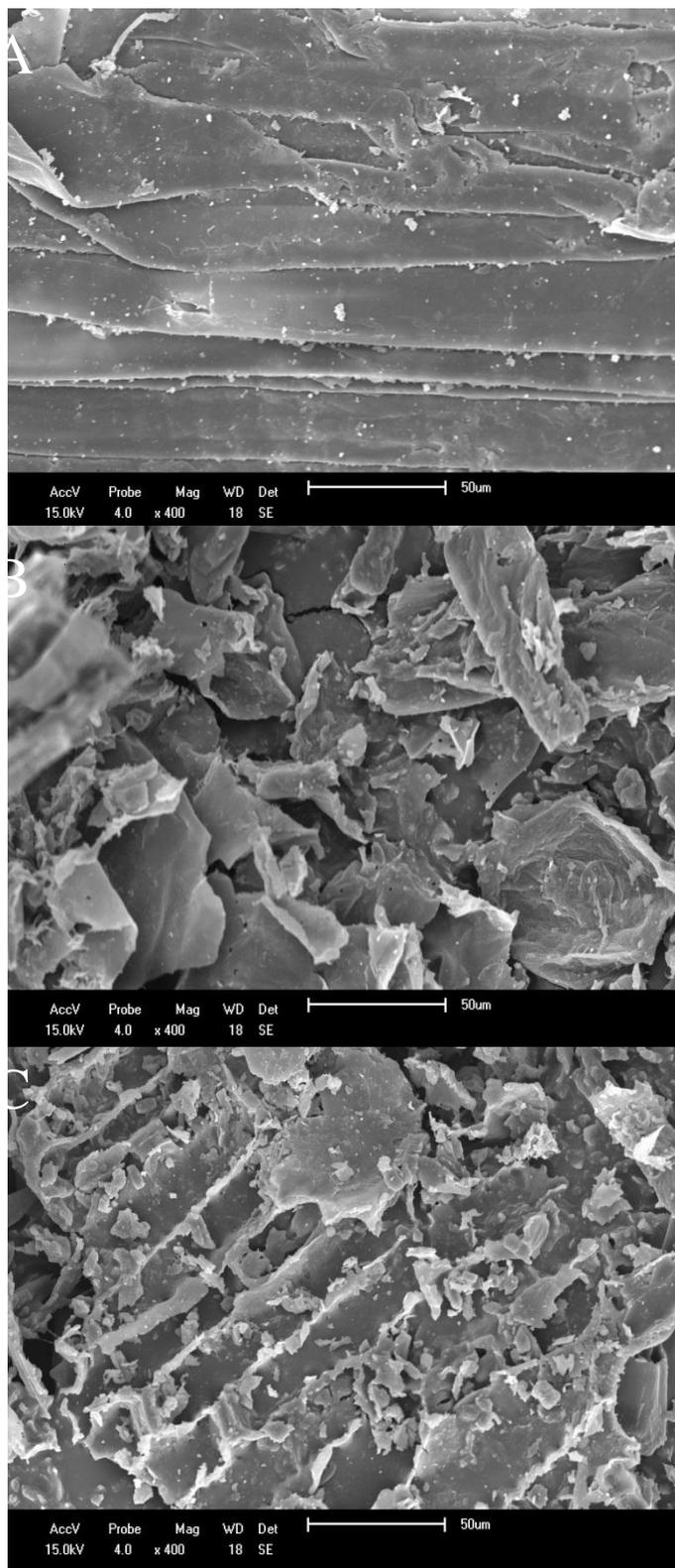


Figura 10

Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids



Daiane Menegol, Roselei Claudete Fontana, Aldo José Pinheiro Dillon, Marli Camassola*

University of Caxias do Sul, Laboratory of Enzymes and Biomass, 1130 Francisco Getúlio Vargas Street, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

H I G H L I G H T S

- Ethanol production was about double in the rotating hydrolysis reactor.
- Greatest glucose yield was obtained for 4% (w/v) untreated biomass.
- Highest glucose and ethanol concentrations were obtained using 16% (w/v) solids.

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 24 December 2015
 Received in revised form 17 March 2016
 Accepted 19 March 2016
 Available online 22 March 2016

Keywords:

Elephant grass
 Enzymatic hydrolysis
Penicillium echinulatum
Saccharomyces cerevisiae
 Ethanol

A B S T R A C T

The enzymatic hydrolysis of *Pennisetum purpureum* (elephant grass) was evaluated at high total solid levels (from 4% to 20% (w/v)) in a concomitant ball milling treatment in a rotating hydrolysis reactor (RHR). The greatest glucose yield was 20.17% when 4% (w/v) untreated biomass was employed. When sugars obtained from enzymatic hydrolysis were submitted to fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, the greatest ethanol yield was 22.61% when 4% (w/v) untreated biomass was employed; however, the highest glucose concentration (12.47 g/L) was obtained using 20% (w/v) solids and highest ethanol concentration (6.1 g/L) was obtained using 16% (w/v) solids. When elephant grass was hydrolyzed in the rotating hydrolysis reactor, ethanol production was about double that was produced when the biomass was hydrolyzed in a static reactor (SR). These data indicate that it is possible to produce ethanol from elephant grass when milling treatment and enzymatic hydrolysis are performed at the same time.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids

Daiane Menegol, Roselei Claudete Fontana, Aldo José Pinheiro Dillon and Marli Camassola*

University of Caxias do Sul – Laboratory of Enzymes and Biomass, 1130 Francisco Getúlio Vargas Street, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

Phone/fax: 55 54 3218 2149

*Corresponding author - mcamassola@gmail.com

Abstract

The enzymatic hydrolysis of *Pennisetum purpureum* (elephant grass) was evaluated at high total solid levels (from 4 to 20 % (w/v)) in a concomitant ball milling treatment in a rotating hydrolysis reactor (RHR). The greatest glucose yield was 20.17% when 4 % (w/v) untreated biomass was employed. When sugars obtained from enzymatic hydrolysis were submitted to fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, the greatest ethanol yield was 20.17% when 4% (w/v) untreated biomass was employed; however, the highest glucose concentration (12.47 g/L) was obtaining using 20% (w/v) solids and highest ethanol concentration (6.1 g/L) was obtained using 16 % (w/v) solids. When elephant grass was hydrolyzed in the rotating hydrolysis reactor, ethanol production was about double that was produced when the biomass was hydrolyzed in a static reactor (SR). These data indicate that it is possible to produce ethanol from elephant grass when milling treatment and enzymatic hydrolysis are performed at the same time.

Keywords: elephant grass; enzymatic hydrolysis; *Penicillium echinulatum*; *Saccharomyces cerevisiae*; ethanol

1. Introduction

Energy consumption has increased, and petroleum has become the main resource to meet increasing energy demands. However, with the increased use of petroleum products such as gasoline, the amount of greenhouse gases released into the atmosphere has also increased, and it is known that fossil fuels cannot supply all of the world's energy requirements (Scholl et al., 2015). On the other hand, the use of alternative energy sources, such as ethanol, is

increasing, and the use of renewable energy may lead to decreased greenhouse gas emissions (Bayrakci & Koçar, 2014).

In this sense, lignocellulosic biomass, mainly composed of cellulose, hemicellulose, lignin, extractives and ashes, is an abundant source of raw material that can be converted in to useful materials and energy (Resch et al., 2013). The chemical properties of the components of lignocellulosics make them a substrate of biotechnological value. The biological conversion of these lignocellulosic materials into ethanol offers numerous benefits, but its development is hampered by economic and technical aspects (Sánchez & Cardona, 2008). Lignocellulosic biotransformation focuses on the enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose, followed by fermentation to ethanol (Gan et al., 2002).

For ethanol production, an ideal lignocellulosic material should be employed. Elephant grass has high potential because of its productivity compared to other species, as it produces about 45 tons of dry matter per hectare per year. The production of sugarcane and corn is about 21 tons (sugar and bagasse) and 13 tons (grain and stover), respectively, on a dry matter basis (Menegol et al., 2014a). Additionally, untreated elephant grass is similar in cellulose composition to sugarcane bagasse, at around 36% cellulose (Menegol et al., 2014b), while sugarcane bagasse contains 34-45% cellulose (Szczerbowski et al., 2014). Additionally, the elephant grass contains approximately 22.5% of hemicellulose, 8% ash, 5.5% protein and 20% lignin. Due these characteristics, elephant grass is an interesting biomass to produce second generation ethanol.

The implementation of enzymatic hydrolysis using high solid concentrations is considered of fundamental importance for the reduction of costs for obtaining sugars from lignocellulosic biomass, especially regarding second generation ethanol production which involves fermentation and distillation (Lin & Tanaka, 2006). In conventional pretreatments, compounds are formed which negatively interfere in microbial metabolism, such as furfural,

hydroxymethylfurfural and acetic acid. When high concentrations of raw material (substrate) are used, the sugar yield can usually be reduced, but the causes are not completely understood. It may be due to inefficient contact between the enzyme and the substrate, problems with homogenizing the lignocellulosic material and enzymes, as well as enzyme adsorption onto cellulosic or non-cellulosic substrate components such as lignin (Ramachandriya et al., 2013).

A range of microorganisms are able to produce an enzyme complex able to catalyze the enzymatic hydrolysis of different lignocellulosic materials. Mutant strains of *Penicillium echinulatum* are known to secrete high levels of enzymes, 35 FPU/g of substrate in solid-state culture and 8.3 FPU/mL in submerged culture (Camassola & Dillon, 2010; Dillon et al., 2011; dos Reis et al., 2013) and the potential of these strains for enzymatic hydrolysis has been previously investigated (Menegol et al., 2014a; Menegol et al., 2014b).

In addition to the cost of the raw material, the pretreatment and enzymatic hydrolysis steps are major contributors to the total production cost of ethanol from biomass. In this sense, the objective of this study was to evaluate concomitant ball milling treatment and enzymatic hydrolysis of elephant grass in order to obtain the highest release of glucose, using enzyme complexes of *Penicillium echinulatum* produced in solid-state cultivation. These experiments were performed in a RHR (rotating hydrolysis reactor) in comparison to a SR (static reactor). Additionally, hexose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* was compared using the samples prepared in the RHR and SR.

2. Materials and methods

2.1 Microorganisms

The cellulolytic mutant *P. echinulatum* strain S1M29 was used in this study for enzyme production. This strain was obtained from strain 9A02S1 of *Penicillium echinulatum*, with the use of hydrogen peroxide mutagenesis and the selection of mutants in 2-deoxyglucose medium.

The strain was grown on C-agar slants for up to 7 days at 28°C until conidia formed, and then stored at 4°C until use (Dillon et al., 2011).

For fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1 was used. This strain was kindly provided by Dr. Luiz Humberto Gomes of Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), University of São Paulo, Piracicaba, SP. The CAT-1 strain is a yeast that predominates during fermentation in ethanol plants in Brazil. The strain was grown on YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) medium for up to 2 days at 28°C, and then stored at 4°C until use.

2.2 Substrate

The elephant grass samples were collected in the city of Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brazil. Plant harvesting was carried out 6 months after planting. This material was initially dried at 60 °C for 3 days and then triturated with a forage chopper (0.5 to 2 cm) and stored in polypropylene bags until used (Menegol et al., 2014a). The biomass composition was assessed as described by (Menegol et al., 2014b).

2.3 Scanning electron microscopy (SEM)

The changes in the physical biomass structure were observed by scanning electron microscopy performed according to the methodology used in the Materials Characterization Laboratory (LCMAT) of the University of Caxias do Sul. The methodology is based on a process called magnetron-sputtering plasma, known as physical vapor deposition (PVD), according to Schneider et al. (2014).

2.4 Enzyme production

Solid-state cultivations were conducted in 32×24 cm trays and were closed with a gauze-covered cotton wool plug containing 200 g of dry mass of the production media (50% (w/w) wheat bran, 25% (w/w) untreated elephant grass and 25% (w/w) untreated sugarcane bagasse) and 200 mL basal salt solution containing (in g/L) KH₂PO₄, 20; (NH₄)₂SO₄, 13; CO(NH₂)₂, 3;

MgSO₄·7H₂O, 3; CaCl₂, 3; FeSO₄·7H₂O, 0.050; MnSO₄·H₂O, 0.0156; ZnSO₄·7H₂O, 0.014; and CoCl₂·0.0020. The media were autoclaved at 121°C for 1 h. Each medium was then inoculated with sufficient conidial suspension to give a final concentration of 1×10⁶ conidia per gram of dry mass of production media. The moisture of the media was adjusted to 67% (w/w) by the addition of distilled water. The trays were incubated at 28°C and 90% humidity for 4 days. To extract the enzymes after incubation, 600 mL of sodium citrate buffer (pH 4.8, 50 mmol/L) was added and incubated under agitation for 30 min at 4°C, then filtered through polyester fabric.

2.5 Enzyme assay

The enzymatic activity of the enzyme broth was assessed to evaluate the stability of the enzymes during hydrolysis.

Enzymatic activity was analyzed on filter paper (filter paper activity – FPA) according to Ghose (1987). Endoglucanase activity was determined according to Ghose (1987), using 2% (w/v) carboxymethylcellulose solution in citrate buffer. Xylanase activity was determined in the same way as endoglucanase activity, but 1% (w/v) oat spelt xylan was used as the substrate in the place of carboxymethylcellulose. Reducing sugars were estimated as either xylose or glucose equivalents by the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Bailey et al., 1992).

One international unit (IU) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μmol of reducing sugar from the appropriate substrate per minute under the assay conditions.

For β-glucosidase activity, p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG) was used as the substrate. One unit of β-glucosidase activity (using the substrate pNPG) was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μmol of pNPG per min (Daroit et al., 2008).

2.6 Determination of the adsorption of cellulases and xylanases by the substrate

In order to verify the adsorption of cellulases and xylanases in the lignocellulosic substrates, hydrolysis of different substrates was carried out in 50 mL Duran[®] flasks at 50°C

for 1 h and 6 h. After hydrolysis, these materials were filtered through polyester fabric and centrifuged for 20 min at $9800 \times g$. Gels for total protein and zymograms for the detection of endoglucanase, exoglucanase, xylanase and β -glucosidase activities were prepared. First, 8 % (w/v) substrate was tested using as the substrate elephant grass, sugarcane bagasse, Avicel[®], while for 20 % (w/v) substrate, only elephant grass was used. A control made from enzymatic extract and citrate buffer without addition of substrate (cellulose or elephant grass) was also used. It was used the same volume of sample containing enzymes for the hydrolysis carried out using 8 % (w/v) and 20 % (w/v) of substrate for endoglucanase, exoglucanase and xylanase zymograms, but for total proteins and β -glucosidase activities from hydrolysis using 20 % (w/v) of substrate, it was used half the amount of sample than was used for 8 % (w/v).

2.7 SDS-PAGE of the enzyme solutions

To estimate the molecular weight of the proteins, non-reducing polyacrylamide gel electrophoresis (8.5 cm \times 7.5 cm \times 0.1 cm) was performed containing 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) with 1.5 cm gel concentration 12% (Laemmli, 1970). The electrophoretic run was performed at 200 V for about 1 h.

The samples were lyophilized and further solubilized in sample buffer. Then, the samples were homogenized by vortexing and applied into the channels of the gel.

As the molecular weight marker, Precision Plus Protein[™] Standards All Blue (Bio Rad) was used. For electrophoresis a Tris-glycine pH 8.3 buffer solution was used. Electrophoresis was carried out in a vertical tank (Bio Rad Mini Protean[®] Tetra System). Detection of the gel bands was performed after the gel was incubated in a solution of 0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250.

2.8 Cellulase and xylanase zymograms

Endoglucanase activity detection was prepared according to Zampieri et al. (2013) and supplemented with a solution of 2% carboxymethylcellulose (w/v) to give a final concentration

of 0.2% (w/v) in the gel. The gel was stained with a 0.1% solution (w/v) Congo red revealed with 1 mol/L NaCl solution. Light bands on a red background indicate the degradation of carboxymethylcellulose. For xylanase, the same methodology was employed, but a xylan solution was added instead of carboxymethylcellulose.

For β -glucosidase activity detection, the gel separation and concentration were prepared as for total protein. The gel was treated with a solution of esculin 0.2% (w/v) in sodium citrate buffer (50 mmol/L pH 4.8). A 1% (w/v) solution of FeCl_3 was used to reveal bands. Dark bands on a light background are indicative of β -glucosidase activity (Zampieri et al., 2013).

Exoglucanase activity detection was done with the gel was treated with 4-methylumbelliferyl β -D-cellobioside (Zampieri et al., 2013). The gels were analyzed in a Molecular Imager[®] Gel Doc XR + Imaging System[™] (Bio Rad).

2.9 Enzymatic hydrolysis of elephant grass

The enzymatic hydrolysis was carried out in a RHR with a 2.5 L capacity. This equipment presents the possibility of concomitant physical pretreatment (milling) and hydrolysis of biomass, containing spheres which assist in the disintegration of biomass. Experiments were also performed in a SR with a capacity of 3.6 L. In both reactors, the working volume was 1 L. Sodium citrate buffer (pH 4.8, 50 mmol/L) was used in both reactors with the elephant grass sample at 50°C. In the RHR, the velocity was 150 rpm. Enzymatic hydrolysis was evaluated with different substrate concentrations (5 to 25 % and added 100 mL of water, this resulted in final concentration of 4 to 20% (w/v)). The enzyme concentration used was 10 FPU/g of elephant grass and spheres were used in some cases in the RHR to promote a decrease in particle size, thereby facilitating the enzyme action. In this volume of enzymes, beside FPA there were 124.43, 6.16 and 893.55 U of β -glucosidases, endoglucanases and xylanases, respectively. Samples were collected for the analysis of sugars at different time points of process. Samples (20 mL) were spun down in 50 mL tubes (4,000×g for 20 min). The remaining

solids were washed with ultrapure water five times to remove any water-soluble material. These samples were filtered (0.45 and 0.22 μm) and the sugars measured in HPLC. The percentage conversion obtained after the enzymatic hydrolysis of glucan was calculated according to Equation 1.

$$\text{Equation 1: Glucose yield (\%)} = \frac{0.9 ([\text{glucose}]/[\text{biomass}])}{f} \times 100$$

where 0.9 is the correction for the anhydrous conversion of monomeric sugars to polymeric sugars and f is the glucan fraction of dry biomass.

2.10 Analysis of sugars

The reducing sugars present in the solutions from the enzymatic hydrolysis were analyzed by HPLC. Samples were filtered through a 0.20 μm nylon membrane and analyzed using a LC-20AD Shimadzu chromatography system, with a DGU-14A mobile phase degasser, CTO-20A column oven and RID-10A detector for the refractive index, as well as an SPD-20A photodiode array detector for ultraviolet spectrophotometry. The analysis was performed on an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad[®]) at 60°C, preceded by Cation-H pre-column and eluted with 5 mmol/L H₂SO₄ mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. Quantification was effected by external standardization, based on calibration curves for each monitored component, i.e. cellobiose, glucose, xylose, arabinose and acetic acid as described by Scholl et al. (2015).

2.11 Alcoholic fermentation

The alcoholic fermentation of sugars released from elephant grass was carried out using a *S. cerevisiae* CAT-1, a strain that prevails during alcoholic fermentation in southeastern Brazil, in the concentration of 10⁸ viable cells/mL for 48 h. Ethanol production was performed by a saccharification and fermentation process (enzymatic hydrolysis and fermentation carried out

separately).

The experiments was performed in 15 mL tubes containing 13 mL of the suspension of elephant grass submitted to hydrolysis and supplemented to obtain a final concentration of 4 mg/mL of Prodex[®] and 1 mg/mL of (NH₄)₂SO₄, at 28°C under static conditions. Samples were taken to determine the consumption of glucose and ethanol production by HPLC using the Aminex HPX-87H column by the refractive index detector at 60°C, with 5 mmol/L H₂SO₄ (mobile phase) and a flow rate of 0.6 mL/min. The theoretical yield of ethanol was calculated according to Pessani et al. (2011) (Equation 2).

$$\text{Equation 2: Ethanol yield (\%)} = \frac{[\text{ethanol}]}{0.511 \times f[\text{biomass}] \times 1.11} \times 100$$

where 1.11 is the conversion factor of polymeric sugars to monomeric sugars, 0.511 is the conversion factor of glucose to ethanol and f is the glucan fraction of dry biomass.

