



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1101295-1 B1

(22) Data do Depósito: 30/03/2011

(45) Data de Concessão: 28/03/2017



* B R P I 1 1 0 1 2 9 5 B 1 *

(54) Título: PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMPREENDENDO A ADIÇÃO DE VINHAÇA COMO AGENTE TAMPONANTE DO MEIO REACIONAL CONTENDO BIOMASSA VEGETAL LIGNOCELULÓSICA

(51) Int.Cl.: C12F 3/06; C12P 19/04; C12P 7/10; C12S 3/02

(73) Titular(es): CTC - CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA S.A.

(72) Inventor(es): CÉLIA MARIA ARAÚJO GALVÃO; JULIANA CONCEIÇÃO TEODORO; LILIANE PIRES ANDRADE; JOSÉ AUGUSTO TRAVASSOS RIOS TOMÉ; OSWALDO GODOY NETO

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COMPREENDENDO A ADIÇÃO DE VINHAÇA COMO AGENTE TAMPONANTE DO MEIO REACIONAL CONTENDO BIOMASSA VEGETAL LIGNOCELULÓSICA

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção se refere à utilização de vinhaça no processo de sacarificação/fermentação de biomassas lignocelulósicas, independentemente da forma como estas se apresentarem e independentemente da destinação que será dada ao caldo hidrolisado final obtido. Mais especificamente, a presente invenção descreve o efeito benéfico que a vinhaça confere ao processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, uma vez que esta apresenta, dentre outras características, a capacidade de tamponar o meio reacional, sobretudo quando tal processo ocorre mediante rota enzimática, mas não limitado a ela, independentemente do tipo de biomassa que está sendo utilizada e do tipo de pré-tratamento ao qual esta biomassa foi submetida.

[0002] A presente invenção trata ainda de processos fermentativos, como a produção de etanol, compreendendo o uso de vinhaça como fonte de nutrientes como, por exemplo, o nitrogênio (N), para o crescimento de microrganismos, mas não limitado a ela.

[0003] A presente invenção está situada na área de Engenharia Química.

Antecedentes da Invenção

[0004] O processo de hidrólise enzimática, em especial a sacarificação de biomassas lignocelulósicas, ocorre, geralmente, em meios tamponados ou sob pH controlado. Assim, é comum o uso de soluções tamponantes, como por exemplo, citrato de sódio e acetato de sódio, dentre outros, ou soluções controladoras de pH como ácidos e bases (e.g. hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido fosfórico e etc) para manter o pH em um valor ideal no qual o

processo de sacarificação dessas biomassas é favorecido. Em geral, o pH ótimo de operação do sistema coincide com o ótimo de operação das enzimas responsáveis pelo processo de bioconversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. A celulase, complexo enzimático mais amplamente utilizado no processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, expressa sua maior atividade na faixa de pH que varia de 4,5 a 5,5. Esta faixa de pH além de favorecer o processo catalítico também auxilia na manutenção da estabilidade do complexo enzimático por períodos de tempo mais prolongados, o que estende a vida útil do biocatalisador impactando de forma benéfica e crucial no custo final do processo.

[0005] As soluções tamponantes convencionais como o citrato de sódio e o acetato de sódio possuem custo bastante elevado, podendo, inclusive, inviabilizar o processo produtivo em certas situações. Ácidos e/ou bases utilizados para controle do pH durante o processo, apesar de apresentarem custo significativamente inferior às soluções anteriormente citadas, ainda representam uma parcela expressiva do custo final do processo quando comparadas ao processo utilizando vinhaça como agente tamponante. Assim, torna-se extremamente desejável a utilização no processo supracitado de agentes tamponantes eficazes e de baixo custo.

[0006] O uso da vinhaça no processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas apresenta diversas vantagens quando comparado aos processos convencionais, mas certamente uma vantagem que merece destaque é a significativa economia no consumo de água na etapa de hidrólise enzimática de biomassas (pré-tratadas ou não), uma vez que a vinhaça pode inclusive substituir toda a água necessária neste processo específico.

[0007] A presença da vinhaça no processo de hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas possibilita a formação de compostos químicos que têm a capacidade de promover o efeito tamponante do meio reacional, ou seja, manter o pH dentro de uma faixa específica desejada de modo a proporcionar um ambiente favorável ao adequado funcionamento das enzimas que compõem

o complexo enzimático, que necessitam de condições bem definidas para executarem a quebra das ligações do seus substratos específicos, de modo a maximizar a geração de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica utilizada.

[0008] No processo de tamponamento do meio reacional, sais presentes na vinhaça como, por exemplo, o sódio, combinam-se com ácidos gerados durante o processo de pré-tratamento da biomassa, como, por exemplo, o ácido acético, formando compostos químicos, como por exemplo, o acetato de sódio, que atuam diretamente na manutenção do pH do meio em faixas determinadas. Deste modo, o efeito tamponante surge a partir da reação química que ocorre entre compostos naturalmente presentes na vinhaça e na biomassa pré-tratada, dispensando, assim, a preparação prévia de solução tamponante.

[0009] A presente invenção tem como principais vantagens:

- Ser altamente eficiente no tamponamento do meio reacional onde ocorre a sacarificação de biomassas lignocelulósicas, ou seja, o uso da vinhaça permite que o pH da suspensão seja mantido dentro da faixa ótima de operação do complexo enzimático utilizado (4,5-5,5), uma vez que catalisadores biológicos expressam sua maior atividade em uma faixa bastante restrita de pH. Além disso, a manutenção do pH na faixa ótima de operação da enzima possibilita às enzimas manterem sua estabilidade por períodos de tempo mais prolongados, o que estende a vida útil do biocatalisador impactando de forma benéfica e crucial no custo final do processo;

- Ser de custo bem mais acessível que as soluções tamponantes convencionais como, por exemplo, soluções tampão citrato de sódio e acetato de sódio, visto que esta corrente é produzida dentro da própria unidade industrial em grandes quantidades, uma vez que para litro de etanol produzido gera-se em torno de 10 a 12 litros de vinhaça;

- Ser rica em nitrogênio, que é um macro nutriente de extrema relevância no processo de fermentação de açúcares a etanol, dado que uma vinhaça industrial típica pode apresentar até 1g/L de nitrogênio total em sua composição;

assim, além de baratear o custo global do processo, a vinhaça ainda favorece a etapa específica de fermentação de caldos hidrolisados provenientes da sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar;

- Ser adequada para uso no processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas também sob a ótica ambiental, dentro do conceito de ciclo fechado de processo, já que este “resíduo” ou “subproduto” é comumente utilizado no processo de fertirrigação dos canaviais, constituindo-se em uma importante fonte de poluição de solos e águas subterrâneas devido, principalmente, à sua elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em função do teor de matéria orgânica presente em sua composição;

- Permitir economia de água no processo de sacarificação do bagaço de cana pela substituição desta pela vinhaça.

[0010] No âmbito patentário, foram identificados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

[0011] O documento US 7,807,419 revela um processo para a sacarificação de biomassa pré-tratada para se obter altas concentrações de açúcares fermentescíveis. Especificamente, trata-se de um processo que se utiliza de um sistema de alimentação em batelada com redução no tamanho das partículas. A presente invenção difere deste documento por compreender o uso de vinhaça como agente tamponante da reação de sacarificação de biomassas, bem como aditivo para fermentação devido ao teor de nitrogênio presente em sua composição.

[0012] O documento US 2010/0086981 apresenta composições e métodos para melhorar a sacarificação de biomassas com enzimas e microrganismos modificados. O referido documento cita o uso de citrato de sódio durante a reação. A presente invenção difere deste documento por dispensar o uso do citrato de sódio, substituindo-o pela vinhaça disponível em grandes volumes nas usinas de cana-de-açúcar.

[0013] O documento US 2010/0159515 descreve um método de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas que cita o uso de tampão a partir de

citratos. A presente invenção difere deste documento por utilizar compostos presentes na vinhaça disponível nas usinas de álcool e açúcar ou destilarias autônomas para promover o efeito tamponante ao meio reacional.

[0014] O documento WO 2008/040358 descreve o uso de um subproduto da fermentação, a vinhaça, rica em potássio como agente fertilizante. Esse documento diz ainda que essa vinhaça rica em potássio é pobre em aminoácidos e proteínas, pois os mesmos já foram removidos em etapas anteriores. A presente invenção difere deste documento por prever a utilização da vinhaça resultante da fermentação alcoólica industrial rica em nitrogênio (até 1g/L) não como agente fertilizante, mas como agente tamponante do processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas; além disso, esta vinhaça também se mostra adequada à etapa de fermentação alcoólica, visto que representa uma fonte adicional de nitrogênio, macro nutriente indispensável ao processo fermentativo mencionado.