All calculations (Table 4) were based the data of 12 h process.

3. Results and Discussion

3.1 Hydrolysis in the SR (with and without agitation) and the RHR

To reduce the costs of biomass pretreatment, untreated elephant grass was used as a substrate, the biomass was ground during the hydrolysis. For scaling enzymatic hydrolysis, a hydrolysis reactor was developed (RHR; Patent No. BR 102015016795-4). This equipment presents the possibility of concomitant physical pretreatment (milling) and hydrolysis of biomass, containing spheres which assist in the disintegration of biomass.

The first tests were conducted in the SR at 50°C for 12 h under different conditions: a static system, with and without the presence of enzymes and stirred in an incubator with agitation at 150 rpm, with and without enzymes. The enzyme loading was 10 FPU/g of

substrate, and the substrate concentration was 8% (w/v). As can be seen in Table 1, no differences were observed between samples with and without agitation, and the greatest release of glucose was observed with static hydrolysis for 9 h (6.74 g/L). Small increases in the concentration of sugar were also observed in the experiments without addition of enzymes. This may be owed to the acid character of the citrate buffer pH 4.8, since no increase in the concentration of sugar was observed when distilled water was used (data not shown).

With respect to xylose, the concentrations did not vary much during the 12 h process, both under static conditions and with stirring when compared to using or not using enzymes. For the presence of arabinose, this could only be verified in the samples from the enzymatic hydrolysis, both under stirred conditions and static conditions. This was due to the hydrolysis of hemicellulose by hemicellulase present in the enzymatic broth. Acetic acid was also detected, but in low concentrations. The presence of acetic acid was higher in the presence of enzymes, possibly due to the degradation of hemicellulose due the presence of hemicellulases in the enzymatic broth. It is known that acetic acid can inhibit the fermentation process; according to Lu et al. (2010) concentrations of 3.3 g/L acetic are considered inhibitory to the fermentation, whereas in the present study, lower concentrations were detected (maximum 0.03 g/L) (Table 1).

Table 1. Sugars and acetic acid released from untreated elephant grass subjected to the static reactor with or without agitation (150 rpm), using 8% (w/v) substrate, with or without the presence of enzymes (10 FPU/g).

Condition	Analyte (g/L)					
	Time (h)	Cellobiose	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic acid
Static With enzyme	3	0.38	4.87	2.97	0.62	0.017
	6	0.48	6.06	3.19	0.67	0.024
	9	0.32	6.74	3.38	0.75	0.030
	12	0.37	4.87	2.97	0.62	0.017
Static Without enzyme	3	0.29	1.44	2.13	n.d.	n.d.
	6	0.33	1.83	2.54	n.d.	0.005
	9	0.39	2.27	3.06	n.d.	0.025
	12	0.31	2.02	2.54	n.d.	0.007
150 rpm With enzyme	3	0.43	4.46	2.75	0.54	0.001
	6	0.35	5.70	3.03	0.64	0.020
	9	0.27	6.28	3.13	0.69	0.025
	12	0.21	6.59	3.17	0.71	0.029
150 rpm Without enzyme	3	0.30	1.62	2.42	n.d.	n.d.
	6	0.33	1.88	2.64	n.d.	0.004
	9	0.27	1.79	2.34	n.d.	n.d.
	12	0.31	2.05	2.58	n.d.	0.010

In tests conducted in the RHR, using spheres but not enzymes and 8 % (w/v) elephant grass, 2.03 g/L of glucose and 2.72 g/L of xylose was detected after 12 h of the process. These values are very close to those obtained without the use of spheres (1.81 g/L of glucose and 2.76 g/L of xylose) (Table 2).

Table 2. Sugars and acetic acid released from untreated elephant grass subjected to the rotating hydrolysis reactor with agitation (150 rpm), using 8% (w/v) substrate, with or without spheres, and with or without enzymes (10 FPU/g).

Condition	Analyte (g/L)					
	Time (h)	Cellobiose	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic acid
Without spheres Without enzyme	3	0.21	1.23	2.22	n.d.	n.d.
	6	0.27	1.60	2.57	n.d.	0.136
	9	0.32	1.76	2.84	n.d.	0.026
	12	0.29	1.81	2.76	n.d.	0.025
Without spheres With enzyme	3	0.20	4.91	2.86	0.60	0.001
	6	0.16	6.14	3.12	0.62	0.120
	9	n.d.	6.67	3.15	0.63	0.133
	12	0.14	6.94	3.20	0.63	0.141
With spheres Without enzyme	3	0.39	1.64	2.83	n.d.	n.d.
	6	0.39	1.77	2.83	n.d.	n.d.
	9	0.44	2.09	3.08	n.d.	n.d.
	12	0.39	2.03	2.72	n.d.	n.d.
With spheres With enzyme	3	0.80	5.16	3.50	0.29	0.063
	6	0.66	6.07	2.91	0.68	0.017
	9	0.56	7.41	3.31	0.79	0.047
	12	0.40	6.28	2.71	0.66	0.022

n.d.: not detected

According to Agbor et al. (2011), a pretreatment step prepares the biomass into a consistent size, shape and bulk density to facilitate the conversion process. Thus, the use of a physical pretreatment coupled with enzyme hydrolysis may contribute to reducing ethanol production costs. Grinding causes a reduction in the particle size and increases the performance of the enzyme, due to an increase in the surface area and, in some cases, by reducing the degree of polymerization and crystallinity of the cellulose. In addition, the environmental impact caused by this type of pretreatment is minimal (Sun & Cheng, 2002). Moreover, in this type of pretreatment, no inhibitors such as furfural or hydroxymethylfurfural are produced (da Silva et al., 2010).

Comparing the values of glucose released after 9 h of the process in the SR (Table 1) and in the RHR (Table 2), it was verified that the rotating hydrolysis value was higher (7.41 g/L), whereas in the SR the maximum value was 6.74 g/L. However, it appears that in the first 3 h, hydrolysis provided the rapid release of glucose, so there was conversion of a large part of

the substrate and thereafter increases in glucose concentration were reduced. The maximum release of xylose in the rotary hydrolyzer was 3.50 g/L after 3 h of the process.

Lignocellulosic materials are considered to be a source for the production of sugars which can be fermented to ethanol and other organic chemicals (Sánchez & Cardona, 2008). Technologies are currently available for lignocellulosic bioconversion to ethanol and other products; however, these technologies must be improved and new technologies developed to reduce costs (Pothiraj et al., 2006).

3.2 Scanning electron microscopy

Although of the use of spheres did not provide large increases in the release of sugars, the grinding of the material was promoted (Supplementary data 1), which can facilitate the action of the enzyme on the substrate. From the morphological characterization of the fiber by SEM, (Supplementary data 1-A), a more compact and smooth surface with the structure preserved was observed after 12 h in the rotating hydrolyzer reactor without spheres and enzymes. In Figures 1B and 1C, the elephant grass morphology in the presence of spheres and enzymes was very different. It was noted that the use of spheres promoted structural changes in elephant grass fiber, observed as cracks and fragmentation of the fiber. It was also observed that gaps and exposure of the internal structure (Supplementary data 1-C) was caused by the enzymatic action.

Micrographs of samples hydrolyzed after 3, 6, 9 and 12 h in the rotating hydrolysis reactor, using spheres, with and without enzymes were also obtained (Supplementary data 1-D to K). At 3 h (Supplementary data 1-D and E), the fibers were more unstructured, but the fibers were seen in bundle form. At 6 h, without the presence of enzymes, the fiber was still in bundle form (Supplementary data 1-F), but in the presence of enzymes, the bundle-like structure was lost and the material was fragmented (Supplementary data 1-G).

The presence of spheres in the cell structure of the enzymatically hydrolyzed samples

after 6 h may be due to the hydrolysis of cellulose and hemicellulose and can indicate increases in the surface area of cellulose, thus facilitating enzymatic attack (da Silva et al., 2010). In 9 h (Supplementary data 1-H and I), the fibers were more unstructured and the presence of independent fibers could be observed. The structure of the fiber was tightly fragmented, exposing the inside. After 12 h, with the use of enzymes, greater fragmentation of the material was seen (Supplementary data 1-K), showing that the enzymes were effective in the hydrolysis of the biomass.

The SEM images show that the use of spheres during enzymatic hydrolysis in the RHR promoted disruption of the fiber, which facilitated the access of enzymes to the sugar polymers. The purpose of pretreatment was to promote modifications to the macroscopic and microscopic structure of the cellulose material to make it accessible to the action of enzymes in hydrolysis or saccharification steps (Mosier et al., 2005).

3.3 Enzymatic hydrolysis of elephant grass at high solids

Enzymatic hydrolysis is a key step in the production of ethanol (Pu et al., 2007). From these results, a combination of spheres and enzymes was used. Then, different substrate concentrations were tested to determine the condition that provided the greatest release of sugars. Figure 1 shows a comparison of glucose release during hydrolysis carried out in a RHR or in a SR using different substrate concentrations (4 to 20% (w/v)). It was found that the release of glucose increased as the substrate concentration increased until a certain threshold. However, glucose release and the elephant grass concentration were not proportional.

It was noted that at, 0 h, the glucose concentration ranged between 0.2 and 2.8 g/L depending on the substrate concentration used. This fact can be explained by prior grinding of the material, which released a certain amount of sugars. Another consideration is the buffer used in enzymatic hydrolysis, since in the control with only water and biomass, the sugar concentrations were reduced by half (data not shown).

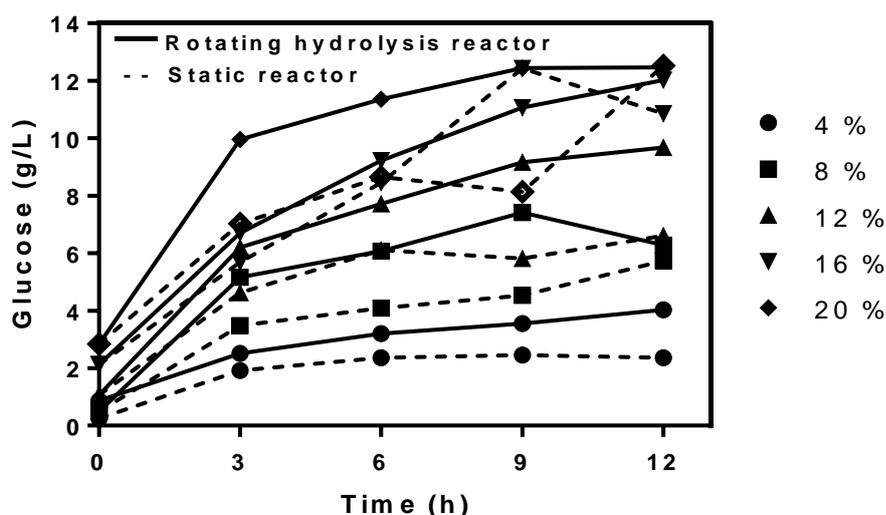


Figure 1. Profile of the release of glucose in the rotating hydrolysis reactor and the static reactor using different percentages of untreated elephant grass.

Table 3 shows the concentrations of sugars and acetic acid obtained from hydrolysis in the RHR (Table 3A) and SR (Table 3B). In the RHR, higher concentrations of sugars were detected, and at 3 h of hydrolysis, the glucose concentration obtained in the RHR was similar to that achieved in 12 h in the SR at a 12% (w/v) of concentration of the substrate. The concentrations of other sugars, i.e. cellobiose, arabinose and xylose, were also higher in the RHR.

Table 3. Concentration of sugars and acetic acid released during the enzymatic hydrolysis of untreated elephant grass, using different substrate concentrations, in the rotating hydrolysis reactor (A) and in the static reactor (B).

		Substances detected (g/L)					
	Concentration of substrate (%)	Time (h)	Cellobiose	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic acid
A	4%	3	0.47	2.52	1.45	0.32	n.d.
		6	0.35	3.20	1.50	0.34	n.d.
		9	0.26	3.55	1.54	0.36	n.d.
		12	0.37	4.03	1.76	0.56	n.d.
	8%	3	0.80	5.16	3.50	0.29	0.063
		6	0.66	6.07	2.91	0.68	0.017
		9	0.56	7.41	3.31	0.79	0.047
		12	0.40	6.28	2.71	0.66	0.022
	12%	3	1.56	6.20	3.77	0.74	n.d.
		6	1.25	7.72	4.13	0.99	0.092
		9	1.03	9.16	4.42	1.21	0.182
		12	0.81	9.68	4.40	1.22	0.183
	16%	3	2.15	6.70	5.45	1.16	0.227
		6	2.17	9.23	5.80	1.34	0.177
		9	1.79	11.06	5.93	1.62	0.289
		12	1.46	12.03	5.95	1.67	0.298
	20%	3	2.49	9.96	7.15	0.78	0.145
		6	1.32	11.36	7.75	1.03	0.398
		9	1.39	12.44	7.94	1.09	0.174
		12	1.79	12.47	6.26	0.91	0.354
B	4%	3	0.16	1.92	1.23	0.11	n.d.
		6	0.07	2.36	1.28	0.12	n.d.
		9	0.16	2.45	1.20	0.13	n.d.
		12	0.16	2.36	1.16	0.13	n.d.
	8%	3	0.41	3.48	2.26	0.19	n.d.
		6	0.18	4.09	2.07	0.20	n.d.
		9	0.14	4.53	2.17	0.20	n.d.
		12	0.34	5.73	2.68	0.30	0.010
	12%	3	0.50	4.63	3.50	0.22	0.055
		6	0.18	6.11	3.78	0.28	0.068
		9	0.17	5.81	2.68	0.25	0.026
		12	0.40	6.61	2.89	0.37	0.029
	16%	3	0.87	5.69	3.94	0.32	0.124
		6	0.58	8.46	3.99	0.47	0.130
		9	0.34	12.43	6.34	0.54	0.214
		12	0.72	10.85	4.91	0.59	0.153
	20%	3	0.76	7.03	5.44	0.32	0.168
		6	0.49	8.65	4.55	0.44	0.193
		9	0.28	8.13	4.36	0.36	0.114
		12	0.93	12.52	6.62	0.68	0.235

n.d.: not detected

As for the content of cellobiose in the RHR, these values showed a tendency to decrease as the hydrolysis time increased, suggesting that cellobiose was being continuously converted into glucose. In the SR, there an accumulation of cellobiose occurred after 12 h in substrate concentrations above 4% (w/v). Figure 2 shows the values for cellobiose and glucose. In the SR, inhibition may have occurred by cellobiose accumulation, while in the RHR, the fiber was more accessible to enzymes and the conversion of cellobiose to glucose could continue. However, this was not observed, possibly because inhibition occurred by end-product accumulation (glucose).

It can also be seen that the conversion of the hemicellulose fraction into xylose and arabinose was greater in the RHR compared to the SR, with the largest difference seen in the glucose content (Table 3). This fact may suggest that the cellulases are inhibited more strongly than xylanases.

Although an increase was observed in the concentration of sugars due along with an increase in the substrate concentration, it was observed that at 20 % (w/v) of substrate, the concentration of sugars, especially glucose, did not differ much from the concentration obtained at 16 % (w/v) substrate. Furthermore, after 24 h of hydrolysis (data not shown), in the RHR using 16 % (w/v) substrate, the concentration of glucose did not vary over time, and was maintained in the range of 13.20 g/L after 15 h of hydrolysis and 13.96 g/L after 24 h of process time. This can be explained by several factors.

One hypothesis is that high viscosity during hydrolysis prevented efficient mixing at high solids concentrations, since the viscosity of lignocellulose increases rapidly over a certain threshold (around 20% solids) (Kristensen et al., 2009). A low water content can also directly affect the performance of the enzyme, so the amount of free water is another factor that may have influenced the release of sugars. Water allows enzymes to exert their function, enhance contact between the substrate and facilitate the transport of products; low water concentrations

may compromise the effectiveness of an enzymatic action (Kristensen et al., 2009).

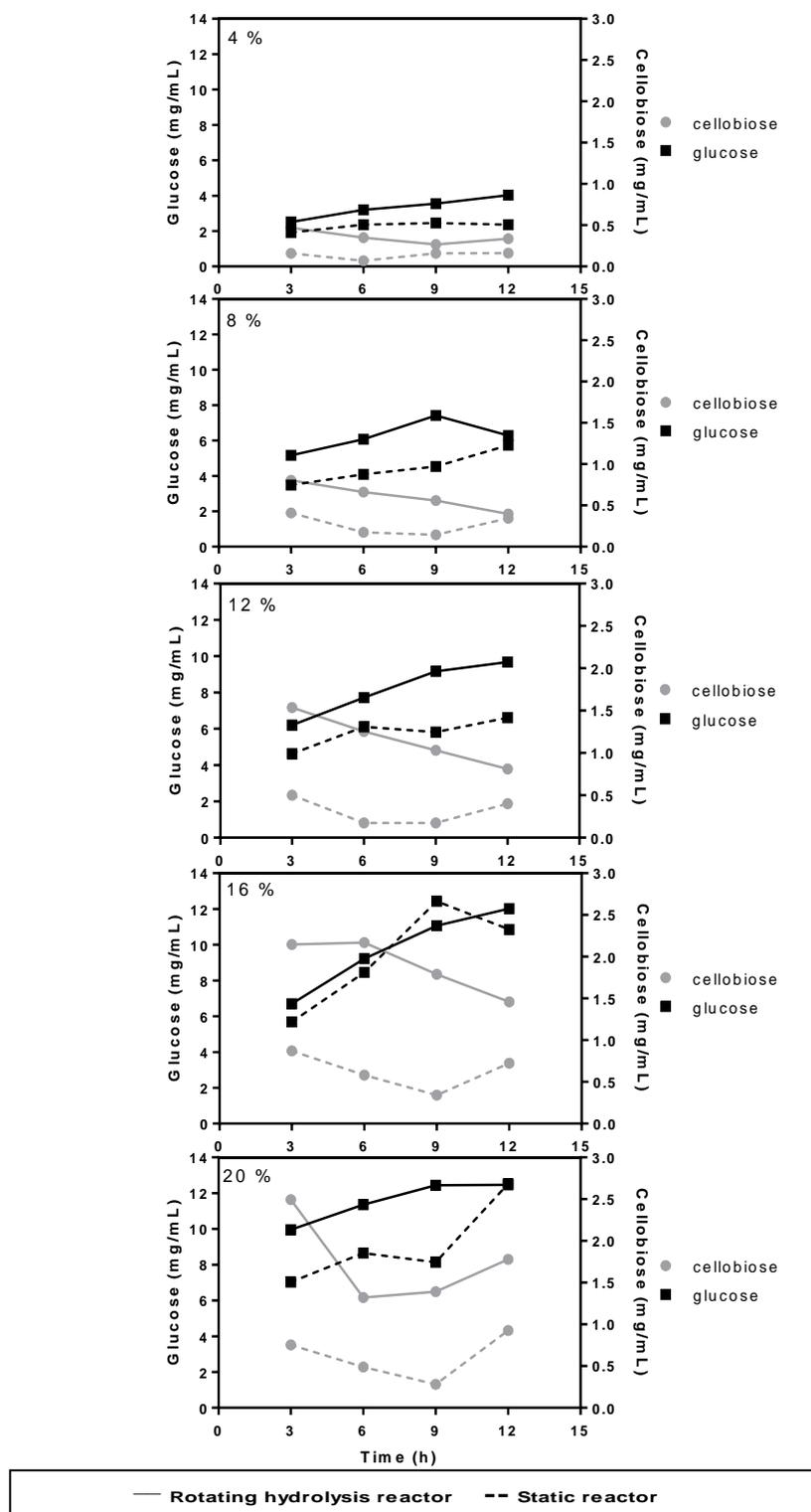


Figure 2. Release of cellobiose and glucose from the enzymatic hydrolysis of untreated elephant grass at different concentrations (4 to 20 % (w/v)) in the rotating hydrolysis reactor and the static reactor.

With respect to the hydrolysis yields (Table 4), it was found that with the use of a lower substrate concentration (4 % (w/v)) and spheres, the yield of glucose was 20.17%. As for the concentrations of 8, 12 and 16% (w/v) substrate, the yields were 15.70%, 16.15% and 15.05%, respectively, and for 20% (w/v) the yield decreased to 12.47%.

Fang et al. (2010), in studies to optimize the enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by steam explosion with the use of cellulases from a mixed culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 and *Aspergillus niger* NL02, obtained yields of 47.5%, 33% and 34.6% for the mixed culture, commercial enzyme (Celluclast®) and *T. reesei* monoculture, respectively, during microcrystalline cellulose hydrolysis. However, for the hydrolysis of corn stover pretreated by steam explosion 80.9% yield was obtained using enzymes from mixed culture. The hydrolysis conditions were 8 % (w/v) substrate, for 48 h at 50°C, pH 4.8 and 140 rpm with an enzyme dosage of 20 IU/g glucan. According to López-Linares et al. (2014), a negative correlation exists between the initial solids loading and final conversion. These authors found a yield of 75% (referring to the glucose content in the pretreated solid) at 7.5 % (w/v) solids loading, while at a solids loading of 20 % (w/v) the enzymatic hydrolysis yield decreased to 64.5%. For lignocellulosic substrates, increasing the substrate concentration leads to corresponding yield decreases (Kristensen et al., 2009).

Enzymatic hydrolysis performed at high solids loadings is advantageous in the enzymatic conversion of lignocellulosic substrates when compared with low solids loadings, including increased sugar and ethanol concentrations and decreased capital and operating costs. However, at a high solids loading, cellulose hydrolysis by endoglucanase and exoglucanase results in the formation of cellobiose and the accumulation of this final product, as well as glucose. Furthermore, the accumulation of ethanol significantly inhibits endoglucanases, cellobiohydrolases and β -glucosidases; these enzymes are inhibited above a certain glucose level (Kristensen et al., 2009).

Also the inhibition of enzyme adsorption by hydrolysis products can be the cause of decreasing yields, but the exact extent and mechanism of adsorption inhibition is still unknown (Kristensen et al., 2009).

3.4 Determination of the enzymatic stability and enzymatic adsorption by substrate

The adsorption of cellulases to the substrate may also have occurred, but not strongly when using 8 % (w/v) substrate, as most of the enzymes retained almost constant activity, except for endoglucanases, which showed a continuous loss of activity (Figure 3). The use of 20 % (w/v) substrate provided stable enzyme activity after 3 h for xylanases and after 6 h for the other enzymes, whereas at 8 % (w/v) substrate, there was a greater variation in enzymatic activity after 12 h of hydrolysis.

Data on enzyme adsorption are extremely important to have an understanding of enzymatic hydrolysis. Enzymes can bind to solid surfaces specifically or non-specifically (Palonen et al., 2004). To verify the possible adsorption of the enzyme to the substrate, SDS polyacrylamide gel electrophoresis was carried out. In proteins separated by SDS-PAGE (Supplementary data 2-A), with 8 % (w/v) substrate, multiple bands were observed, indicating the presence of different proteins. The more pronounced bands indicate proteins at the 250 and 75 kDa markers for experiments at 8 % (w/v) substrate and for experiments with 20 % (w/v) substrate. At the 25 kDa marker, the presence of bands can also be observed, but of lesser intensity. It also appears that, without the substrate, a greater number of bands at the 75 kDa marker was observed. This may be related to other enzymes, not evaluated in this work, which could have been adsorbed to the tested substrates. At 20 % (w/v) substrate, greater evidence concerning positions bands and markers 50, 37 and 25 kDa was observed.

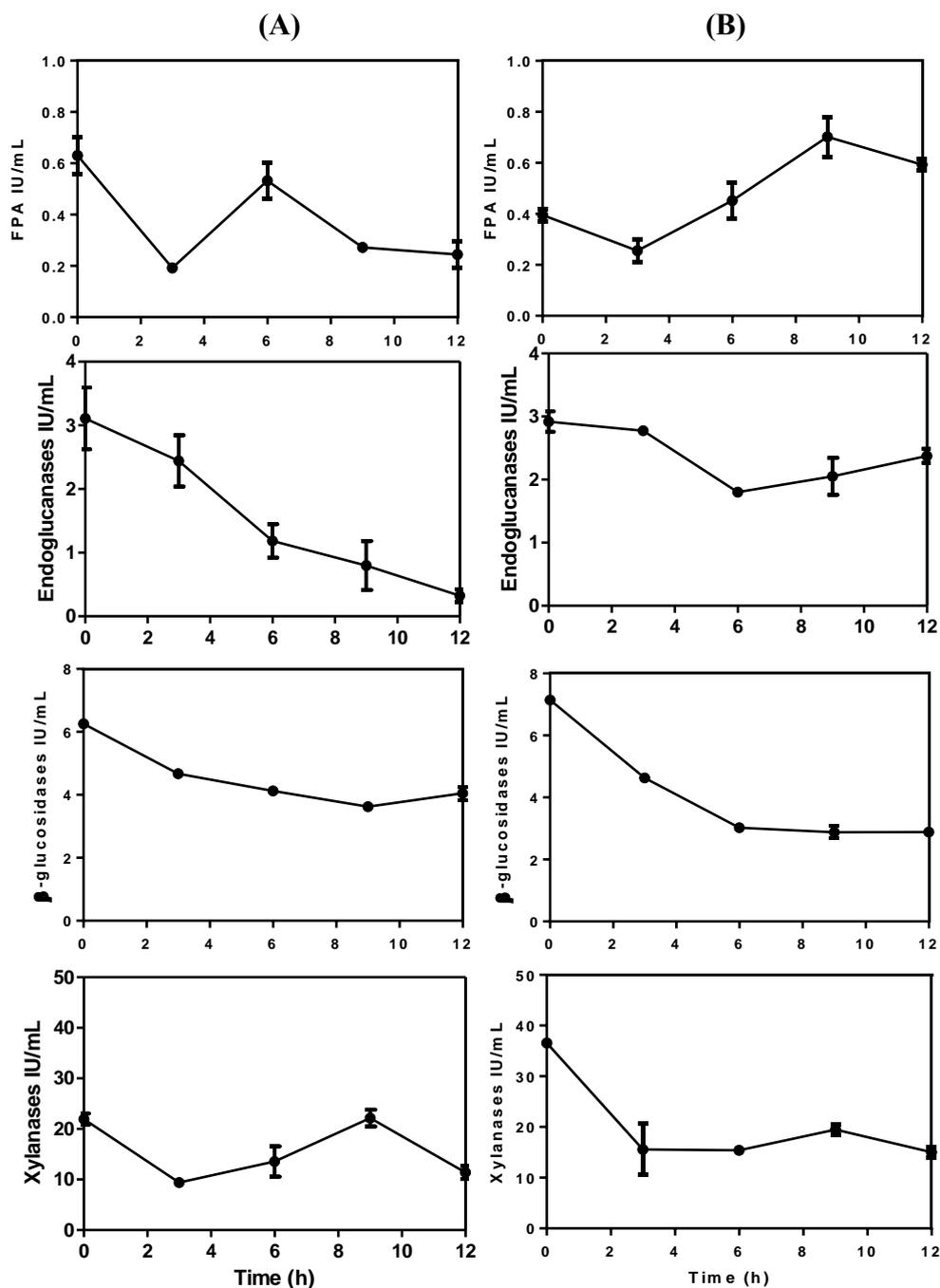


Figure 3. Evaluation of the enzymatic stability of the FPA, endoglucanases, β -glucosidases and xylanases of *Penicillium echinulatum* S1M29 after 12 h of enzymatic hydrolysis of untreated elephant grass at 50°C, pH 4.8, 150 rpm. A) 8% (w/v) substrate and B) 20% (w/v) substrate.

Supplementary data 2-B shows the zymograms for enzymatic activity. Regarding β -glucosidase activity, with 8 % (w/v) substrate, bands were observed at 250 kDa for all substrates tested and under control conditions, but at 6 h, under conditions with the substrate, this band became less clear, suggesting that this enzyme was adsorbed to the substrate or lost activity. The decrease in the intensity of the band at 250 kDa after 6 h in the presence of elephant grass substrate corroborates the fall in enzymatic activity observed up to 6 h of hydrolysis (Figure 3). With 20 % (w/v) substrate (Supplementary data 2-B), no decrease in the intensity of the band at 250 kDa was observed.

For endoglucanases with 8% (w/v) substrate, bands were present at 75 and 25 kDa. The 25 kDa band was observed after only 1 h of hydrolysis. After 6 h of hydrolysis, this was not evident in the control or experimental conditions, suggesting that this enzyme lost activity during the hydrolysis process. At 20 % (w/v) substrate (Supplementary data 2-B), the band of 25 kDa was not observed after 1 h or 6 h of the process. For the hydrolysis samples with Avicel[®] and filter paper (Supplementary data 2-B), the band at 75 kDa was less intense when compared to the other, and in the case of the filter paper, the 25 kDa band was observed after the first hour of hydrolysis, suggesting adsorption to the substrate.

Again, a significant drop in endoglucanases activity can be observed in Figure 3, related to the absence of the band of 25 kDa for the elephant grass substrate after 6 h of the process. Zampieri et al. (2013) studied the secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *P. echinulatum*, and verified the presence of a constitutive endoglucanase based on the presence of a band at 76 kDa in culture with different sources of carbon.

In the zymogram of cellobiohydrolases (exoglucanases), bands were observed at 250 and 75 kDa. The 250 kDa band can be seen in both gels and all substrates in the control without substrate, but the 75 kDa band was present only when Avicel[®] and filter paper were used, in addition to the control condition without substrate with 8 % (w/v) or 20 % (w/v) of substrate,

this being adsorbed to the other substrates tested.

For xylanases, when 8 % (w/v) substrate was used (Supplementary data 2-B), bands were identified at 75 and 20 kDa. In the control condition, three bands were identified, while for bagasse sugarcane and elephant grass, two bands were identified and with Avicel® and filter paper, only one band was observed at 75 kDa. The 20 kDa band was evident for all conditions, after 1 and 6 hours, and for filter paper, except for after 6 h of hydrolysis. With 20 % (w/v) substrate (Supplementary data 2-B), the presence of multiple bands at the 75 kDa position was observed in the control, and with no substrate a band was seen at 20 kDa. With elephant grass, the band of 20 kDa was observed after 1 h and 6 h and the presence of bands at 75 kDa was also evident, though to a lesser degree than in the control condition.

Although there are limitations to the detection of enzymatic activities using gels due to pH, the electrical current applied, interactions with reactants present in the gels and the buffers employed, it was found that most of the enzymes remained active during hydrolysis and were not adsorbed onto the substrate. Non-adsorption to the substrate provides a significant advantage regarding the efficiency of hydrolysis, since there is increased availability of enzymes to act on the cellulose fibers, providing higher yields.

Regarding the agitation applied in the experiments in the rotary hydrolyzer, 150 rpm was used. There was a decrease in enzyme activity throughout the process (Figure 3). According to Reese & Mandels (1980), enzyme stability during stirring varies depending on the cellulase source, e.g., *T. reesei* Rut C 30 cellulases were shown to be inactivated by stirring at 120 rpm, and the percentage of Avicel® hydrolysis was reduced by 50 % in a shaker with agitation compared to experiments without agitation, probably due to a shearing effect. This factor may have contributed to the declines in enzyme activity observed in this work.

3.5 Fermentation of elephant grass sugars

In Figure 4, when the substrate concentration increased to 16 % (w/v), the release of

sugars was increased (time 0) and consequently production increased. Comparing the results obtained with hydrolysates from the RHR with those obtained in the SR, it can clearly be observed that ethanol production was higher when the RHR was used to carry out enzymatic hydrolysis. This conversion may have achieved higher levels if cellobiase supplementation had been performed, since in the RHR the concentration of cellobiose was higher than that obtained in the SR. This indicates that, with a greater concentration of cellobiose, β -glucosidases are inhibited by the product of enzymatic hydrolysis and/or partially lose their activity.

Another situation that must be taken into consideration is that, after 12 h of fermentation, the same level of ethanol production was achieved as after 48 h for most conditions. For 20 % (w/v) substrate, the production ethanol was delayed. The highest productivity in ethanol (0.5 g/L/h) was achieved when 16 % (w/v) substrate was used to carry out enzymatic hydrolysis in the RHR. Although the concentration of glucose did not differ much between the RHR and the SR, the highest production of ethanol from sugars obtained in the RHR may have been due to the conversion of cellobiose (present in higher quantities in samples from the RHR) into glucose by β -glucosidases during the fermentation process, even at 28°C, which is not a favorable temperature for enzymatic hydrolysis, since these enzymes are not inactivated before the fermentation process (Figure 4). Narra et al. (2015) obtained their maximum ethanol yield from pretreated rice straw (23.23 g/L), pretreated wheat straw (18.29 g/L) and pretreated sugarcane bagasse (17.91 g/L) after 60 h with 10% solids using a simultaneous saccharification and fermentation process. Pessani et al. (2011) obtained their highest ethanol concentration of 22.5 g/L after 168 h with a simultaneous saccharification and fermentation process at 45 °C, using 8% pretreated switchgrass. In this study, 6.1 g/L ethanol was produced under the best conditions, with 16 % (w/v) substrate after 12 h of the process, using untreated elephant grass.

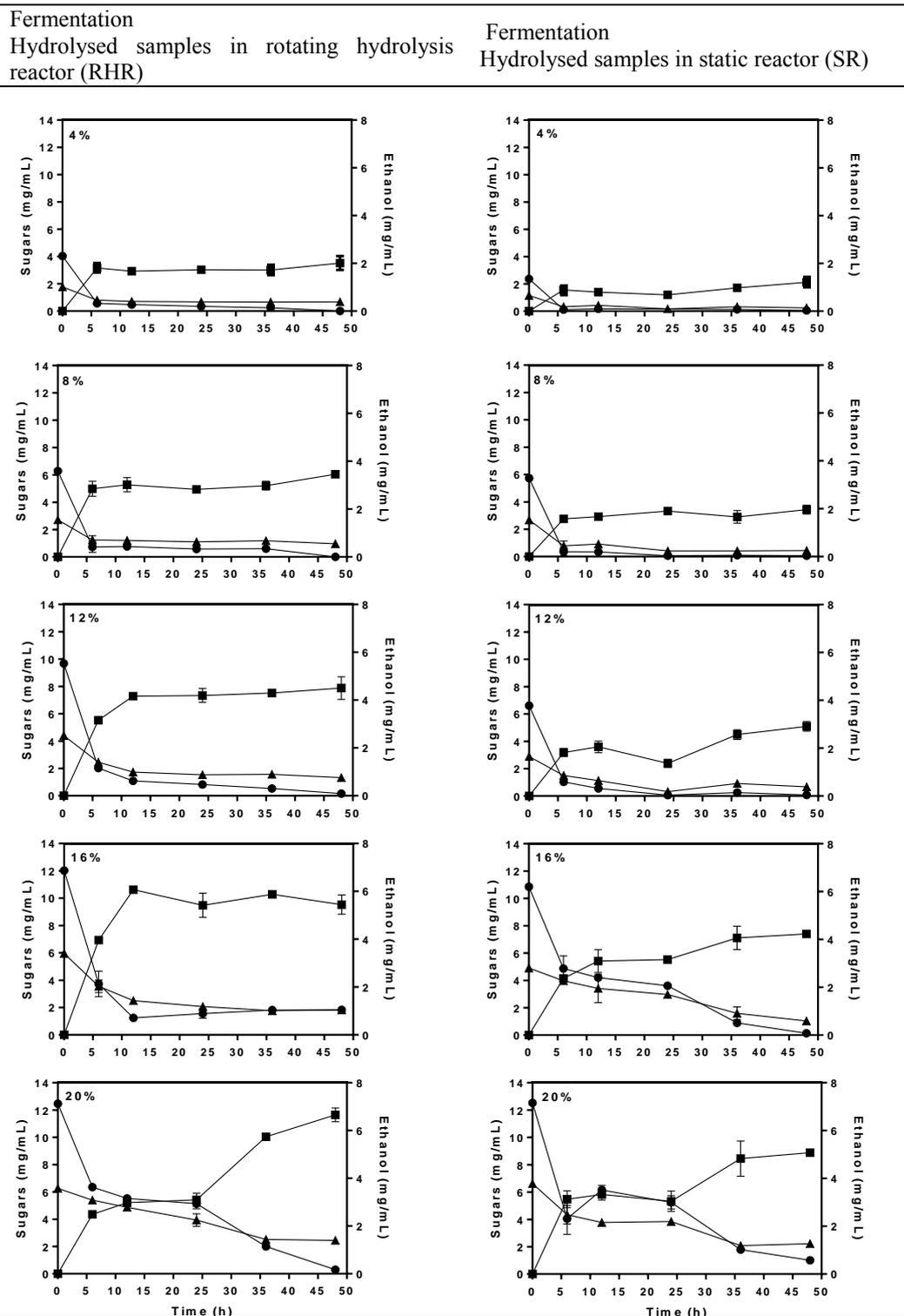


Figure 4. Concentration of xylose, glucose consumption and ethanol production during fermentation of untreated elephant grass hydrolysates in the rotating hydrolysis reactor and the static reactor using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Glucose (●), xylose (▲) and ethanol (■).

In Table 4, the evaluated parameters are shown for hydrolysis and fermentation in both the RHR and the SR. In the RHR, higher glucose concentrations were obtained with 16 and 20 % (w/v) biomass, although the highest concentration of ethanol was found at 16% (w/v) substrate. Regarding the volumetric productivity, higher values were obtained with 16 % (w/v) substrate for both glucose and ethanol. Considering the yields of glucose, the concentration of 4 % (w/v) biomass was more favorable, considering the higher yield at this concentration, as it can be seen that the glucose concentration did not increase proportionally with increasing substrate concentration. For ethanol, the highest concentration was observed when 16 % (w/v) substrate was employed, considering 12 h of fermentation (Table 4), but the highest ethanol yield was obtained at 4 % (w/v) substrate.

In the SR, the glucose and ethanol concentrations were lower than those observed in the RHR; the ethanol concentration was halved under most of the conditions tested. It was observed that even at 20 % (w/v) substrate, parameters assessed in the SR and the RHR were nearly equal, suggesting once again that the mixture at 20 % (w/v) of substrate was not efficient even in the RHR.

C4 grasses such as elephant grass exhibit higher photosynthetic efficiency, and are therefore more productive in terms of dry matter (Euclides et al., 2008). The development of an integrated process that combines an optimized pre-treatment, enzymatic saccharification and fermentation is of great interest for efficient ethanol production, and this work describes an integrative process to produce ethanol from elephant grass. These results indicate that the process still needs improvement, but new equipment can be used to produce twice as much ethanol. However, it is noteworthy that the values are still low compared with what is needed to make sustainable production of ethanol from elephant grass. Optimizations are still needed, and control parameters such as temperature, enzyme load, and buffers, as well as the use of pre-treated biomass, may be alternatives for increasing the yields obtained.

Table 4. Evaluation of glucose and ethanol yields and productivities obtained from the hydrolysis of untreated elephant grass in the rotating hydrolysis reactor and static reactor, and fermentation of the glucose released in the rotating hydrolysis reactor and the static reactor.