[0015] O documento EP 048061 descreve um processo para reaproveitamento da vinhaça compreendendo etapas de concentração e queima da vinhaça. Contudo, nada é dito a respeito de sua utilização em processos hidrolíticos (ácidos ou enzimáticos) e/ou fermentativos; tampouco há qualquer citação a respeito de suas características como agente tamponante ou fonte de nitrogênio.

[0016] O documento WO 2008/116278 descreve o aproveitamento da vinhaça como aditivo em ração animal, sendo que a vinhaça passa por um processo de destilação e concentração, seguido de desidratação.

[0017] O documento EP 769915 descreve o uso de ácidos orgânicos provenientes da vinhaça; tais compostos mostram-se especialmente úteis em cultivos microbianos.

[0018] A presente invenção difere deste e dos demais documentos por utilizar a vinhaça (ou qualquer resíduo/subproduto proveniente do processo de destilação de vinho fermentado) em qualquer estado de tratamento (bruta, filtrada, concentrada, etc) como agente tamponante de processos de

sacarificação de biomassas lignocelulósicas e aditivo de fermentação (fonte adicional de nitrogênio).

[0019] 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.

Sumário da Invenção

[0020] A presente invenção descreve a utilização de vinhaça como agente tamponante de processos de sacarificação de biomassas lignocelulósicas e fonte adicional de nitrogênio em processos fermentativos, independentemente da fonte e da forma como tais biomassas tiverem sido produzidas. Em suma, a presente invenção possui como principais vantagens competitivas a alta eficiência, o baixo custo e a preservação do meio ambiente.

[0021] É objeto da presente invenção o processo de sacarificação de biomassas lignocelulósicas compreendendo a adição de vinhaça (ou qualquer resíduo/subproduto proveniente do processo de destilação de vinho fermentado) como agente tamponante ao meio reacional.

[0022] Em uma realização preferencial, o processo de hidrólise enzimática é um processo de sacarificação e pode ocorrer sob qualquer configuração selecionada do grupo que compreende SHF (Hidrólise Enzimática e Fermentação Separadas), SSF(Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas), SSCF (Hidrólise Enzimática, Fermentação e Co-Fermentação Simultâneas), CBP (Produção de Enzimas, Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas), SEPHY (Produção de Enzimas e Hidrólise Enzimática separadas da Fermentação) e combinações das mesmas.

[0023] É um adicional objeto da invenção um agente tamponante composto de vinhaça, o qual é útil em processos de hidrólise enzimática.

[0024] É um adicional objeto da invenção a utilização da vinhaça como agente tamponante, compreendendo a etapa de coletar a vinhaça a partir do

processo de destilação do vinho resultante do processo de fermentação alcoólica.

[0025] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um processo de fermentação que compreende a adição de um aditivo de fermentação que é rico em nitrogênio e imprescindível ao processo fermentativo em questão.

[0026] É um adicional objeto da presente invenção um processo fermentativo compreendendo uma etapa de fermentação na presença de um aditivo de fermentação composto de vinhaça.

[0027] É um adicional objeto da presente invenção um processo de produção de etanol compreendendo a fermentação de açúcares na presença de um aditivo de fermentação composto por vinhaça.

[0028] É um adicional objeto da presente invenção um aditivo de fermentação composto de vinhaça, o qual é útil como fonte de nitrogênio.

[0029] É um adicional objeto da presente invenção um processo de preparo de aditivo de fermentação compreendendo a etapa de coletar a vinhaça a partir do processo de destilação do vinho resultante do processo de fermentação alcoólica.

[0030] 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

[0031] A Figura 1 revela um possível fluxograma de obtenção da vinhaça para uso na hidrólise enzimática. Legenda: (11) Destilação; (12) Vinho; (13) Etanol; (14) *Stripping*; (15) *Rectifying*; (16) Vinhaça; (17) Vapor; (18) Hidrólise enzimática; (19) Condensado de vinhaça; (110) Vinhaça concentrada; (111) Evaporação; e (112) Concentração de vinhaça.

[0032] A Figura 2 contempla um fluxograma de uma possível rota de sacarificação de biomassas lignocelulósicas da presente invenção – SSF:

Hidrólise Enzimática e Fermentação – simultâneas. Legenda: (21) Biomassa lignocelulósica; (22) Pré-tratamento; (23) Lavagem; (24) Hidrólise enzimática + Fermentação + Co-fermentação; (25) Produção de enzimas; (26) Microorganismos; (27) Açúcares; (28) Vinhaça; (29) Purificação; (210) Etanol; (211) Biomassa pré-tratada; (212) Vinho; (213) Vinhaça 1ª ou 2ª geração; e (214) Fertirrigação.

[0033] A Figura 3 contempla um fluxograma de uma possível rota de sacarificação de biomassas lignocelulósicas da presente invenção – SHF: Hidrólise Enzimática e Fermentação - separadas. Legenda: (31) Biomassa lignocelulósica; (32) Pré-tratamento; (33) Lavagem; (34) Hidrólise; (35) Produção de enzimas; (36) Açúcares; (37) Vinhaça; (38) Microorganismos; (39) Fermentação/Co-fermentação; (310) Purificação; (311) Etanol; (312) Biomassa pré-tratada; (313) Hidrolisado; (314) Vinho; (315) Vinhaça 1ª ou 2ª geração; e (316) Fertirrigação.

[0034] A Figura 4 contempla um fluxograma de uma possível rota de sacarificação de biomassas lignocelulósicas da presente invenção – CBP: Produção de Enzimas, Hidrólise Enzimática e Fermentação - Simultâneas. Legenda: (41) Biomassa lignocelulósica; (42) Pré-tratamento; (43) Catalisador; (44) Lavagem; (45) Açúcares; (46) Produção de enzimas + Hidrólise enzimática + Fermentação/Co-fermentação; (47) Microorganismos; (48) Vinhaça; (49) Purificação; (410) Etanol; (411) Biomassa pré-tratada; (412) Vinho; (413) Vinhaça 1ª ou 2ª geração; e (414) Fertirrigação.

[0035] A Figura 5 contempla um fluxograma de uma possível rota de sacarificação de biomassas lignocelulósicas da presente invenção – SEPHY: Produção de Enzimas + Hidrólise Enzimática separadas da Fermentação. Legenda: (51) Biomassa lignocelulósica; (52) Pré-tratamento; (53) Catalisador; (54) Lavagem; (55) Açúcares; (56) Produção de enzimas + Hidrólise enzimática; (57) Vinhaça; (58) Microorganismos; (59) Fermentação/Co-fermentação; (510) Purificação; (511) Etanol; (512) Biomassa pré-tratada; (513) Hidrolisado; (514) Vinho; (515) Vinhaça 1ª ou 2ª geração; e (516) Fertirrigação.

[0036] Figura 6: Desenho esquemático do processo de pré-tratamento de bagaço de cana com vapor ("Steam Explosion"). A – Caldeira (gerador de vapor); B – Reator; C – "Flash Tank".

[0037] Figura 7: Hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor com diferentes concentrações de vinhaça no meio reacional.

Descrição Detalhada da Invenção

[0038] Os exemplos aqui mostrados têm apenas o intuito de exemplificar algumas das inúmeras maneiras de se realizar a invenção sem, contudo, limitar o escopo da mesma.

Biomassa Vegetal Lignocelulósica

[0039] A expressão biomassa vegetal lignocelulósica compreende qualquer tipo de planta, a saber: biomassa herbácea; cultivares como plantas C4 – pertencentes aos gêneros *Lolium*, *Spartina*, *Panicum*, *Miscanthus*, e combinações dos mesmos; bagaço de cana-de-açúcar (oriundo de moenda e/ou difusor); palha de cana-de-açúcar; palha de cereais como trigo, arroz, centeio, cevada, aveia, milho e similares (e.g. capim-elefante "*switchgrass*"); madeira; troncos e talos de bananeira; cactáceas e combinações dos mesmos. Além disso, materiais lignocelulósicos podem ainda compreender papelão, serragem, jornal e resíduos agroindustriais ou municipais similares.