Rotating hydrolysis reactor					
Substrate Concentration (%)	Glucose Concentration (g/L)	Glucose Yield (%)	Productivity (g/L/h)	Yield (mg biomass)	glucose/g
4	4.03	20.17	0.34	80.60	
8	6.27	15.70	0.52	62.70	
12	9.68	16.15	0.80	64.53	
16	12.03	15.05	1.00	60.15	
20	12.47	12.47	1.04	49.84	
Substrate Concentration (%)	Ethanol Concentration (g/L)	Ethanol Yield (%)	Productivity (g/L/h)	Yield (mL biomass)	ethanol/g
4	1.6	22.61	0.13	2.89	
8	3.2	11.30	0.26	2.89	
12	4.2	6.59	0.35	2.53	
16	6.1	5.39	0.50	2.76	
20	3.0	1.69	0.25	1.08	
Static reactor					
Substrate Concentration (%)	Glucose Concentration (g/L)	Glucose Yield (%)	Productivity (g/L/h)	Yield (mg biomass)	glucose/g
4	2.36	11.83	0.20	47.28	
8	5.73	14.33	0.48	57.29	
12	6.61	11.02	0.55	44.06	
16	10.85	13.58	0.90	54.27	
20	12.52	12.53	1.04	50.08	
Substrate Concentration (%)	Ethanol Concentration (g/L)	Ethanol Yield (%)	Productivity (g/L/h)	Yield (mL biomass)	ethanol/g
4	0.8	11.25	0.07	1.44	
8	1.7	5.90	0.14	1.51	
12	2.0	3.22	0.17	1.24	
16	3.1	2.73	0.26	1.40	
20	3.2	1.79	0.26	1.15	

All calculations were based on a process time of 12 h.

Conclusions

Higher yields in the production of ethanol from sugars released from elephant grass were obtained when a rotary hydrolyzer was employed to carry out enzymatic hydrolysis, although this did not provide a higher glucose concentration compared to the SR. These data indicate that there were changes in the structure of the biomass which enabled a higher yield of ethanol. These increases demonstrate that not only do the biomass, enzymes and fermentation need to be worked out to obtain higher concentrations of ethanol, it is also necessary to develop equipment for such a purpose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

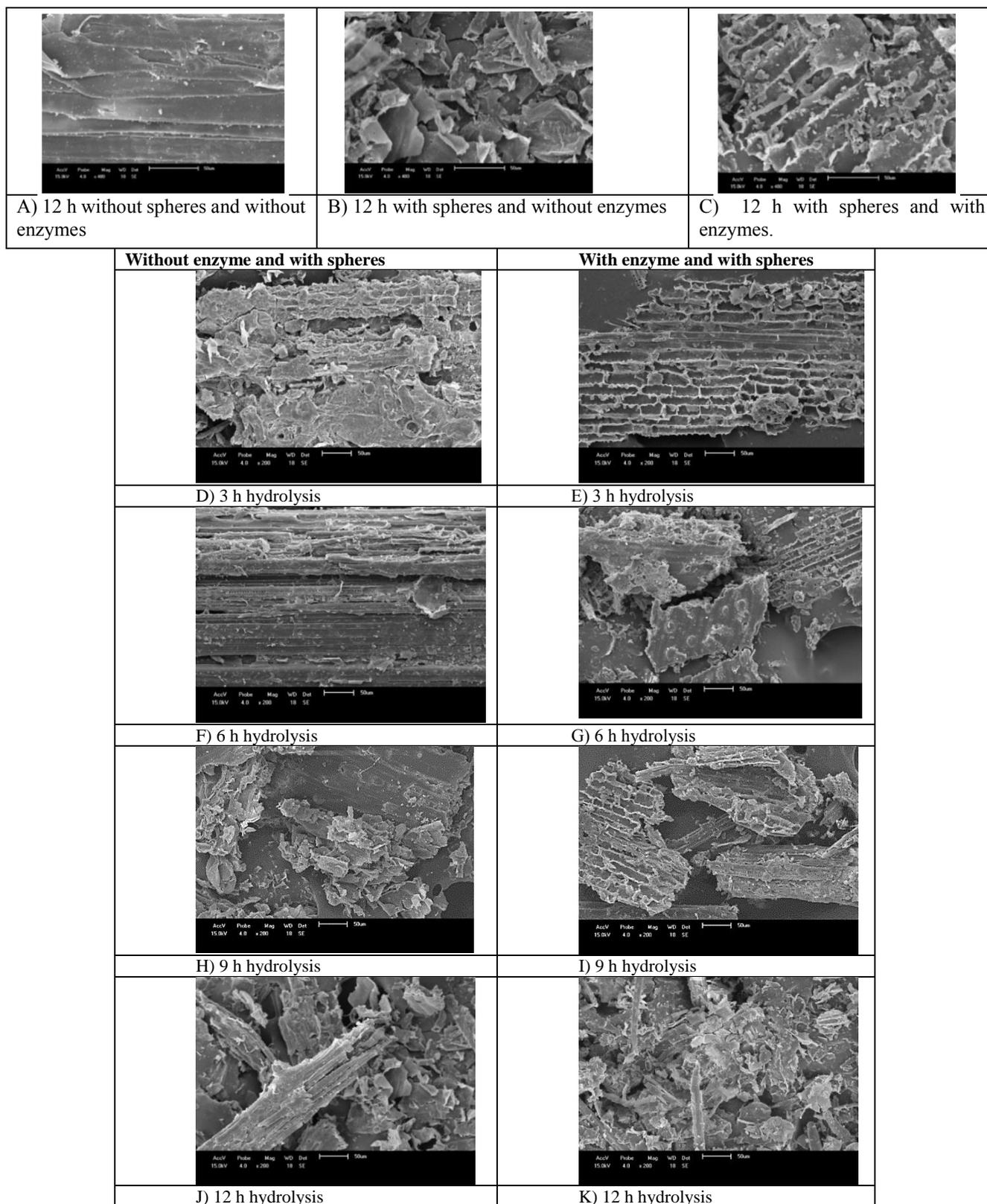
The authors are grateful for the financial and technical support from UCS, CAPES (scholarship), CNPq (310590/2009-4 and 310255/2012-0) and FAPERGS (10/1972-5).

References

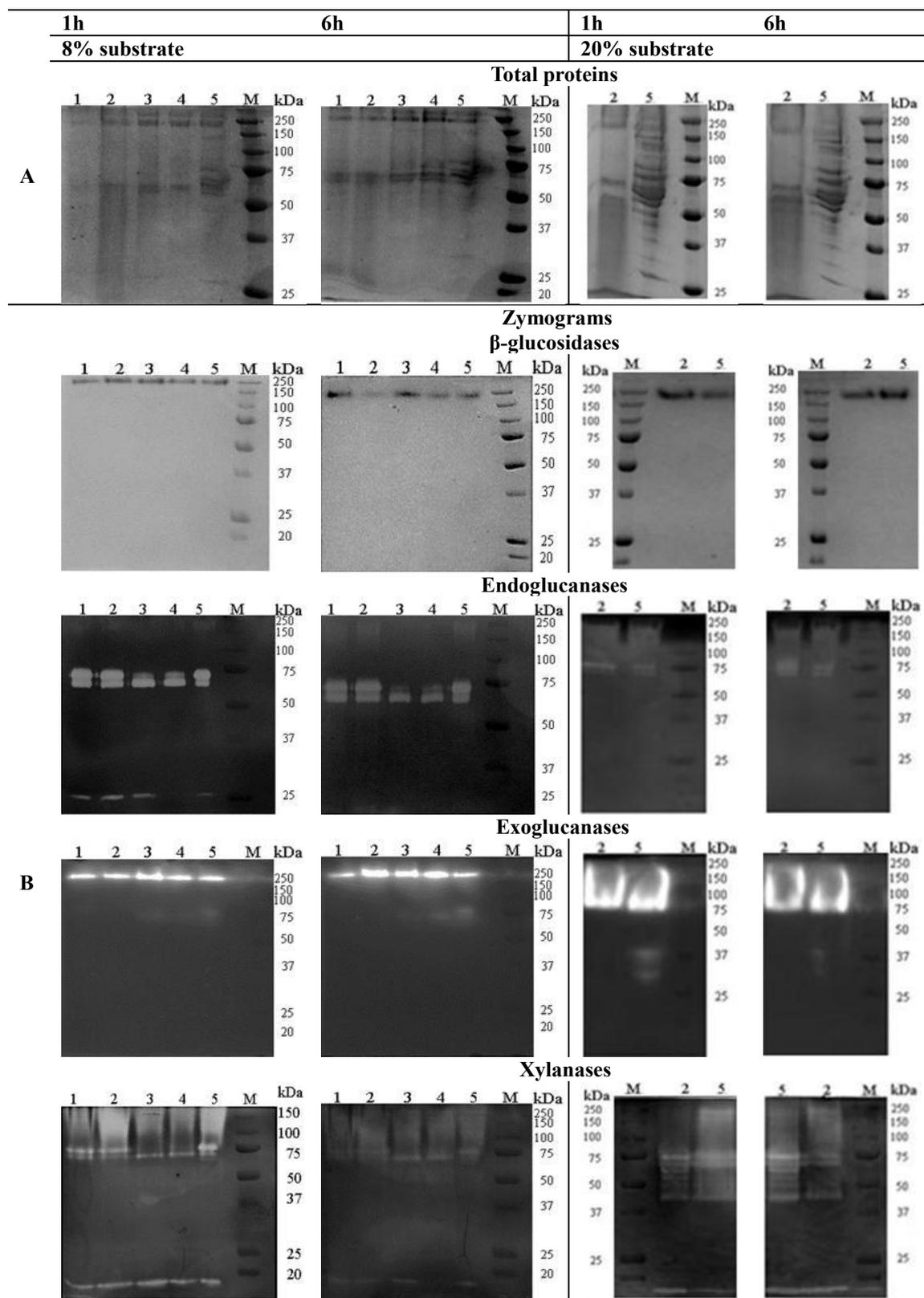
1. Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675-685.
2. Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.*, 23, 257-270.
3. Bayrakci, A.G., Koçar, G. 2014. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 30, 306-316.
4. Camassola, M., Dillon, A.J. 2010. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1889-1900.
5. da Silva, A.S.A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., Bon, E.P.S. 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 7402-7409.

6. Daroit, D.J., Simonetti, A., Hertz, P.F., Brandelli, A. 2008. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from *Monascus purpureus*. J. Microbiol. Biotechnol. 18, 933-941.
7. Dillon, A.J., Bettio, M., Pozzan, F.G., Andrighetti, T., Camassola, M. 2011. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. J. Appl. Microbiol. 111, 48-53.
8. dos Reis, L., Fontana, R.C., Delabona Pda, S., da Silva Lima, D.J., Camassola, M., Pradella, J.G., Dillon, A.J. 2013. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. Bioresour. Technol., 146, 597-603.
9. Euclides, V.P.B., Macedo, M.C.M., Valle, C.B.D., Barbosa, R.A., Gonçalves, W.V. 2008. Forage yield and sward structure characteristics of *Brachiaria brizantha* cultivars under grazing. Pesq. Agrop. Brasil. 43, 1805-1812.
10. Fang, H., Zhao, C., Song, X.Y. 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. Bioresour. Technol. 101, 4111-4119.
11. Gan, Q., Allen, S.J., Taylor, G. 2002. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. Biochem. Eng. J. 12, 223-229.
12. Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59, 257-268.
13. Kristensen, J., Felby, C., Jorgensen, H. 2009. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Biotechnol. Biofuels 2, 11.
14. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
15. Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 627-642.
16. Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S. 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 360-369.
17. López-Linares, J.C., Romero, I., Cara, C., Ruiz, E., Moya, M., Castro, E. 2014. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. Fuel 122, 112-118.
18. Menegol, D., Scholl, A.L., Claudete Fontana, R., Pinheiro Dillon, A.J., Camassola, M. 2014a. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. Fuel 133, 232-240.
19. Menegol, D., Scholl, A.L., Fontana, R.C., Dillon, A.J.P., Camassola, M. 2014b. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. Energ. Conv. Manag. 88, 1252-1256.
20. Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. Bioresour. Technol. 96, 1986-1993.
21. Narra, M., James, J.P., Balasubramanian, V. 2015. Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. for ethanol production. Bioresour. Technol. 179, 331-338.
22. Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M. 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. J. Biotechnol. 107, 65-72.

23. Pessani, N.K., Atiyeh, H.K., Wilkins, M.R., Bellmer, D.D., Banat, I.M. 2011. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. *Bioresour. Technol.* 102, 10618-10624.
24. Pothiraj, C., Kanmani, P., Balaji, P. 2006. Bioconversion of Lignocellulose Materials *Mycobiol.* 34, 159-165.
25. Pu, Y., Jiang, N., Ragauskas, A.J. 2007. Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. *J. Wood Chem. Technol.* 27, 23-33.
26. Ramachandriya, K.D., Wilkins, M., Atiyeh, H.K., Dunford, N.T., Hiziroglu, S. 2013. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. *Bioresour. Technol.* 147, 168-176.
27. Reese, E.T., Mandels, M. 1980. Stability of the Cellulase of *Trichoderma reesei* under use conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 323-335.
28. Resch, M.G., Donohoe, B.S., Baker, J.O., Decker, S.R., Bayer, E.A., Beckham, G.T., Himmel, M.E. 2013. Fungal cellulases and complexed cellulosomal enzymes exhibit synergistic mechanisms in cellulose deconstruction. *Energ. Environ. Science* 6, 1858-1867.
29. Schneider, W.D., dos Reis, L., Camassola, M., Dillon, A.J. 2014. Morphogenesis and Production of Enzymes by *Penicillium echinulatum* in Response to Different Carbon Sources. *Biomed. Res. Int.* 25, 48-63.
30. Scholl, A.L., Menegol, D., Pitarelo, A.P., Fontana, R.C., Filho, A.Z., Ramos, L.P., Dillon, A.J.P., Camassola, M. 2015. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. *Bioresour. Technol.* 192, 228-237.
31. Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83(1), 1-11.
32. Szczerbowski, D., Pitarelo, A.P., Zandoná Filho, A., Ramos, L.P. 2014. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. *Carbohydr. Polym.* 114, 95-101.
33. Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270-5295.
34. Zampieri, D., Guerra, L., Camassola, M., Dillon, A.J.P. 2013. Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. *Ind. Crops Prod.* 50, 882-886.



Supplementary data 1. Scanning electron microscopy images of elephant grass samples subjected to different hydrolysis processes (with or without spheres or/and enzymes) for different periods of time in the rotating hydrolysis reactor. The micrographs in A to C are at 400× magnification, and from D to K the magnification is 1000×.



Supplementary data 2. Evaluation of total proteins and zymogram of β -glucosidases, endoglucanases, exoglucanases and xylanases after 1 and 6 h of hydrolysis using 8 and 20 % (w/v) substrate. 1 - sugar cane bagasse, 2 - elephant grass, 3 - Avicel[®], 4 - filter paper Whatman n.1 and 5 - control (enzyme + buffer).

Comparison of the enzymatic hydrolysis of different elephant grass accessions under optimized conditions in a rotating hydrolysis reactor followed by alcoholic fermentation

Daiane Menegol^a, Juarez Campolina Machado^b, Ricardo Augusto Diniz Cabral Ferreira^b, Francisco José da Silva Léo^b, Roselei Claudete Fontana^a, Aldo José Pinheiro Dillon^a and Marli Camassola^{a*}

^a Universidade de Caxias do Sul – Laboratório de Enzimas e Biomassas

Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

Phone/fax: 55 54 3218 2149

^b Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, 36038-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

Tel.: +55 32 3311 7509.

*Corresponding author

e-mail: mcamassola@gmail.com

Abstract

Elephant grass is of African origin but has been introduced to all tropical areas of the world, adapting to different soil types and climates. Elephant grass can be used for ethanol production, having a high biomass production of about 45 t/ha/year of dry matter and different accessions of *Pennisetum purpureum* can provide high ethanol production. Here, it was optimised the elephant grass hydrolysis conditions using the Cameroon accession, including the choice of the commercial enzyme (Celluclast[®], Cellic CTec2[®] and Cellic HTec2[®]), hydrolysis time (4–12 h), and enzymatic loading (10–50 FPU/g). Next, it was tested the following accessions: Cubano de Pinda, Taiwan A-146, Elefante Cachoeiro Itapemirim, CPAC and CAC-262. It was found that the Taiwan A-146 accession released most glucose release of 30.83 g/L and subsequently produced a greater quantity of ethanol 13.86±0.93 g/L. Based on our findings, elephant grass has high potential as a non-food fermentable sugars source.

Keywords: *Pennisetum purpureum*; second-generation ethanol; biorefineries; renewable resource

1 INTRODUCTION

Energy consumption has been steadily increasing. Oil has remained the principal resource to meet this demand, together with increasing use of petroleum products, such as gasoline. The amount of greenhouse gases released into the atmosphere has also displayed an upward trend [1-3]. Interest in renewable resources has been growing, in this sense, lignocellulosic biomass is an abundant source that can be converted into useful materials and energy [4, 5]. Moreover, the chemical properties of the components of lignocelluloses make them a substrate of enormous biotechnological value [6].

Lignocellulosic biomass is majority composed of holocellulose (cellulose and hemicellulose) and lignin [7]. The conversion of lignocellulose requires a mixture of enzymes, including cellulases and hemicellulases [8, 9]. The biological conversion of lignocellulosic materials into ethanol offers numerous benefits, but its development is hampered by its high cost and technical difficulties [10]. The biotransformation of lignocellulose is based on the enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose followed by fermentation to ethanol [11]. Lignocellulolytic enzymes also have significant potential applications in various industries, including the production of chemicals, fuel, food, beer and wine, animal feed, textiles, laundry, pulp and paper, and agriculture [12].

Elephant grass is a tropical species with a C₄ metabolism. Elephant grass has a higher productivity than most species, producing ~45 t/ha/year of dry matter. The production of sugar cane and corn is about 21 tonnes (sugar and bagasse) and 13 tonnes (grain and stover), respectively [13]. Furthermore, perennial grasses, such as elephant grass, are considered a rich source of lignocellulosic biomass and, thus, are attractive alternative energy sources [14].

Elephant grass is an attractive biomass source for second-generation ethanol production [15, 16]. The release of fermentable sugars from elephant grass has been described [17, 18].

In addition to the cost of producing the raw material, the pretreatment and hydrolysis steps are major contributors to the total production cost of ethanol from biomass. This work

aimed to enzymatically hydrolyzing different accessions of elephant grass in a rotary hydrolysis reactor using commercial enzymes in order to identify the accessions capable of providing the highest releases of reducing sugars when subjected to hydrolysis.

Experimental section

2.1. Microorganism

The *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1 was used for glucose fermentation. This strain was kindly provided by Dr. Luiz Humberto Gomes of Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), University of São Paulo, Piracicaba, SP. The strain was grown in YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar) medium for up to 2 days at 28°C, and then stored at 4°C until use.

2.2 Substrate

Five elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions (Cubano de Pinda, Taiwan A-146, Elefante Cachoeiro Itapemirim, CPAC and CAC-262) from the Active Elephant Grass Germplasm Bank of Embrapa (BAGCE) was evaluated. The BAGCE is located in the Embrapa Dairy Cattle Research Center experimental field, in the city of Coronel Pacheco, MG, Brazil (21°33'18"s, 43°15'51"W, at 417 m). The samples were collected following the method of Basso et al. (2014) [19]. As a control sample, it was also collected the Cameroon accession from the city of Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brazil. The Cameroon accession is a suitable control sample because it has been well-tested for its ethanol production potential [18, 20]. The plants cutting were carried out 180 days after planting. After cutting, samples were dried at 60°C under air flow for 72 h and then milled (between 0.075 and 4.75 mm - for samples submitted to rotating hydrolysis reactor - RHR). After milling, the samples were hydrolyzed.

The chemical composition of the Cameroon accession was 9.77±1.07% extractables, 33.28±1.83% cellulose, 20.91±0.56% hemicellulose, 4.6±0.47% soluble lignin, 21.36±2.52%

insoluble lignin, $9.36 \pm 0.23\%$ ash, and 5.55% protein.

2.3 Chemical analysis of the cellulosic substrates

The chemical composition of the samples was determined according to the methodology proposed by the National Renewable Energy Laboratory (NREL-TP-510-42618, NREL-TP-510-42619, NREL-TP-510-42621).

2.4 Enzymatic hydrolysis

Hydrolysis reactions were carried out in a rotating hydrolysis reactor (RHR) with a 2.5 L capacity (Patent No. BR 102015016795-4). This equipment performs simultaneous physical pretreatment (milling) and hydrolysis of biomass, containing spheres which assist in the disintegration of biomass. Initially, the Cameroon accession was used to define the experimental conditions. Commercial enzymes (Celluclast[®] 1.5 L, Cellic CTec2[®] and Cellic HTec2[®]) were kindly provided by Novozymes[®], Araucária, Paraná, Brazil. The final substrate concentration was 16% (w/v), as previously optimized [18], and different enzyme loadings (10-50 FPU/g) and hydrolysis times (4-12 h) were tested. The BAGGE accessions were then submitted to hydrolysis using a single commercial enzyme, hydrolysis time and enzyme loading.