[0040] Biomassas vegetais de diferentes origens podem apresentar diferenças particulares, embora possuam composição química global relativamente semelhante. Algumas variações na composição entre diferentes espécies e entre uma mesma espécie se devem a variabilidades ambientais e genéticas, ademais da localização do tecido vegetal em diferentes partes da planta. Tipicamente, biomassas lignocelulósicas apresentam de 35% a 50% de celulose, de 20% a 35% de hemicelulose e de 20% a 30% de lignina. Além dessas frações majoritárias, há ainda quantidades minoritárias de cinzas, compostos fenólicos, ácidos orgânicos e compostos denominados extrativos. A celulose e as hemiceluloses do tecido vegetal são constituídas de carboidratos estruturais (e.g. glicanas, xilanas, mananas) e são geralmente denominadas de

fração sacarídica. A lignina, por sua vez, representa a fração fenólica da biomassa vegetal.

Vinhaça

[0041] Na presente invenção, entende-se como vinhaça qualquer resíduo proveniente do processo de destilação do vinho delevedurado, obtido após fermentação e separação das células de levedura, geralmente por centrifugação, mas não limitado a ela.

Agente Tamponante

[0042] Na química, as soluções-tampão são soluções capazes de atenuar variações no pH, estabilizando-o em um valor relativamente constante, ainda que o sistema sofra perturbações pela adição de ácidos ou bases.

[0043] A vinhaça obtida na presente invenção, pela sua alta concentração de íons como sódio, é capaz de reagir com os ácidos gerados no processo de pré-tratamento/hidrólise, mantendo então o pH do meio numa faixa constante e propícia para a atividade enzimática.

[0044] A vinhaça da presente invenção é bastante útil em processos de hidrólise enzimática de uma forma geral, mas, especialmente, em reações de sacarificação de biomassas lignocelulósicas.

[0045] A vinhaça da presente invenção, por ser um subproduto da fermentação, apresenta baixo custo e substitui de forma bastante eficiente agentes tamponantes comumente utilizados e de alto custo como, por exemplo, o ácido cítrico.

[0046] O agente tamponante é produzido por um processo que compreende a etapa de coletar a vinhaça produzida no processo de destilação do vinho delevedurado, resultante do processo de fermentação alcoólica, e, opcionalmente, filtrá-la, evaporá-la e/ou concentrá-la.

Processo de Hidrólise Enzimática

[0047] O processo de hidrólise enzimática da presente invenção é um processo que compreende a adição de qualquer quantidade de vinhaça ao meio reacional com o intuito de proporcionar o tamponamento do mesmo.

[0048] Em uma realização preferencial, o processo de hidrólise é um processo de sacarificação e pode ocorrer sob qualquer configuração conhecida do estado da técnica, e selecionada do grupo que compreende SHF (Hidrólise Enzimática e Fermentação Separadas), SSF (Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas), SSCF (Hidrólise Enzimática, Fermentação e Co-Fermentação Simultâneas), CBP (Produção de Enzimas, Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultâneas), SEPHY (Produção de Enzimas e Hidrólise Enzimática separadas da Fermentação) e combinações das mesmas.

Aditivo de Fermentação

[0049] O aditivo de fermentação da presente invenção é uma solução rica em nitrogênio, nutriente essencial para o crescimento dos microorganismos responsáveis pela fermentação, sejam eles leveduras ou bactérias.

[0050] A vinhaça obtida na presente invenção, pela sua alta concentração de nitrogênio, serve como fonte nutricional adicional no processo fermentativo. Sendo assim, a vinhaça da presente invenção é bastante útil no processo de fermentação de uma forma geral e, em especial, em reações de fermentação alcoólica.

[0051] O aditivo de fermentação é produzido por um processo que compreende a etapa de coletar a vinhaça produzida no processo de destilação do vinho de levedurado, resultante do processo de fermentação alcoólica, e, opcionalmente, filtrá-la, evaporá-la e/ou concentrá-la..

Processo Fermentativo

[0052] O processo fermentativo da presente invenção engloba qualquer processo fermentativo, seja ele bacteriano ou por meio de leveduras, compreendendo uma etapa de fermentação na presença de um aditivo de fermentação composto de vinhaça.