2.5 Factorial design 2²

Statistica 8.0 and a rotatable central composite design (Table 1) was used to identify the best condition for elephant grass enzymatic hydrolysis. For this, it was used the Cellic CTec2[®] enzyme and the Cameroon accession (16% [w/v]) and altered the hydrolysis time (T) and enzyme loading, according to previously study.

Table 1. Factorial design 2² for choosing the most suitable elephant grass (accession Cameroon) enzymatic hydrolysis conditions.

	Code	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Time (h)	X ₁	4	5.17	8	10.83	12
Enzyme loading (FPU/g)	X ₂	10	15.81	30	44.18	50

2.6 Analysis of sugars and acetic acid

Samples submitted to RHR were analyzed by HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Samples were filtered through a 0.20 μm nylon membrane and analyzed using an LC-20AD Shimadzu chromatography system, with a DGU-14A mobile phase degasser, CTO-20A column oven and RID-10A detector for the refractive index, as well as an SPD-20A photodiode array detector for ultraviolet spectrophotometry. The analysis was performed on an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad[®]) at 60°C, preceded by Cation-H pre-column and eluted with 5 mmol/L H₂SO₄ mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min.

Quantification was affected by external standardization, based on calibration curves for each monitored component (i.e., cellobiose, glucose, xylose, arabinose, and acetic acid). The percentage conversion obtained after the enzymatic hydrolysis of glucan was calculated as described by Menegol et al. (2016) [18].

2.7 Alcoholic fermentation

The alcoholic fermentation of sugars released from elephant grass accessions was done using *S. cerevisiae* CAT-1 at a concentration of 10⁸ viable cells/mL for 48 h. Ethanol production was performed by a saccharification and fermentation process (enzymatic hydrolysis and fermentation carried out separately).

The experiments were performed in 15 mL tubes containing 13 mL of elephant grass suspension, supplemented to obtain a final concentration of 4 mg/mL of Prodex[®] (crude yeast extract) and 1 mg/mL of (NH₄)₂SO₄. Fermentation was done at 28°C under static conditions.

Glucose consumption and ethanol production were monitored by HPLC using an Aminex HPX-87H column and refractive index detector at 60°C, with 5 mmol/L H₂SO₄ (mobile phase) and a flow rate of 0.6 mL/min. The theoretical yield of ethanol was calculated according to Menegol et al. (2016) [18].

2.8 Statistical tests

Fermentation data were analysed using PrismGraphPad 5.0, using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test, with $p < 0.05$. Statistica 8.0 was used for the experimental design, using ANOVA with $p < 0.05$ as the threshold for significance. The student's t-test was used when needed.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Enzymatic hydrolysis of elephant grass – Cameroon accession, in RHR (Rotating Hydrolysis Reactor) using commercial enzymes

Figure 1 shows the cellobiose, glucose and xylose concentrations after enzymatic hydrolysis of elephant grass. It was found an accumulation (6.57 g/L) of cellobiose during the first 12 h of hydrolysis by Cellic HTec2[®], after which these values decreased to 2.57 g/L by 72 h of hydrolysis. When using Celluclast[®] and Cellic CTec2[®], lower cellobiose values were observed during the initial hydrolysis (less than 1.30 g/L).

According to Novozymes technical data (2010) [21], Cellic Htec2[®] is an efficient enzymatic complex for the degradation of the hemicellulosic fraction. Whereas Cellic CTec2[®] (which includes many β -glucosidases) is principally for cellulose degradation and is, thus, unlikely to accumulate high concentrations of cellobiose during the hydrolysis. The addition of β -glucosidases increases the efficiency of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates [4] and the accumulation of end products, such as cellobiose, can affect the hydrolysis yield [22]. According to Taherzadeh and Karimi (2007) [23], enzymatic activity can reduce up to 60% when the concentration of cellobiose reaches 6 g/L.

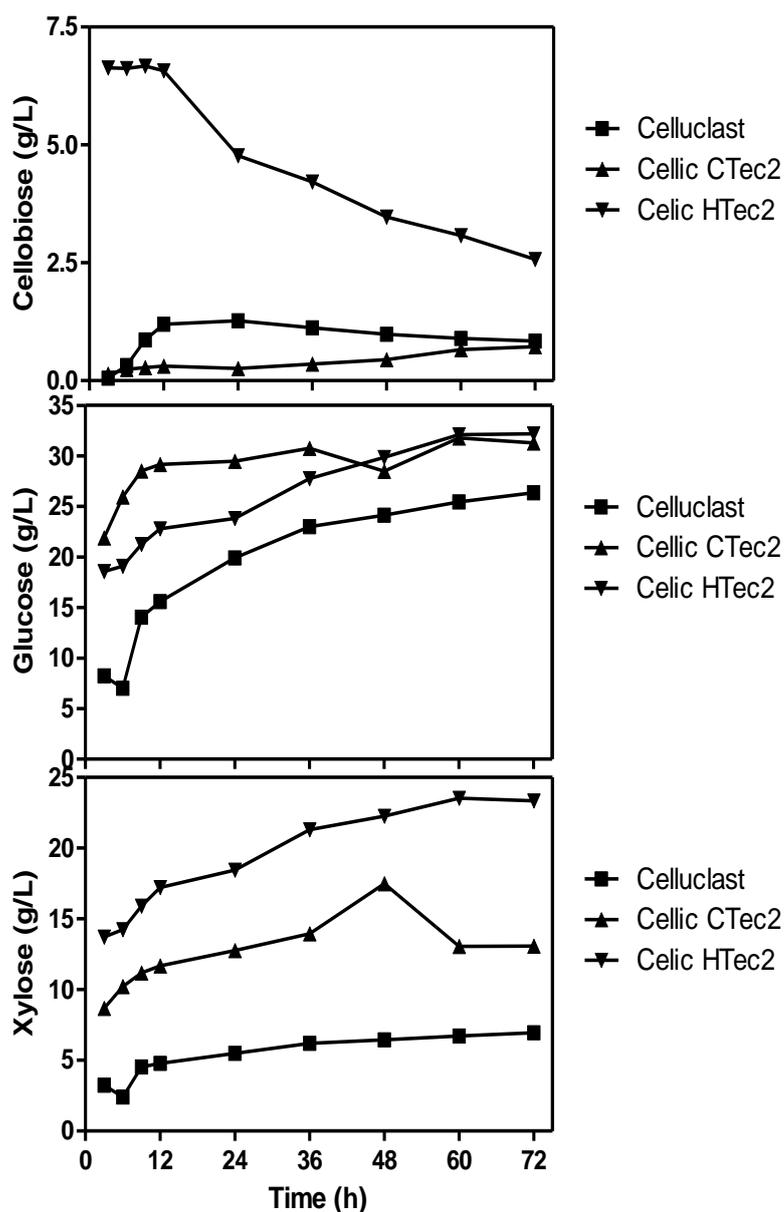


Figure 1. Cellobiose, glucose and xylose concentrations (released) during 72 h of enzymatic hydrolysis of elephant grass (Cameroon, 16% [w/v]) in a rotating hydrolysis reactor using commercial enzymes (30 FPU/g of substrate).

Similar glucose yields were achieved by Cellic HTec2[®] and Celic CTec2[®] after 72 h of hydrolysis (32.19 and 31.29 g/L respectively). When using Celluclast[®], glucose yield was lower (26.32 g/L). The initial rate of glucose release was higher when using Cellic CTec2[®] than with the other enzymes (Fig. 1). According to Phitsuwan et al. (2016) [24], this effect is directly related to the high availability of the cellulose surface area. The crystallinity of cellulose also has an impact on enzymatic hydrolysis. The rapid initial rate of hydrolysis with Cellic CTec2[®]

may be due to the preferential hydrolysis of the amorphous region of the cellulose. When the enzyme encounters crystalline regions, the hydrolysis rate decreases [25]. This is due to the strong interaction between cellulose chains via inter- and intra-hydrogen bonds that limit the accessibility of enzymes [23].

Phitsuwan et al. (2016) [23], in hydrolysis of elephant grass (5% [w/v]) by Cellic CTec2[®] (15 FPU/g) plus Cellic HTec2[®] (100 XU/g) for 72 h, obtained 4.1 g/L of glucose for the untreated fibres, reaching a maximum glucan conversion of 27.7%. The conversion rate reported in our study is higher than that of Phitsuwan et al. (2016) [24], reaching 42.3% (Table 3). This increased conversion can be explained by the use of a higher concentration of substrate and enzymes, as well as the use of spheres in the RHR hydrolysis, which promotes morphological changes in the biomass [18].

The concentration of xylose released was higher when Cellic HTec2[®] was used (13.72 g/L [after 3 h] and 23.34 g/L [after 72 h]). Cellic HTec2[®] is better at degrading the hemicellulosic fraction. According to Novozymes, Cellic HTec2[®] includes endoxylanases with specificity for hemicellulose. In addition, this enzyme can improve cellulose hydrolysis when combined with Cellic CTec2[®].

Commercial enzymes are composed of mixtures of several enzymes, which can achieve higher yields of sugars than single enzymes [26]. According to Ramos et al. (2015) [27], Cellic CTec2[®] is advantageous because it returns higher conversion levels over shorter reaction times compared to other enzymes.

3.2 Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* from sugars released during hydrolysis of elephant grass

After hydrolysis, the released sugars were fermented (Fig. 2). It was found that sugar consumption during fermentation was fastest when the Celluclast[®] enzyme had been used for hydrolysis (3.61±1.22 g/L in 6 h). The maximum ethanol production achieved was in 48 h

(9.18 ± 0.35 g/L) using Celluclast[®] for the hydrolysis.

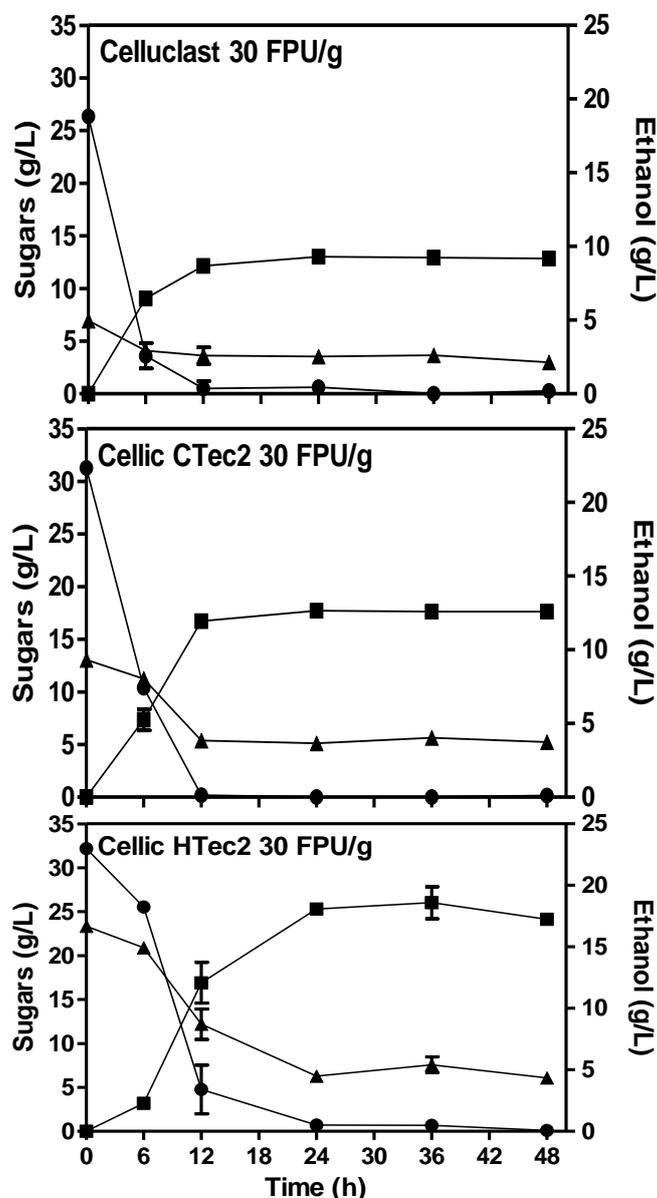


Figure 2. Xylose concentration, glucose consumption and ethanol production during fermentation of elephant grass (Cameroon) hydrolysates using *Saccharomyces cerevisiae*. Glucose (●), xylose (▲) and ethanol (■).

When Cellic CTec2[®] was used, the maximum ethanol concentration was 12.58 ± 0.13 g/L after 48 h of fermentation and glucose consumption was 10.39 ± 0.28 g/L after 6 h of fermentation. When Cellic HTec2[®] was used, higher ethanol yields were observed after 36 h of fermentation (18.59 ± 1.30 g/L) and glucose consumption was reduced to just 6.65 g/L (Fig. 2).

It was found that Cellic CTec2[®] produced high glucose yields after 60 h of hydrolysis

(39.75%). However, because most glucose had been released within the first 12 h of hydrolysis, the highest productivity was after 12 h (2.43 g/L/h) (Table 2). A similar trend was observed for ethanol production (Table 2). Menegol et al. (2016) [18] achieved an ethanol productivity of 0.5 g/L/h using 16% (w/v) elephant grass, 12 h of fermentation and enzymes from *Penicillium echinulatum* (10 FPU/g of elephant grass).

Here, it was used an industrial *S. cerevisiae* yeast for fermentation. However, this strain does not metabolize xylose, the second most abundant sugar in lignocellulosic hydrolysates [28]. Thus, if there were the conversion of pentoses by the yeast, the ethanol yield could have been increased.

Table 2. Evaluation of glucose and ethanol yields and productivities obtained from the hydrolysis of elephant grass (Cameroon) in a rotating hydrolysis reactor using Cellic CTec2 and fermentation of the glucose released, using *Saccharomyces cerevisiae*.

Time (h)	Glucose concentration (g/L)	Glucose yield (%)	Productivity (g/L/h)
12	29.16	39.42	2.43
24	29.48	39.86	1.23
36	30.75	41.58	0.85
48	28.47	38.49	0.59
60	31.78	42.97	0.53
72	31.29	42.30	0.43

Time (h)	Ethanol concentration (g/L)	Ethanol yield (%)	Productivity (g/L/h)
12	11.95	31.66	1.00
24	12.66	33.55	0.53
36	12.60	33.37	0.35
48	12.59	33.33	0.26

3.3 Rotational Central Compound Design (CCRD) to optimizing elephant grass hydrolysis

It was used a rotational compound central design (CCRD) to optimize the enzymatic hydrolysis of the Cameroon accession (16% [w/v]) and Cellic CTec2[®] (30 FPU/g of substrate).

It was found that, when the enzyme concentrations were below 30 FPU/g of substrate, glucose release was reduced (Table 3). For example, experiment seven (10 FPU/g, 8 h) produced the least glucose (15.36 g/L). According to Gregg and Saddler (1996) [29], the increase in the enzymatic load allows a reduction of the hydrolysis time, suggesting additions above 25 FPU/g of substrate. Thus, high concentrations of enzymes are required to achieve high conversion of cellulose into glucose [30]. Experiment four (44.18 FPU/g, 10.83 h) and eight (50 FPU/g, 8 h) (Table 3).

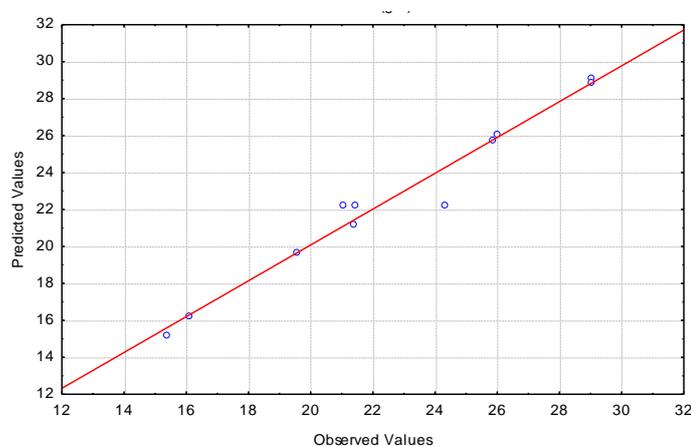


Figure 3. Correlation between observed and predict glucose concentrations (g/L) from elephant grass hydrolysis using Cellic CTec2 ($r^2 = 0.9698$).

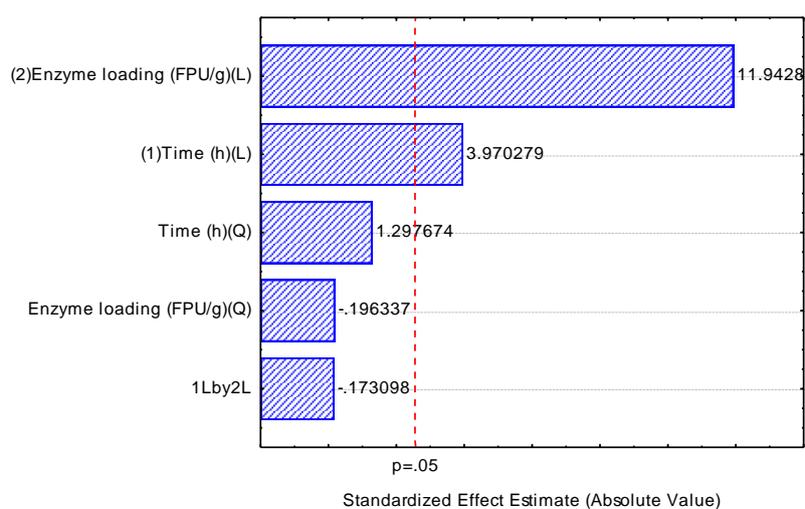


Figure 4. Pareto chart for the effects of the variables enzyme loading and time. Bars extending beyond the vertical line are statistically significant ($p < 0.05$).

Table 3. Factorial design 2² aimed at identify the most suitable conditions for elephant grass (Cameroon) enzymatic hydrolysis. Glucose obtained and glucose predict in each experiment after different times and enzyme (Cellic CTec2) loadings.

Experiment	Time (h) X ₁	Enzyme loading (FPU/g) X ₂	Glucose observed (g/L)	Glucose predict (g/L)
1	-1 5.17	-1 15.81	16.10	16.23
2	+1 10.83	-1 15.81	19.54	19.65
3	-1 5.17	+1 44.18	25.97	26.11
4	+1 10.83	+1 44.18	29.01	29.12
5	-1.41 4	0 30	21.36	21.22
6	+1.41 12	0 30	25.87	25.76
7	0 8	-1.41 10	15.36	15.24
8	0 8	+1.41 50	29.01	28.88
9	0 8	0 30	21.02	22.25
10	0 8	0 30	24.30	22.25
11	0 8	0 30	21.42	22.25

According to Sukumaran et al. (2009) [31], cellulases are needed to penetrate the cellulose polymer, enabling its hydrolysis. The cellulose polymers have specific binding domains for the enzyme. Thus, above a given threshold, further increasing enzyme concentration will likely have little effect on the rate of cellulose hydrolysis. This is probably why the hydrolysis yields did not differ greatly when enzymatic loads of >30 FPU/g were used.

The glucose concentrations reported here were similar to the predicted theoretical values (Fig. 3, Table 3). As shown in Figure 4, the variables tested (enzyme loading and time) were identified as significant in our ANOVA. Enzyme loading had a greater effect than hydrolysis time (Fig. 5). Based on our data, it was propose that a 12 h hydrolysis time and enzymatic concentration of 50 FPU/g are optimal (Fig. 5).

From these results, it was possible to represent, through a mathematical model (Equation

1), the glucose release behavior during the enzymatic hydrolysis of elephant grass in RHR against the independent variables enzyme loading and T, where only the statistically significant coefficients of regression were considered.

$$Y = 22.24 + 1.6T + 4.8EL \quad \text{Eq. 1}$$

Where:

Y is the glucose concentration (g/L)

T is the time

EL is the enzyme loading

From the ANOVA (Table 4) it was found that both time and enzyme explained the data (97% of the results can be accounted for by the mathematical model) (Eq. 1) ($p < 0.05$).