[0053] Em uma realização preferencial, o processo fermentativo da presente invenção visa à obtenção de etanol.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

[0054] Material Lignocelulósico: Bagaço típico de cana-de-açúcar (umidade de aproximadamente 50%) foi coletado em uma usina de álcool e açúcar localizada na região de Piracicaba/SP, imediatamente após moagem da cana (bagaço fresco).

[0055] Pré-Tratamento com Explosão à Vapor: Bagaço de cana "in natura" foi pré-tratado com vapor (Steam Explosion) visando promover modificações químicas e estruturais na biomassa, de modo a obter um substrato (polpa) com elevado teor de celulose e alta acessibilidade da matriz lignina-carboidrato às enzimas celulolíticas. Neste sentido, processos eficientes caracterizam-se por elevada remoção das hemiceluloses e extração seletiva de xilose (monômero e oligômeros), com mínima remoção de glicose. Além disso, tais processos devem produzir o mínimo de compostos inibidores da ação enzimática (e.g. furfural, HMF, ácidos húmicos e derivados fenólicos), produzidos a partir da degradação dos carboidratos e da lignina.

[0056] Experimentos de pré-tratamento com vapor foram realizados nas dependências do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba/SP) e, de modo geral, em uma única etapa. Na Figura 6 é apresentado um desenho esquemático dos equipamentos utilizados, que consistem basicamente de um reator de 65L (reator de pré-tratamento ou hidrolisador) acoplado por tubulação a um tanque de expansão ("flash tank") do tipo ciclone. O reator foi carregado com bagaço proveniente de moenda e/ou difusor coletado em usinas de álcool e açúcar do estado de São Paulo, em condições típicas. Vapor gerado por caldeira de 30kgf/cm² foi injetado diretamente no reator através de abertura de válvulas. A curva de aquecimento e o registro da pressão no reator foram manualmente monitorados. Decorrido o tempo de residência determinado, o reator foi descarregado, mediante descompressão súbita ou via rampa de descompressão, e o material pré-tratado ("slurry") coletado no tanque de expansão após alívio da pressão do sistema e liberação do vapor produzido. O bagaço pré-tratado obtido apresentou características que o potencializaram

como matéria-prima para produção de enzimas e hidrólise enzimática, aplicáveis à produção de bioetanol de bagaço.

[0057] Caracterização do Bagaço Pré-Tratado: Bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e pré-tratado com explosão a vapor foram caracterizados quanto aos teores de seus principais constituintes (carboidratos estruturais e lignina), segundo metodologia experimental baseada no protocolo desenvolvido pelo National Renewable Energy Laboratories (NREL), Estados Unidos (Sluiter *et. al.*, 2004).

[0058] A caracterização desses materiais demanda a determinação do teor de umidade, utilizando-se gravimetria diferencial em balança eletrônica após estufa para cálculo do percentual em relação à base seca do material. Para a determinação do teor de lignina insolúvel em ácido e carboidratos estruturais uma amostra de bagaço seco foi misturada à H₂SO₄ (72%), sob agitação por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de água destilada. Em seguida, para completa hidrólise dos oligômeros restantes, a suspensão foi autoclavada (121°C) por 1 hora. A fração líquida (hidrolisado) foi utilizada para determinação dos carboidratos estruturais por cromatografia líquida (HPLC) e a fração sólida foi lavada com água destilada e seca em estufa (105°C) para posterior calcinação (575°C) e determinação da lignina por gravimetria.

[0059] A determinação dos carboidratos estruturais por HPLC foi feita utilizando-se detector de índice de refração (IR), usando padrões externos para cada componente, coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, BIO-RAD) e fase móvel H₂SO₄ 5mM com fluxo de 0,6 mL/min à 45°C.

[0060] Hidrólise Enzimática: Bagaço de cana pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática utilizando-se diferentes concentrações de vinhaça industrial típica no meio reacional, conforme Tabela 1 abaixo. Paralelamente, experimentos na ausência de vinhaça, aqui chamados de experimentos referência, também foram realizados em idênticas condições experimentais:

Tabela 1 – Hidrólise Enzimática

Experimento	Relação %Vinhaça / %Água
1	10% - 90%
2	20% - 80%
3	30% - 70%
4	40% - 60%
5	50% - 50%
6	60% - 40%
7	70% - 30%
8	80% - 20%
9	90% - 10%
10	100% - 0%