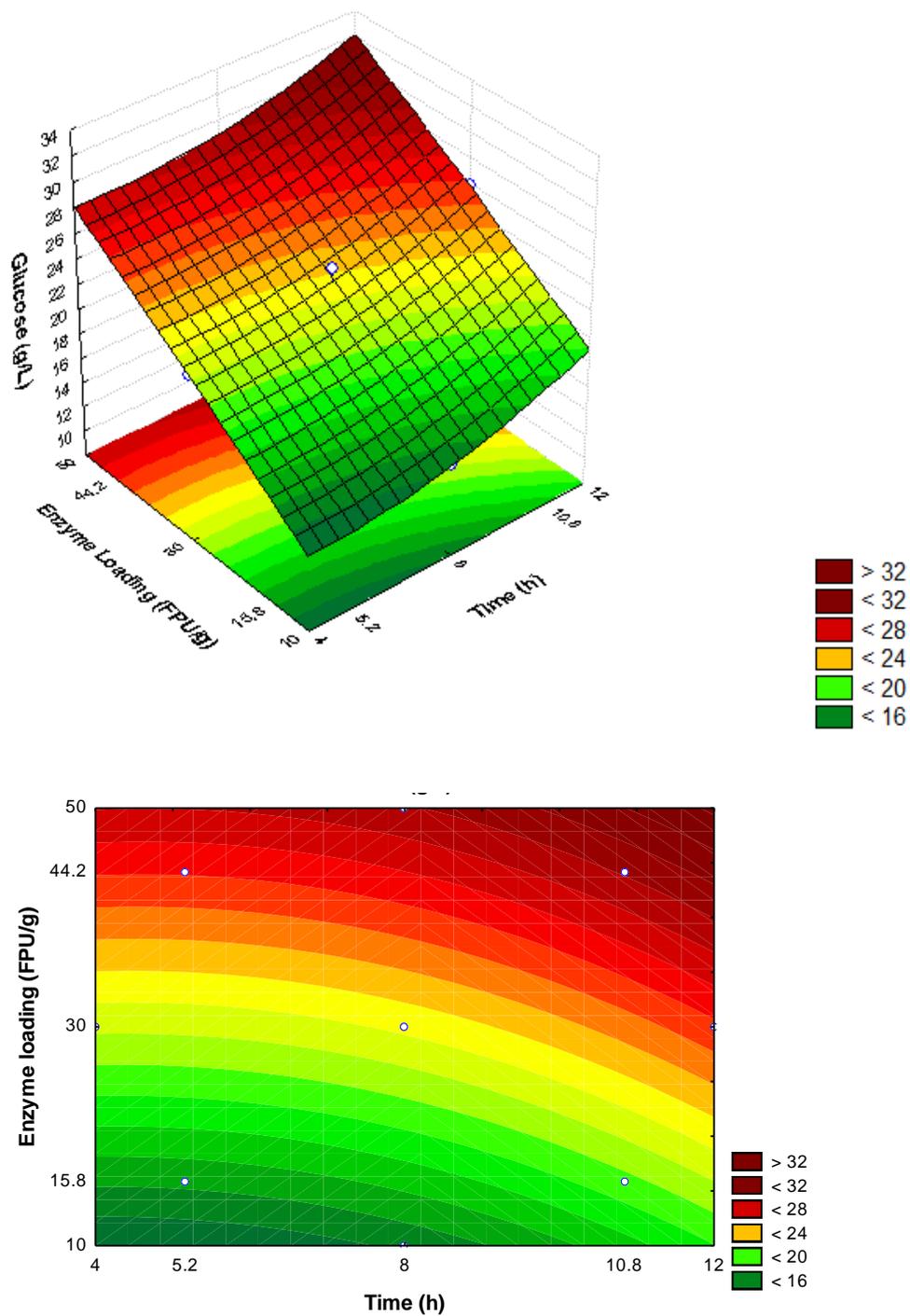


Figura 5. Glucose yield from elephant grass (Cameroon) hydrolysis using Cellic CTec2. Correlations are shown between enzyme loading and time.

Then, the released sugars were fermented using *S. cerevisiae* CAT-1. Experimental design condition four produced the highest ethanol yields (11.62 ± 0.97 g/L, in 24 h of fermentation), although this did not reach statistical significance compared to experimental condition eight. Experimental condition eight (higher of enzyme concentration, shorter time) was chosen for all subsequent experiments. The highest ethanol yields were obtained for experimental conditions four (3.63 g/L/h) and eight (2.68 g/L/h). According to Zabed et al. (2016) [7], ethanol yield depends on biomass, sugars type, sugars concentration in the hydrolysates, the microorganism used and the fermentation method.

Table 4. ANOVA for the release of glucose into the rotating hydrolysis reactor.

Sources of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Average squares	F calculated
Regression	209.963	2	104.98	128.39*
Residues	6.542	8	0.818	
Total	216.505	10		

* Significant at a probability level of 5%.

3.4 Hydrolysis and fermentation of BAGGE (Active Elephant Grass Germplasm Bank of Embrapa) elephant grass accessions

Having established the most suitable conditions of hydrolysis (50 FPU/g and 8 h), the BAGGE elephant grass accessions were hydrolysed.

The Cubano de Pinda, Taiwan A-146, CPAC and CAC-262 accessions released similar amounts of glucose (27.78, 30.83, 29.14 and 28.71 g/L respectively), whereas Elefante Cachoeiro Itapemirim released less glucose than the other accessions (24.85 g/L).

The arabinose, cellobiose and acetic acid concentrations were also similar for all samples evaluated (Fig. 6A). The xylose (13.75%) and anhydroxylose ($18.64 \pm 0.44\%$) concentrations were highest using the Taiwan A-146 accession (Table 6).

The Taiwan A-146 and CPAC accessions produced the highest ethanol yields (13.86 ± 0.93 g/L [in 36 h] and 12.73 ± 0.28 g/L [in 48 h] respectively), which is in line with our glucose concentration following hydrolysis data. The CPAC accession produced large amounts of ethanol within 12 h of fermentation (10.68 ± 0.96 g/L), maintaining these values until 48 h of fermentation. The Taiwan A-146 accession had a peak of ethanol production at 36 h of fermentation, after which the ethanol values decreased, possibly indicating ethanol consumption by the yeast.

There were no statistically significant differences in ethanol production by the Taiwan A-146, CPAC and Cubano de Pinda accessions after 36 h of fermentation, not between the CPAC, Taiwan A-146 and CAC-262 accessions after 48 h of fermentation (Fig. 6B).

Elefante Cachoeiro Itapemirim released the least glucose and lowest dry mass productivity (18.70 t/ha) and, therefore, is not recommended for ethanol production. Taiwan A-146 and CAC-262 produced the highest dry mass yields (22.41 and 25.80 t/ha respectively) (Table 5).

Table 5. The average yield of the elephant grass accessions.

N° BAGCE	Average productivity	
	WM*	DM**
Cubano de Pinda	62.55	21.84
Taiwan A-146	68.35	22.41
Elefante Cachoeiro Itapemirim	46.88	18.70
CPAC	55.45	21.88
CAC-262	68.18	25.80

*Wet matter production (t/ha)

**Dry matter production (t/ha)

The Taiwan A-146 accession produced the highest glucose yield and highest ethanol production (13.86 ± 0.93 g/L). Using 200 g of this substrate for enzymatic hydrolysis, 30.83 g

of glucose were yielded from a total available 76.84 g. Thus, 40.12% of the available cellulose was converted to glucose. The ethanol conversion rates for Taiwan A-146 were 35% of the total available cellulose or 88% of the glucose released during hydrolysis. Thus, for 1 ton of elephant grass, under the conditions tested, about 171 kg of glucose and 111 L of ethanol (2.2-fold lower than the theoretical yield) could be obtained. According to Santos et al. (2012) [32], 1 ton of cane straw of 40% cellulose (theoretical yield 444 kg of glucose) can produce 287 L of ethanol.

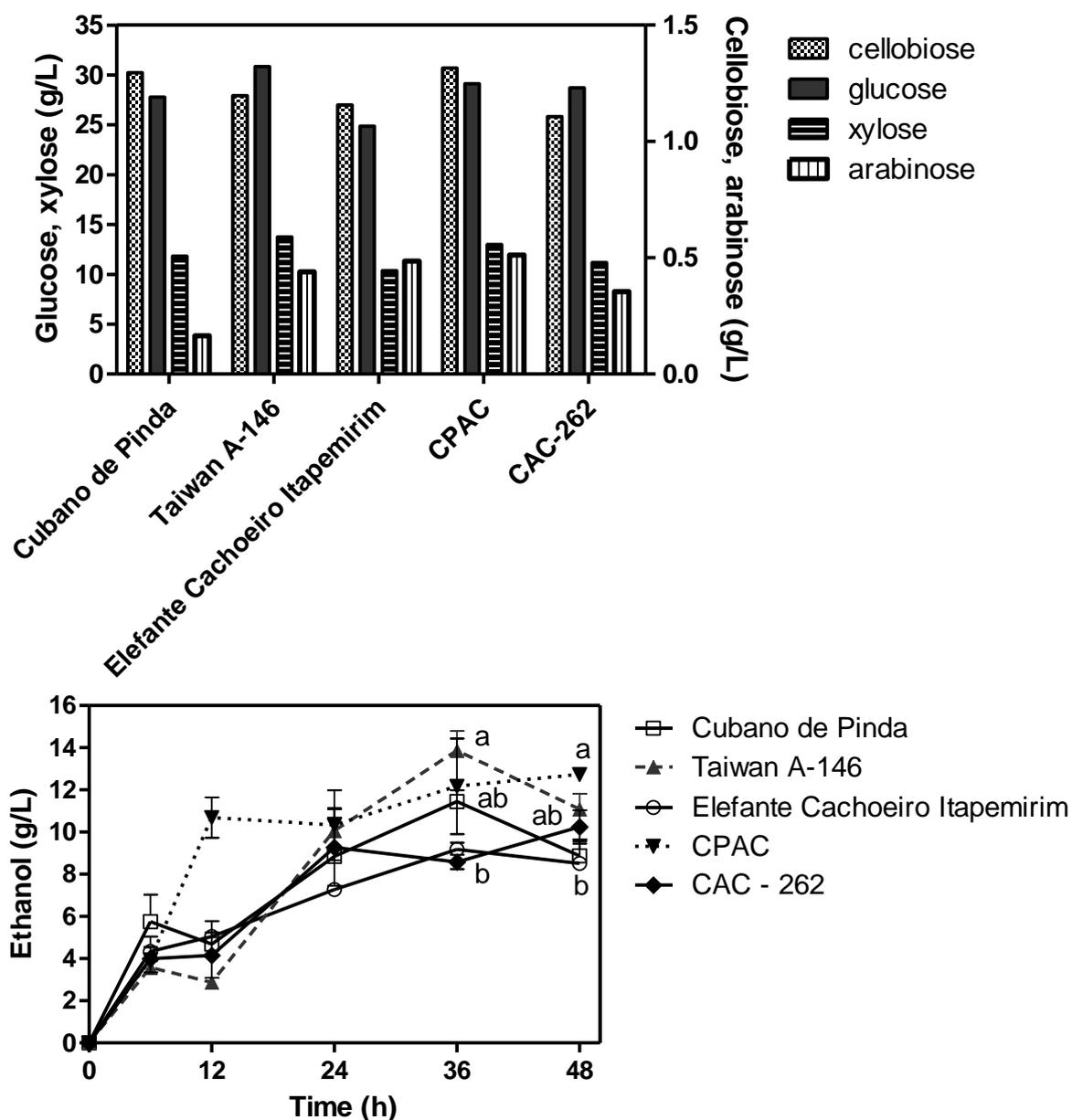


Figure 6. The cellobiose, glucose, xylose and arabinose concentrations (g/L) from elephant grass accessions using *Cellic CTec2* for 8 h (A). Ethanol production from untreated elephant grass hydrolysates using *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 (B).

Although the the glucose concentrations of the tested elephant grass accessions were similar, Taiwan A-146 and CPAC provided the highest ethanol yields. In comparison to other biomass sources, C4 perennial grasses are more promising as they possess efficient photosynthetic pathways that in greater annual biomass production [33]. Thus, elephant grass is a potential source of fermentable sugars, and its abundance and non-food status make it an attractive source [34].

3.5 Chemical analysis of the accessions from BAGGE (Active Elephant Grass Germplasm Bank of Embrapa)

Lignocellulosic biomass is composed of extractives, carbohydrates, lignin, proteins and ashes. Biomass composition varies depending on the species, location and cultivation conditions [16].

Table 6 shows the percentages of extractable compounds obtained using two solvents (ethanol or hot water) with the various elephant grass accessions. The chemical compositions of the extracts are also described.

For all samples ethanol extracted a greater quantity of compounds than water. For both solvents (ethanol and water), the Taiwan A-146 accession returned the highest percentage of extractables ($13.10 \pm 0.57\%$), with more than 98% of these extracted by ethanol. The Cubano de Pinda accession returned the lowest percentage of extractables ($7.47 \pm 0.40\%$) (Table 6). These data are in are in line with previous studies. Cardona et al. (2014) [35] and Scholl et al. (2015b) [36] obtained 9.9% and 8.84% extractables from elephant grass respectively.

It was detected differences in extractables when applying the different solvents and across accessions. It should be noted that the extractable layer, where mainly waxes are deposited, is a limiting factor for enzymatic hydrolysis.

From the extracted material it was possible to determine the composition (carbohydrate

content, acetyl group and lignin) of the biomass. It was expected few differences between the elephant grass accessions, which are genetically very similar. The CAC-262 accession produced the lowest amount of acid-insoluble lignin ($16.47\pm 1.50\%$), whereas the Elefante Cachoeiro Itapemirim accession produced the highest amount of acid-insoluble lignin ($22.16\pm 1.41\%$). The anhydroglucose content was between 31.6 and 34.6% (Table 6).

The lowest anhydroxylose percentages were detected in the Elefante Cachoeiro Itapemirim sample (14.21 ± 1.25). Similar anhydroxylose percentages were detected in the Taiwan A-146, CPAC and CAC-262 samples ($\sim 18\%$). Cardona et al. (2014) [35] analyzed the composition of *P. purpureum* grown in farms located in Antioquia (Colombia) and obtained the following composition: 9.9% extractables, 22.6% cellulose, 20.9% hemicellulose, 19.4% lignin, 11.1% ash and 16.1% of other unidentified substances. These values are similar to those obtained here, with the exception of cellulose, where the values obtained by Cardona et al. (2014) [35] were lower. Phitsuwan et al. (2016) [24] obtained lignin values ($\sim 30\%$) higher than those obtained here. According to Huyen et al. (2010) [37], lignin composition may vary depending on harvest time, which influences the cell wall phenolic fraction (lignin composition, phenolic acids). Grasses, in general, are composed of 25–40% cellulose, 25–50% hemicellulose, 10–30% lignin [38].

The lowest protein content values (0.73%) were detected in the CAC-262 sample. The highest protein content values (3.25%) were detected in the Cubano de Pinda sample. The ash content ranged from 7.08 ± 0.66 (Elefante Cachoeiro Itapemirim accession) to $11.30\pm 0.75\%$ (Cubano de Pinda). Cordeiro and Sales (2016) [39] found that the ash composition of elephant grass is mostly composed of silica, which accounts for more than 50% of the ash. Other compounds, such as Al_2O_3 , Fe_2O_3 and K_2O , were also identified in smaller percentages.

Table 6. The chemical composition of the different elephant grass accessions (%).

Sample	Extractable**	Extractable in ethanol	Extractable in water	Anhydroglucose	Anhydroxylose	Anhydroarabinose	Soluble lignin	Insoluble lignin	Ashes	Protein	Total
Cubano de Pinda	7.47±0.40	6.80±0.28	0.67±0.12	31.61±0.33	15.84±0.13	4.04±0.19	3.28±0.31	20.67±1.53	11.30±0.75	3.25	97.46
Taiwan A-146	13.10±0.57	12.95±0.49	0.15±0.07	34.58±1.06	18.64±0.44	3.87±0.05	4.82±0.11	21.15±2.08	8.71±0.58	2.49	107.37
Elefante Cachoeiro	7.68±1.01	5.55±0.51	2.13±0.50	33.53±0.24	14.21±1.25	4.05±0.13	3.00±0.22	22.16±1.41	7.08±0.66	0.99	92.70
Itapemirim											
CPAC	10.15±0.78	7.80±0.28	2.35±0.49	34.62±0.74	18.57±0.38	4.35±0.07	2.49±1.00	20.37±2.52	7.33±0.41	2.84	100.72
CAC-262	12.15±0.92	9.95±0.21	2.20±0.71	33.29±2.31	18.02±1.22	4.20±0.16	6.56±0.56	16.47±1.50	7.33±0.82	0.73	98.75

* Acetyl group was not detected

** Values obtained after extraction with ethanol and water.

Conclusion

The present work demonstrates the potential of elephant grass biomass to obtain sugars and the subsequent conversion of these sugars into metabolites of economic interest (e.g., ethanol). The obtained data show that different elephant grass accessions display different susceptibility of enzymatic hydrolysis. Taiwan A-146 and CPAC accessions produced higher ethanol yields from released sugars than the other accessions tested in this work. These data will be useful for the design of efficient non-food biomass production systems for biotechnology applications.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (472153/2013-7), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the scholarship, the Novozymes for the enzymes and the Universidade de Caxias do Sul (UCS) for financial support of this work.

References

- [1] López-Linares JC, Romero I, Cara C, Ruiz E, Moya M, Castro E. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel* 2014;122:112-8.
- [2] Wu X, Zhang J, Xu E, Liu Y, Cheng Y, Addy M, et al. Microbial hydrolysis and fermentation of rice straw for ethanol production. *Fuel* 2016;180:679-86.
- [3] Menegol D, Luisi Scholl A, Claudete Fontana R, Pinheiro Dillon AJ, Camassola M. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. *Fuel* 2014;133:232-40.
- [4] Cheng S, Zhu S. Use of lignocellulosic materials for a sustainable chemical industry. *BioResources*; 2008;3; 666-7.
- [5] dos Reis L, Schneider W, Fontana R, Camassola M, Dillon AP. Cellulase and Xylanase Expression in Response to Different pH Levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 Medium. *BioEnergy Res* 2014;7(1):60-7.
- [6] Malherbe S, Cloete TE. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev Environm Scien Biotechnol* 2002;1(2):105-14.
- [7] Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renew Sust Energy Rev* 2016;66:751-74.