[0061] Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em reator de 60L, nas seguintes condições experimentais: 50°C; pH 4,8-5,2; 8% de sólidos totais; carga enzimática de 13,5mL de enzima/kg bagaço seco e 48 horas de reação. As reações de hidrólise foram conduzidas usando a enzima Cellic Ctec 2, fornecida pela Novozymes[®] (Novozymes Latin America Ltda. – Araucária/PR, Brasil). A conversão da celulose presente na biomassa em glicose (açúcar fermentescível) atingida em cada ensaio realizado foi calculada pela seguinte equação (1):

$$\eta = \frac{M_{\text{Glicose Experimental}} - M_{\text{Branco}}}{M_{\text{Celulose}} * 1,111} * 100\% \quad (1)$$

onde: $M_{\text{Glicose Experimental}}$ é a massa de glicose presente no caldo hidrolisado após 48 horas de reação; M_{Branco} é a massa de glicose medida no ensaio realizado em idênticas condições experimentais, mas na ausência de enzimas; M_{Celulose} é a massa inicial de celulose presente no bagaço pré-tratado e 1,111 é o fator de conversão de celulose em glicose.

Exemplo 2

[0062] Composição do Bagaço Pré-Tratado: A composição do bagaço pré-tratado por explosão a vapor foi determinada utilizando-se metodologia experimental baseada no procedimento desenvolvido pelo NREL, como previamente descrito, e encontra-se apresentada na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2 – Composição do bagaço pré-tratado por explosão a vapor (base seca) com relação às suas três frações majoritárias.

Bagaço Pré-Tratado	Percentual em base seca
Umidade	65,42%
Sólidos Secos	34,58%
Celulose	59,20%
Hemicelulose	2,80%
Lignina	33,30%
Sólidos Solúveis	17,50%
Sólidos Insolúveis	82,50%

[0063] Como pode ser observado na tabela acima, o tratamento com vapor preservou as frações de celulose e lignina e solubilizou significativamente a hemicelulose, como desejado. Assim, espera-se que a acessibilidade das enzimas aos seus substratos específicos esteja consideravelmente facilitada no bagaço pré-tratado.

Exemplo 3

[0064] *Hidrólise Enzimática de Celulose com Carga de Sólidos de 8%:*
Em todos os experimentos realizados na presença de vinhaça o ajuste final do pH da suspensão reacional foi efetuado com hidróxido de sódio (NaOH). Experimentos de hidrólise na ausência de vinhaça e aqui denominados “referência” foram realizados em triplicata, utilizando-se solução tampão citrato de sódio 50mM, pH 5. A Figura 7 mostra as conversões obtidas.

[0065] Como pode ser observado na Figura 7, a faixa de concentração de vinhaça que permite que elevadas conversões de celulose em glicose sejam atingidas no período de 48 horas vai de 30% a 60%. Tais valores finais são, inclusive, superiores aos observados para o ensaio referência, indicando que a presença da vinhaça além de não causar qualquer tipo de inibição nas enzimas utilizadas, ainda fornece um caldo hidrolisado muito mais apropriado para a etapa posterior de fermentação, devido à presença de nutrientes tipicamente encontrados na vinhaça.

[0066] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Processo de hidrólise enzimática compreendendo a adição de vinhaça como agente tamponante do meio reacional contendo biomassa vegetal lignocelulósica, em que a dita biomassa vegetal lignocelulósica é selecionada do grupo consistindo de bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar ou uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e palha de cana-de-açúcar, **caracterizado** pela quantidade adicionada de vinhaça variar, em porcentagem mássica (%p/p), de 30% a 60% e a quantidade de água variar, em porcentagem mássica, de 70% a 40%.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pela vinhaça ser definida como um resíduo proveniente do processo de destilação do vinho de levedurado, obtido após fermentação e separação das células de levedura.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pela vinhaça ser opcionalmente filtrada, evaporada ou concentrada antes de ser adicionada como agente tamponante do meio reacional.