- [8] Dillon AJ, Bettio M, Pozzan FG, Andrighetti T, Camassola M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. *J Appl Microbiol* 2011;111(1):48-53.
- [9] Camassola M, Dillon AJP. Effect of Different Pretreatment of Sugar Cane Bagasse on Cellulase and Xylanases Production by the Mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 Grown in Submerged Culture. *BioMed Res Inter*; 2014;doi:10.1155/2014/720740.
- [10] Sánchez ÓJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 2008;99(13):5270-95.
- [11] Gan Q, Allen SJ, Taylor G. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. *Biochem Eng J* 2002;12(3):223-9.
- [12] Pothiraj C, Kanmani P, Balaji P. Bioconversion of Lignocellulose Materials. *Mycobiol* 2006;34(4):159-65.
- [13] Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, Long SP. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. *Science* 2010;329(5993):790-2.
- [14] Leo VV, Passari AK, Joshi JB, Mishra VK, Uthandi S, Ramesh N, et al. A Novel Triculture System (CC3) for Simultaneous Enzyme Production and Hydrolysis of Common Grasses through Submerged Fermentation. *Front Microbiol* 2016;7:447.
- [15] Toscan A, Morais ARC, Paixão SM, Alves L, Andreus J, Camassola M, et al. Effective Extraction of Lignin from Elephant Grass Using Imidazole and Its Effect on Enzymatic Saccharification To Produce Fermentable Sugars. *Ind Eng Chem Res* 2017;56(17):5138-45.
- [16] Toscan A, Morais ARC, Paixão SM, Alves L, Andreus J, Camassola M, et al. High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: Assessment of the effect of biomass composition on process efficiency. *Bioresour Technol* 2017;224:639-47.
- [17] Menegol D, Scholl AL, Fontana RC, Dillon AJP, Camassola M. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. *Eng Conv Manag* 2014;88(0):1252-6.
- [18] Menegol D, Fontana RC, Dillon AJ, Camassola M. Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids. *Bioresour Technol* 2016;211:280-90.
- [19] Basso V, Machado JC, da Silva Lédo FJ, da Costa Carneiro J, Fontana RC, Dillon AJP, et al. Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg* 2014;71:155-61.
- [20] Scholl AL, Menegol D, Pitarelo AP, Fontana RC, Filho AZ, Ramos LP, et al. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. *Bioresour Technol* 2015;192:228-37.
- [21] Novozymes, 2010. Cellic® Novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/CellicCTec3/Documents/AS_2010-01668-03.pdf IDoehbn, 2016 Aead.
- [22] Xiao Z, Zhang X, Gregg DJ, Saddler JN. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;113-116:1115-26.
- [23] Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources* 2007;2:707-38.
- [24] Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokchai K. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. *Bioresour Technol* 2016;218:247-56.
- [25] Laureano-Perez L, Teymouri F, Alizadeh H, Dale BE. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Appl Biochem Biotechnol* 2005;121-124:1081-99.
- [26] Hansen GH, Lübeck M, Frisvad JC, Lübeck PS, Andersen B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem* 2015;50(9):1327-41.

- [27] Ramos LP, Silva L, Ballem AC, Pitarelo AP, Chiarello LM, Silveira MHL. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour Technol* 2015;175.
- [28] Hahn-Hagerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74(5):937-53.
- [29] Gregg DJ, Saddler JN. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol Bioeng* 1996;51(4):375-83.
- [30] Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb Technol* 2002;31(3):353-64.
- [31] Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renew Energ* 2009;34(2):421-4.
- [32] Santos FA, Queiróz JHd, Colodette JL, Fernandes SA, Guimarães VM, Rezende ST. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quím Nova* 2012;35:1004-10.
- [33] Lewandowski I, Scurlock JMO, Lindvall E, Christou M. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenerg* 2003;25(4):335-61.
- [34] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2016;199:42-8.
- [35] Eliana C, Jorge R, Juan P, Luis R. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel* 2014;118:41-7.
- [36] Scholl AL, Menegol D, Pitarelo AP, Fontana RC, Filho AZ, Ramos LP, et al. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* SIM29 solid-state cultivation. *Ind Crops Prod* 2015;77:97-107.
- [37] Le Ngoc Huyen T, Rémond C, Dheilly RM, Chabbert B. Effect of harvesting date on the composition and saccharification of *Miscanthus x giganteus*. *Bioresour Technol* 2010;101(21):8224-31.
- [38] Saini JK, Saini R, Tewari L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech* 2015;5(4):337-53.
- [39] Cordeiro GC, Sales CP. Influence of calcining temperature on the pozzolanic characteristics of elephant grass ash. *Cem Concr Compos* 2016;73:98-104.

5 DISCUSSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o equipamento desenvolvido – hidrolisador rotativo – possibilita que ocorra, concomitantemente, o pré-tratamento físico, através das esferas de aço, e a hidrólise enzimática da biomassa, alcançando rendimentos em glicose de até 40%, nas melhores condições testadas, e produzindo em torno de 14 g/L de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados da biomassa de capim-elefante *in natura* obtidos em hidrolisador rotativo.

Pela análise por microscopia eletrônica de varredura da biomassa submetida ao hidrolisador rotativo, foi possível observar diferenças morfológicas no capim-elefante, havendo a desestruturação das fibras da biomassa. A combinação de tratamento físico e enzimático possibilitou a maior desestruturação da biomassa, sem que ocorresse diminuição da atividade enzimática do complexo de *P. echinulatum*, visto que se pôde observar a estabilidade de xilanases após 3 h de hidrólise e de β -glicosidases, endoglicanases e FPA após 6 h de hidrólise.

Quanto à liberação de açúcares obtidos a partir da hidrólise de capim-elefante *in natura*, em hidrolisador rotativo, observou-se que a concentração de glicose liberada aumenta com o incremento da concentração de substrato empregado; porém, esse aumento não é proporcional. Da mesma maneira, quanto maior foi a carga de enzima utilizada, até 50 FPU/g de substrato, e maior foi o tempo de hidrólise, até 12 h de processo, maior liberação de glicose pode ser alcançada. Assim, maiores concentrações de etanol foram alcançadas quando os hidrolisados provenientes do hidrolisador rotativo foram fermentados em comparação aos hidrolisados obtidos em reator estático. A maior produção de etanol pode ser explicada pelo fato de que em hidrolisador rotativo, a concentração de celobiose diminuiu com o aumento do tempo, enquanto que, em amostras não submetidas ao hidrolisador rotativo, observou-se o acúmulo de celobiose. Essa celobiose pode ter sido convertida em glicose durante o processo de fermentação, mesmo

em temperatura mais baixa. A presença de oligossacarídeos e biomassa vegetal remanescente, presentes nos hidrolisados provenientes do hidrolisador rotativo, também pode ter contribuído para os maiores incrementos na produção de etanol.

A partir dos géis de proteínas totais, observa-se a presença de diferentes bandas, indicando a presença de diferentes proteínas. Nos zimogramas de β -glicosidases, com 8% (m/v) de substrato, observou-se, após 6 h de hidrólise, uma diminuição da intensidade da banda de 250 kDa quando o substrato capim-elefante foi avaliado, não sendo observada essa diminuição quando 20% (m/v) de substrato foi empregado. Nos zimogramas de endoglicanases, a banda de 25 kDa não foi observada após 1 h de hidrólise, sugerindo perda de atividade dessa enzima. Quanto à banda de 75 kDa, houve diminuição da intensidade da mesma nos substratos papel filtro e Avicel[®], mas para capim-elefante o mesmo não ocorreu. Para exoglicanases sugere-se adsorção dessa enzima ao substrato capim-elefante, visto que essa banda não é observada quando se utiliza 8% (m/v) de substrato. Quanto aos zimogramas de xilanases, bandas de 75 e 25 kDa foram verificadas, não sendo adsorvidas aos substratos testados.

As maiores produtividades em etanol foram obtidas com 16 % (m/v) de biomassa hidrolisada (0,5 g/L/h), quando utilizaram-se enzimas de *P. echinulatum* – 10 FPU/g de substrato, e 1 g/L/h quando a enzima comercial Cellic CTec2[®] – 30 FPU/g de substrato, foi empregada.

Após planejamento experimental, observou-se que o Experimento 4 (10,83 h, 44,18 FPU/g de substrato) e o Experimento 8 (8 h, 50 FPU/g de substrato), foram os que proporcionaram as maiores liberações de glicose, ambos de 29 g/L. Ainda, verificou-se que a variável concentração de enzima tem maior influência do que a variável tempo durante a hidrólise enzimática de capim-elefante.

Quanto aos diferentes acessos de capim-elefante testados, Taiwan A-146 e CPAC, quando submetidos à hidrólise enzimática, por enzimas comerciais, em hidrolisador rotativo,

foram os que promovem as maiores produções de etanol, porém não diferindo estatisticamente dos acessos Cubano de Pinda em 36 h e CAC-262 em 48 h de fermentação.

O Taiwan A-146, particularmente apresentou a maior produção de etanol ($13,86 \pm 0,93$ g/L). Assim, se considerarmos uma tonelada de capim-elefante, acesso Taiwan A-146, nas condições testadas, poderiam ser obtidos cerca de 171 kg de glicose e 111 L de etanol (2,2 vezes inferior ao rendimento teórico). De acordo com dados da literatura uma tonelada de palha de cana-de-açúcar, com aproximadamente 40% de celulose (rendimento teórico 444 kg de glicose) pode produzir 287 L de etanol. Assim, podemos verificar que é importante a escolha de acessos de capim-elefante, que sejam mais suscetíveis à hidrólise enzimática para que ocorra uma eficiente conversão dos açúcares contidos na fibra lignocelulósica a etanol ou outros metabólitos de interesse, tendo um maior rendimento em etanol ao final do processo, com menores custos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- maiores liberações de glicose e, conseqüentemente, de etanol são obtidas quando o substrato capim-elefante é hidrolisado em hidrolisador rotativo, em comparação ao reator estático;

- mudanças morfológicas são observadas nas amostras submetidas ao hidrolisador rotativo, proporcionando maiores conversões de capim-elefante em glicose e em etanol;

- o acúmulo de celobiose em amostras submetidas ao reator estático, quando comparadas ao hidrolisador rotativo, leva a uma diminuição da conversão de substrato em glicose;

- a utilização de esferas em hidrolisador rotativo, em geral, não afeta a atividade do complexo enzimático produzido pelo fungo *P. echinulatum* S1M29;

- quanto maiores as concentrações de substrato e enzima empregadas, maior é a liberação de glicose, porém, esse aumento não é proporcional;

- a partir de planejamento experimental, é possível verificar que a variável concentração de enzima tem mais influência do que a variável tempo;

- diferentes acessos de capim-elefante podem proporcionar maiores liberações de açúcares, os quais podem ser convertidos em etanol.

7 PERSPECTIVAS

- Determinar o índice de cristalinidade da celulose das amostras de capim-elefante submetidas ao hidrolisador rotativo.
- Avaliar diferentes condições de pré-tratamento da biomassa de capim-elefante.
- Testar diferentes combinações de pré-tratamento (químico com biológico).
- Realizar estudos de hidrólises de capim-elefante pré-tratado por diferentes métodos, em hidrolisador rotativo.
- Realizar hidrólise de outros substratos em hidrolisador rotativo.
- Testar outros acessos de capim-elefante.
- Desenvolver métodos de recuperação de enzimas e dos açúcares provenientes da hidrólise enzimática de capim-elefante, realizadas em hidrolisador rotativo.
- Realizar o processo de hidrólise e fermentação simultaneamente, em hidrolisador rotativo.
- Fermentar os xaropes provenientes da hidrólise enzimática de capim-elefante com linhagens de leveduras que fermentem xilose e glicose.
- Desenvolver processos de aproveitamento da biomassa residual de capim-elefante após hidrólise e fermentação.

8 BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Shaikh, H.; Singh, R.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma A.J. (2005). Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carb. Polym.** 62: 6-10.
- Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Singh, R.; Shaikh, H., Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma A.J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carb. Polym.** 57: 67-72.
- Alvira, P.; Tomás-Pejó, E; Ballesteros, M; Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour. Technol.** 101: 4851-4861.
- Andreas, J.; Oleksyszzen, D.N.; Silveira, M.H.L. (2014). Processing of cellulosic textile materials with cellulases. In: Fontana, J.D.; Tiboni, M.; Grzybowski, A. Cellulose and other naturally occurring polymers. **Research Signpost.** 1: 11-19.
- Andreas, J.; Paulo, A.C. (2008). Enzimas no processamento de fibras têxteis (capítulo 8). In: Bom, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L.; Vermelho, A.B.; Paiva, C.L.A.; Alencastro, R.B.; Coelho, R.R.R. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. **Editora Interciência Ltda.** 1: 179-204.
- Andreas, J. (2001). A aplicação de celulasas em processos de desbotamento. **Quím. Têxtil.** 64: 5-18.
- Azzam, A.M. (1989). Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. **J. Environ. Sci. Health. B.** 24: 421-433.
- Bai, F.W.; Anderson, W.A.; Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol. Adv.** 26: 89-105.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energ. Convers. Manag.** 52: 858-875.

- Ball, A.S.; McCarthy, A.J. (1989). Production and properties of xylanases from actinomycetes. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 439-444.
- Barakat, A.; Monlau, F.; Solhy, A.; Carrere, H. (2015). Mechanical dissociation and fragmentation of lignocellulosic biomass: effect of initial moisture, biochemical and structural proprieties on energy requirement. **Appl. Energ.** 142: 240-246.
- Barakat, A.; de Vries, H.; Rouau, X. (2013). Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. **Bioresour. Technol.** 134: 362-73.
- Beg, Q.K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 326-338.
- Berlin, A.; Gilkes, N.; Kilburn, D.; Bura, R.; Markov, A.; Skomarovsky, A.; Okunev, O.; Gusakov, A.; Maximenko, V.; Gregg, D.; Sinitsyn, A.; Saddler, J. (2005). Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme Microb. Technol.** 37: 175-184.
- Biesebeke, R.; Ruijter, G.; Rahardjo, Y.S.P.; Hoogschagen, M.J.; Heerikhuisen, M.; Levin, A.; van Driel, K.G.A.; Schutyser, M.A.I.; Dijksterhuis, J.; Zhub, Y.; Weber, F.J.; de Vos, W.M.; van den Hondel, K.A.M.J.J.; Rinzema, A.; Punt, P.J. (2002). *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project, **FEMS Yeast Res.** 2: 245-248.
- Bisaria, V.S.; Ghose, T.K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: substrats, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme Microb. Technol.** 3: 90-104.
- Bjerre, A.B.; Olesen, A.B.; Fernqvist, T. (1996). Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 49: 568-577.
- Botrel, M.A.; Alvim, M.J. (1992). Avaliações agrônômicas de cultivares de capim-elefante em duas regiões fisiográficas do Estado de Minas Gerais. **Pesq. Agropec. Bras.** 27(6): 835-839.
- BP Statistical Energy Review. (2013). www.bp.com/statisticalreview (31.05.13). In: Liew, W.H.; Hassima, M.H.; Ng, D.K.S. (2014). Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **J. Cleaner Prod.** 1-19.

- Broda, P. (1992). Biotechnology in the degradation and utilisation of lignocellulose. **Biodegrad.** 3: 219-238.
- Bulla, R.; Gionzales, G.S.; Pellegrini, F.I. (2005). Processo de hidrólise ácida de materiais celulósicos e lignocelulósicos, vaso de digestão e reator de hidrólise. **Patente de Invenção.** PI 0500534-5 A2
- Cadoche, L.; López, G.D. (1989). Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. **Biol. Wastes.** 30: 153-157.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2012). Cellulase determination: modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **J. Anal. Bioanal. Techniq.** 1: 1.
- Camassola, M.; Bittencourt, L.R.; Sehnem, N.T.; Andreus, J.; Dillon, A.J.P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396.
- Cannela, D.; Jorgensen, H. (2013). Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? **Biotechnol. Bioeng.** 111 (1): 59:68.
- Canteri, M.H.G.; Moreno, L.; Wosiacki, G.; Scheer, A.P. (2012). Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros.** 22 (2): 149-157.
- Cardona, A.A.; Sánchez, O.J. (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresour. Technol.** 98: 2415-2457.
- Carvalho, F.; Duarte, L.C.; Girio, F.M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **J. Sci. Ind. Res.** 67: 849-864.
- CGEE – Center for Strategic Studies and Management in Science, Technology and Innovation, 2009. Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. CGEE, Brasília. In: Dias, M.O.S.; Cunha, M. P.; Jesus, C.D.F; Rocha, G.J.M.; Pradella, J.G.C.; Rossell, C.E.V.; Filho, R.M.; Bonomi, A. (2011). Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresour. Technol.** 102: 8964-8971.
- Chahal, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 205-210.

- Chandel, A.K.; Singh, O.V.; Narasu, M.L.; Rao, L.V. (2011). Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* - VS3. **New Biotechnol.** 28: 593-599.
- Chávez, R.; Bull, P.; Eyzaguirre, J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **J. Biotechnol.** 123: 413-433.
- Cheng, Yu.S., Zheng, Yi., Yu, C.W., Dooley, T.M., Jenkins, B.M., VanderGheynst, J.S., (2010). Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162: 1768–1784.
- Coughlan, M.P. (1985). The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.** 3: 39-109.
- Considine, P.J.; Hackett, T.J.; Coughlan, M.P. (1987). Solid-state cultivation of cultivation of *Penicillium capsulatum* on beet pulp. **Biotechnol. Lett.** 9: 131-134.
- Costa, D.A.; Souza, C.J. A.; Costa, P.S.; Rodrigues, M.Q.R.B.; Santos, A.F.; Lopes, M.R.; Genier, H.L.A.; Silveira, W.B.; Fietto, L.G. (2014). Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Bioenerg. Biofuels.** 98: 3829-3840.
- Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- a review. **J. Food Eng.** 76: 291-302.
- Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochem. Eng. J.** 22: 211-219.
- Cruz, J.M.; Domínguez, J.M.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2000). Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food Biotechnol.** 14: 79-97.
- Cunha-Pereira, F.; Hickert, L.R.; Sehnema, N.T.; Souza-Cruz, P.B.; Rosa, C.A.; Ayub, M.A.Z. (2011). Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresour. Technol.** 102: 4218-4225.
- Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 933-941.

- Dekker, R.F.H.; Richards, G.N. (1976). Hemicellulases: their occurrence purification properties and mode of action. **Adv. Carb. Chem. Biochem.** 32: 277-352.
- Dias, M.O.S.; Cunha, M. P.; Jesus, C.D.F; Rocha, G.J.M.; Pradella, J.G.C.; Rossell, C.E.V.; Filho, R.M.; Bonomi, A. (2011). Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresour. Technol.** 102: 8964-8971.
- Dillon, A.J.P.; Bettio, M.; Pozzan, F.G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111: 48-53.
- Dillon, A.J.P. (2004). Celulases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Ed.). Enzimas como agentes biotecnológicos. **Editora Legis Summa**, pp. 243-269.
- Duff, S.J.B.; Murray, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 55: 1-33.
- Dwivedi, P.; Alavalapati, J. R.R.; Lal, P. (2009). Cellulosic ethanol production in the United States: conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. **Energy Sustain. Dev.** 13: 174-182.
- Embrapa (2010). Rodrigues, R. C. Documentos 306, Embrapa Clima Temperado. 177 p.
- Endt, D.V.; Costa, P.; Zago, M.K.; Pasquali, G. (2000). Genes de lignificação. **Biotec. Ciência Desenvol.** 15: 152-159.
- Eriksson, T.; Börjesson, J.; Tjerneld, F. (2002). Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 353-364.
- Fan, L.T.; Lee, Y.H.; Beardmore, D.H. (1980). Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 22: 177-199.
- Fan, L.T.; Gharapuray, M.M.; Lee, Y.H. (1987). **Cellulose hydrolysis**. Berlin, Germany: Springer-Verlag. 3: 1-68.
- Fan, L.T.; Lee, Y.H.; Beardmore, D.R. (1981). The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 23: 419-424.

- FAO (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Disponível (online) em 8 de fevereiro de 2010.** In: <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/afris/es/Data/137.HTM>.
- Farias, V.P. (1994). Formas de uso do capim-elefante. Simpósio sobre capim-elefante, 2. **Anais.** pp. 139-148, Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL.
- Fengel, D.; Wegener, G (1989). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. In.: Pitarello, A.P. (2007). Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
- Foody, B.; Rahme, Z.; Tolan, J.S. (2005). Upflow settling reactor for enzymatic hydrolysis of cellulose. **European patent.** EP 1824985 A4
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 108: 41-65.
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 618-628.
- Galdeano, M.C. (2001). Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão. **Dissertação de mestrado.** Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina. PR.
- Gan, Q.; Allen, S.J.; Taylor, G. (2002). Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. **Biochem. Eng. J.** 12: 223-229.
- Gerbrandt, K.; Chu, P.L.; Simmonds, A.; Mullins, K.A.; MacLean, H.L.; Griffin, W.M.; Saville, B.A. (2016). Life cycle assessment of lignocellulosic ethanol: a review of key factors and methods affecting calculated GHG emissions and energy use. **Curr. Opin. Biotechnol.** 38:63-70.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Gilbert, H.J.; Hazlewood, G.P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases. **J. Gen. Microb.** 139: 187-194.
- Glass, N.L.; Schmoll, M.; Cate, J.H.; Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Ann. Rev. Microbiol.** 67:477-498.

- Gomide, J.A. (1994). Formação e utilização de capineira de capim-elefante. In: Carvalho, M.M.; Alvim, M.J.; Xavier, D.F. (Eds.). Capim-elefante: produção e utilização. Coronel Pacheco, MG: Embrapa-CNPGL. pp. 81-115.
- Graf, A.; Koehler, T. (2000). Oregon cellulose-ethanol study: an evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstocks. **Oregon Dept. Energy**. 96 p.
- Gregg, D.J.; Saddler, J.N. (1996). Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnol. Bioeng.** 51:375-383.
- Grohmann, K. (1993). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic substrates to ethanol. In: Saddler J.N. (ed.). Bioconversion of forest and agricultural plant residues. **CAB**, Wallingford, UK, pp. 183-209.
- Gupta, R.; Mehta, G.; Kuhad, R.V. (2012). Fermentation of pentose and hexose sugars from corncob, a low cost feedstock into ethanol. **Biomass Bioenerg.** 47: 334-341.
- Gusakov, A.V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends Biotechnol.** 29 (9): 419-425.
- Gusakov, A.V.; Sinitsyn, A.P. (2012). Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. **Biofuels.** 3(4): 463-477.
- Hahn-Hägerdal, B.; Wahlbom, C.F.; Gárdonyi, M.; van Zyl, W.H.; Cordero Otero, R.R.; Jönsson, L.J. (2001). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 73: 53-84.
- Halliwell, G. (1977). Cellulosic material and their pretreatment. **Proc. Bio. Conv. Symp.** IIT Delhi: 81-95.
- Hamelinck, C.; Hooijdonk, G.; Faaij, A.P.C. (2003). Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses. Universiteit Utrecht. Copernicus Institute. **Sci. Technol. Soc.** 1-30.
- Hames, B.R. (2011). Biomass compositional analysis for energy applications. Biofuels. Methods and Protocols Series. **Methods Mol. Biol.** 581: 145-167.

- Hansen, G.H.; Lübeck, M.; Frisvada, J.C.; Lübeck, P.S.; Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochem.** 50: 1327-1341.
- Henriksson, G.; Johansson, G.; Pettersson, G. (2000). A critical review of cellobiose dehydrogenases. **J. Biotechnol.** 78: 93-113.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 280: 309-316.
- Hickert, L.R.; da Cunha-Pereira, F.; de Souza-Cruz, P.B.; Rosa, C. A.; Ayub, M.A.Z. (2013). Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresour. Technol.** 131: 508-514.
- Hilst, A.G.P. (2005). Aperfeiçoamentos em processo de hidrólise ácida rápida de material lignocelulósico e em reator de hidrólise. **Patente de invenção.** PI 0505212-2 A2.
- Hoffert, M.I.; Caldeira, K.; Benford, G.; Criswell, D.R.; Green, C.; Herzog, H.; Jain, A.K.; Kheshgi, H.S.; Lackner, K.S.; Lewis, J.S.; Lightfoot, H.D.; Manheimer, W.; Mankins, J.C.; Mauel, M.E.; Perkins, L.J.; Schlesinger, M.E.; Volk, T.; Wigley, T.M.L. (2002). Advanced technology paths to global climate stability: energy for a greenhouse planet, **Science.** 298: 981-987.
- Holzberg, R.K.F; Steinkraus, K.H. (1967). A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. **Biotechnol. Bioeng.** 9: 413–427.
- Horn, S.J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B.; Eijsink, V.G.H. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels.** 5:45.
- Howard, R.L.; Abotsi, E.; Jansen, R.E.L.; Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 602-619.
- Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Mertens, D.R.; Ralph, J.; Weimer, P.J. (1996). Improving forage fibre digestibility. *Feed Mix, Doetinchem.* 4: 30-34. In: <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/08MET/Palestras/teorlignina.pdf>
- Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris B.J. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresour. Technol.** 86: 207-213.

- Kansoh, A.L.; Essam, S.A.; Zeinat, A.N. (1999). Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. **Polym. Degrad. Stab.** 62: 273-278.
- Karimi, K.; Taherzadeh, M.J. (2016). A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: composition, imaging, and crystallinity. **Bioresour. Technol.** 200, 1008-1018.
- Kelbert, M.; Romani, A.; Coelho, E.; Pereira, F.B.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. (2015). Lignocellulosic bioethanol production with revalorization of low-cost agroindustrial by-products as nutritional supplements. **Ind. Crops Prod.** 64: 16-24.
- Kim, H.J.; Lee, S.; Kim, J.; Mitchell, R.J.; Lee, J.H. (2013). Environmentally friendly pretreatment of plant biomass by planetary and attrition milling. **Bioresour. Technol.** 144: 50-56.
- Kotarska, K.; Swierczynska, A.; Dziemianowicz, W. (2015). Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation. Study on the decomposition of lignocellulosic biomass. **Renew. Energy.** 75: 389-394.
- Krishna, S.H.; Reddy, T.J.; Chowdary, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresour. Technol.** 77: 193-196.
- Krishna, S.H.; Chowdary, G.V.; Reddy, D.S.; Ayyanna, C. (1999). Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *Antigonum leptopus* (Linn) leaves to ethanol. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 1055-1060.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb. Technol.** 15: 90-99.
- Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 411-456.
- Kumar, D.; Murthy, G. (2011). Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnol. Biofuels.** 4:1-19.
- Kurakake, M.; Kisaka, W.; Ouchi, K.; Komaki, T. (2001). Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse, and switchgrass. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 90: 251-259.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. **Nature**. 227: 680-685.
- Laopaiboon, L.; Nuanpeng, S.; Srinophakun, P.; Klanrit, P.; Laopaiboon, P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresour. Technol.** 100: 4176-4182.
- Lawford, H.G.; Rousseau, J.D. (2003). Cellulosic fuel ethanol - alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 105: 457-69.
- Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J. Biotechnol.** 56: 1-24.
- Leite, R.C.C.; Leal, M.R.L.V.; Cortez, L.A.B.; Griffin, W.M.; Scandiffio, M.I.G. (2009). Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**. 34: 655-661.
- Liguori, R.; Ventorino, V.; Pepe, O.; Faraco, V. (2016). Bioreactors for lignocellulose conversion into fermentable sugars for production of high added value products. **App. Microbiol. Biotechnol.** 100: 597-611.
- Limayem, A.; Ricke, S.C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Prog. Energy Combust. Sci.** 38: 449-467.
- Liu, Z.L.; Ma, M.; Song, M. (2009). Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Mol. Genet. Genomics**. 282: 233-244.
- Liu, Z.L.; Slininger, P.J.; Gorsich, S.W. (2005). Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 121-124: 451-460.
- Liu, W.; Lu, Y.; Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. **Process Biochem.** 34: 67-72.
- Lynd, L.R.; Cushman, J.H.; Nichols, R.J.; Wyman, C.E. (1991). Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**. 251: 1318-1323.
- Lynd, L.R.; Wyman, C.E.; Gerngross, T.U. (1999). Biocommodity engineering. **Biotechnol. Prog.** 15: 777-793.

- Ma, S.; Preims, M.; Piumi, F.; Kappel, L.; Seiboth, B.; Record, E.; Kracher, D.; Ludwig, R. (2017). Molecular and catalytic properties of fungal extracellular cellobiose dehydrogenase produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems. **Microb. Cell Factories**. 16: 37.
- Mandels, M. (1982). In: cellulases. **Annu. Rep. Ferm. Process**. Ed. G.T. Tsao. pp. 35-78.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.
- Margeot, A., Hahn-hagerdal, B.; Edlund, M.; Slade, R.; Monot, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opin. Biotechnol.** 20: 372-380.
- Martín, C.; Klinke, H.B.; Thomsen, A.B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 426-432.
- Martinez, D.; Berka, R.M.; Henrissat, B.; Saloheimo, M.; Arvas, M.; Baker, S.E.; Chapman, J.; Chertkov, O.; Coutinho, P.M.; Cullen, D.; Danchin, E.G.; Grigoriev, I.V.; Harris, P.; Jackson, M.; Kubicek, C.P.; Han, C.S.; Ho, I.; Larrondo, L.F.; de Leon, A.L.; Magnuson, J.K.; Merino, S.; Misra, M.; Nelson, B.; Putnam, N.; Robbertse, B.; Salamov, A.A.; Schmoll, M.; Terry, A.; Thayer, N.; Westerholm-Parvinen, A.; Schoch, C.L.; Yao, J.; Barabote, R.; Nelson, M.A.; Detter, C.; Bruce, D.; Kuske, C.R.; Xie, G.; Richardson, P.; Rokhsar, D.S.; Lucas, S.M.; Rubin, E.M.; Dunn-Coleman, N.; Ward, M.; Brettin, T.S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nat. Biotechnol.** 26(5): 555-560.
- Martinez, A.; Rodriguez, M.E.; Wells, M.L.; York, S.W.; Preston, J.F.; Ingram, L.O. (2001). Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnol. Prog.** 17: 287-293.
- Martins, L.F. (2005). Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. 121 f. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
- Mathew, A.K.; Chaney, K.; Crook, M.; Humphries, A.C. (2011). Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: Evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption. **Bioresour. Technol.** 102: 6547-6553.

- Mathew, A.K., Humphries, A.C., Chaney, K., Crook, M. (2011). Dilute acid pretreatment of Oilseed rape straw for bioethanol production. **Renew. Energy.** 36(9): 2424-2432.
- Medve, J. (1997). Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II. **Tese de doutorado.** Department of Biochemistry, Lund University. Lund, Sweden.
- Menegol, D.; Scholl, A.L.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2014a). Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Conv. Manag.** 88: 1252-1256.
- Menegol, D.; Scholl, A.L.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola M. (2014b). Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel.** 133: 232-240.
- Menon, V.; Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Prog. Energ. Combust.** 38: 522-550.
- Messner, R.; Kubicek, C.P. (1991). Carbon source control of cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57(3): 630-635.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Morais, A.R.C.; Lopes, A.M.C.; Bogel-Lukasik, R. (2015). Carbon dioxide in biomass processing: contributions to the green biorefinery concept. **Chem. Rev.** 115 (1): 3-27.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.
- Mupondwa, E.; Li, X.; Tabil, L.; Sokhansanj, S.; Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol: part I: pretreatment technologies **Renew. Sust. Energ. Rev.** 72: 178-190.
- Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Mol. Biol. Rev.** 72: 379-412.
- Nguyen, Q. A. (1998). Tower reactors for bioconversion of lignocellulosic material. **United States Patent.** US 5733758 A.

- Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2011). EUA, 18ª edição, 4ª revisão. Método 2001.11.
- Olsson, L.; Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb. Technol.** 18: 312-31.
- Osava, M. (2007). Elephant grass for biomass. Inter Press Service News Agency, October 10.
- Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour. Technol.** 74: 25-33.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 81-84.
- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem.** 35: 1153-1169.
- Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochem.** 27: 109-117.
- Parisi, F. (1989). Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Adv. Biochem. Eng.** 38: 53-87.
- Patel, M.A.; Ou, M.S.; Ingram, L.O.; Shanmugam, K.T. (2005). Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. **Biotechnol. Prog.** 21: 1453-1460.
- Pereira, A.V. (1992). Escolha de variedades de capim-elefante. In: Peixoto, A.M.; Moura, J.C.; Faria, V.P. (Eds.) Simpósio sobre Manejo da Pastagem, 10. **Anais.** pp. 45-62, Piracicaba.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatment of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.** 5: 53-63.
- Philippidis, G.P. (1996). **Cellulose bioconversion technology.** In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 253–285.
- Ramos, L.P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nova.** 26: 863-871. In.: Pitarelo, A.P. (2007). Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.

- Ramos, L.P.; Carpes, S.T.; Silva, F.T.; Ganter, J.L.M.S. (2000). Comparison of the susceptibility of two hardwood species, *Mimosa scabrella* Benth and *Eucalyptus viminalis* Labill, to steam explosion and enzymatic hydrolysis. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 43: 185-206.
- Ramos, L.P.; Breuil, C.; Saddler, J.N. (1992). Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 34-35: 37-48.
- Rao, M.N.A.; Mithal, B.M.; Thakkur, R.N.; Sastry, K.S.M. (1983). Solid state fermentation for cellulase production by *Pestalotiopsis versicolor*. **Biotechnol. Bioeng.** 25: 869-872.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Curtis, H. (1976). **Biologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 724p.
- Revista *Ethanol Producer Magazine*. **Disponível (online) em 23 de outubro de 2013:**
<http://ethanolproducer.com/articles/10332/commercial-scale-cellulosic-ethanol-refinery-opens-in-italy>.
- Reshamwala, S.; Shawky, B.T.; Dale, B.E. (1995). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 51-52: 43-55.
- Rodrigues, L.R.A.; Monteiro, F.A.; Rodrigues, T.J.D. Capim Elefante. In: Peixoto, A.M.; Pedreira, C.G.S.; Moura, J.V.; Faria, V.P. (2001). Simpósio sobre manejo de pastagens, 17, Piracicaba. 2ª ed. **Anais**. pp.203-224, Piracicaba: FEALQ. **Disponível (online) em 18 de novembro de 2009**
:<http://www.gestaouniversitaria.com.br/index.php?view=article&catid=175:194&id=21082:capim-elefante-fonte-de-energia-alternativa&format=pdf>
- Rolle, R.S. (1998). Review: enzyme applications for agroprocessing in developing countries: an inventory of current and potential applications. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 14: 611-619.
- Rudolf, A.; Baudel, H.; Zacchi, G.; Hahn-Hagerdal, B.; Liden, G. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnol. Bioeng.** 99: 783-790.
- Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microb. Biotechnol.** 30: 279-291.

- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.** 27: 185–194.
- Sánchez, O.J.; Cardona, C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour. Technol.** 99: 5270-5295.
- Santos, F.A.; Queiróz, J.H.; Colodette, J.L.; Fernandes, S.A.; Guimarães, V.M.; Rezende, S.T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova.** 15: 1-7.
- Santos, M.F.R.F; Borschiver, S.; Couto, M.A.P.G. (2011). Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. *Economia & Energia Ano XV-No 82 ISSN 1518-2932*. Disponível (online) em 22 de julho de 2013: <http://ecen.com/eee82/eee82p/biorefinarias.htm>.
- Santos, E.A.; Silva, D.S.; Queiroz Filho, J.L. (2001). Perfilhamento e algumas características do capim-elefante cv. Roxo, cortado em diferentes alturas. **Rev. Bras. Zootec.** 30: 18-23.
- Sassner, P.; Galbe, M.; Zacchi, G. (2006). Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 756-762.
- Schmidell, W.; Facciotti, M.C.R. (2001). Biorreatores e processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher. pp. 179-192.
- Schneider, W.D.; dos Reis, L.; Camassola, M.; Dillon, A.J. (2014). Morphogenesis and production of enzymes by *Penicillium echinulatum* in response to different carbon sources. **Biomed. Res. Int.** 25: 48-63.
- Scholl, A.L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontana, R.C.; Filho, A.Z.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2015). Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresour. Technol.** 192: 228-237.
- Schwarz, W.H.; Bronnenmeier, K.; Grabnitz, F.; Staudenbauer, W.L. (1987). Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage-glucans. **Anal. Biochem.** 164: 72-77.

- Silva, A.S.A.; Inoue, H.; Endo, T.; Yano, S.; Bon, E.P.S. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresour. Technol.** 101: 7402-7409.
- Silva; R.; Lago, E.S.; Merheb, C.W.; Macchione, M.M.; Park, Y.K.; Gomes, E. (2005). Production of xylanase and Cmcase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe **Braz. J. Microbiol.** 36: 235-241.
- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 44: 13-18.
- Singhania, R.R.; Sukumaran, R.K.; Patel, A.K.; Larrocheb, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 541-549.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Wolfe, J. **Technical Report NREL/TP-510-42621, 2008.**
- Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. **Technical Report NREL/TP-510-42619, 2005.**
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. **Technical Report NREL/TP-510-42618, 2012.**
- Soccol, C.R.; Vandenberghe, L.P.S.; Medeiros, A.B.P.; Karp, S.G.; Buckeridge, M.; Ramos, L.P.; Pitarelo, A.P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.M.F.; Ferrara, M.A.; Bon, E.P.S.; de Moraes, L.M.P.; Araújo, J.A.; Torres, F.A.G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresour. Technol.** 101: 4820-4825.
- Somerville, C.; Youngs, H.; Taylor, C.; Davis, S.C.; Long, S.P. (2010). Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science.** 329: 790-792.
- Smits, J.P.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Van Sonsbeek, H.M.; Knol, W. (1996). Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM 9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46: 489-496.
- Sousa, L.C.; Chundawat, S.P.S., Venkatesh, B.; Dale, B.E. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. (2009). **Curr. Opin. Biotechnol.** 20: 339-347.

- Stambuk, B.U.; Eleutherio, E A A.; Florez-Pardo, L.M.; Souto-Maior, A.M.; Bom, E.P.S. (2008). Brazilian potencial for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.** 67: 918-926.
- Stebbins, G.L.; Crampton, B. (1961). A suggested revision of the grass genera of temperate North America. In: **Recent advances in botany**. Toronto, Canadá.
- Sun, S.; Ziyong, L.; Kai, Z.; Xin, S.; Yinbo, Q. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 560-567.
- Sun, J.X.; Sun, X.F.; Sun, R.C.; Su, Y.Q. (2004). Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydr. Polym.** 56: 195-204.
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.** 83: 1-11.
- Sunna, A.; Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.** 17: 39-67.
- Szczodrak, J.; Targonski, Z. (1989). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: effect of ethanol and cellulases on particular stages. **Acta. Biotechnol.** 9: 555-564.
- Szengyel, Z. (2000). Ethanol from wood cellulase enzyme production. PhD Tesis. **Lund University**. Sweden 54p.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.** 9: 1621-1651.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources.** 2: 707-738.
- Talebnia, F.; Karakashev, D.; Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresour. Technol.** 101: 4744-4753.
- Teeri, T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Tibtech.** 15: 160-167.

- Teixeira, L.C.; Linden, J.C.; Schroeder, H.A. (2000). Simultaneous saccharification and cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 84-86: 111-127.
- Urquiaga, S.C.; Alves, B.; Boddey, R. (2006). Capim elefante: uma nova fonte alternativa de energia. **Disponível (online) em 18 de novembro de 2009** :http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/capimelefante/Index.htm.
- Varshney, A.K.; Patel, D.P. (1988). Biomass delignification - Organosolv approach. **J. Sci. Ind. Research.** 47: 315-319.
- Walker, G.M. (1998). **Yeast physiology and biotechnology**. England: John Wiley, p. 157-158 e p. 350.
- Wanderley, M.C.A.; Martín, C., Rocha, G.J.M.; Gouveia, E.R. (2013). Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 128: 448-453.
- Viikari, L.; Vehmaanper, J.; Koivula, A. (2012). Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass Bioenerg.** 46: 13-24.
- Woodard, K.R.; Prine, G.M. (1993). Dry matter accumulation of elephant grass, energy cane and elephant millet in a subtropical climate. **Crop Science.** 33: 818–824.
- Wright, J.D. (1998). Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. **Chem. Eng. Prog.** 84, 62–74.
- Wyman, C.E.; Spindler, D.D.; Grohmann, K. (1992). Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. **Biomass. Bioenerg.** 3: 301-307.
- Xie, X.M.; Zhang, X.Q.; Dong, Z.X.; Guo, H.R. (2011). Dynamic changes of lignin contents of MT-1 elephant grass and its closely related cultivars. **Biomass Bioenerg.** 35: 1732-1738.
- Xiong, H.; Weymarn, N.; Turunen, O.; Leisola, M.; Pastinen, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 96: 753-759.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Boyce, A.N.; Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 66: 751-774.

- Zhang, X.; Qin, W.; Paice, M.G.; Saddler, J.N. (2009). High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresour. Technol.** 100: 5890-5897.
- Zhang, Y.H.P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 367-375.
- Zeilinger, S.; Haller, M.; Mach, R.; Kubicek, C.P. (2000). Molecular characterization of a cellulase-negative mutant of *Hypocrea jecorina*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 277: 581-588.
- Zhu, S.; Wu, Y.; Yu, Z.; Zhang, X.; Wang, C.; Yu, F.; Jin, S.; Zhao, Y.; Tu, S.; Xue, Y. (2005). Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. **Biosys. Eng.** 92: 229-235.