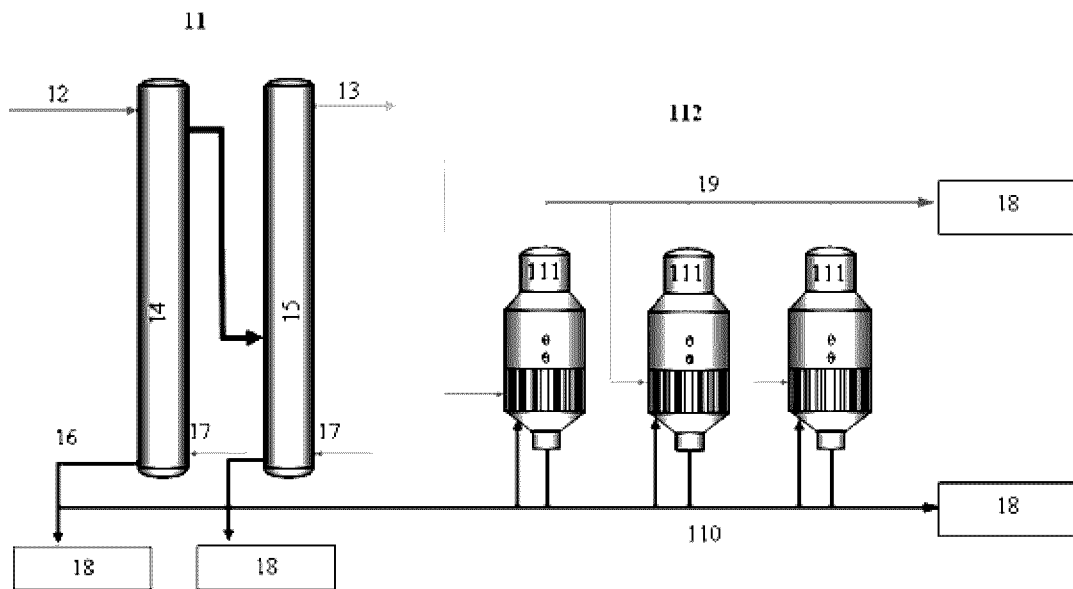
Figuras

Figura 1

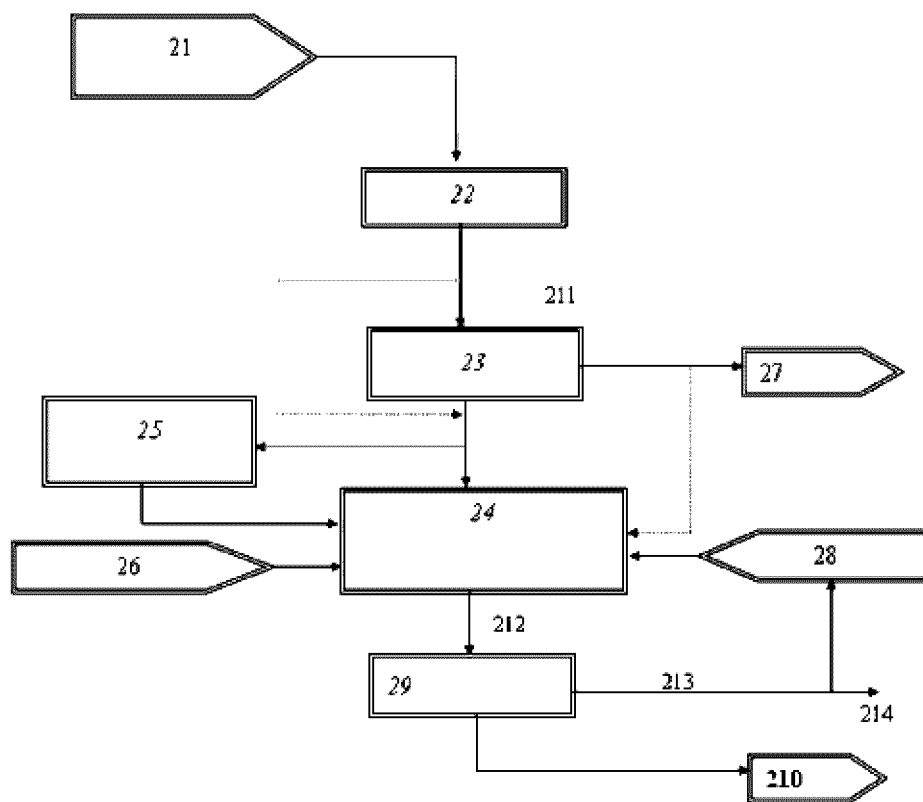


Figura 2

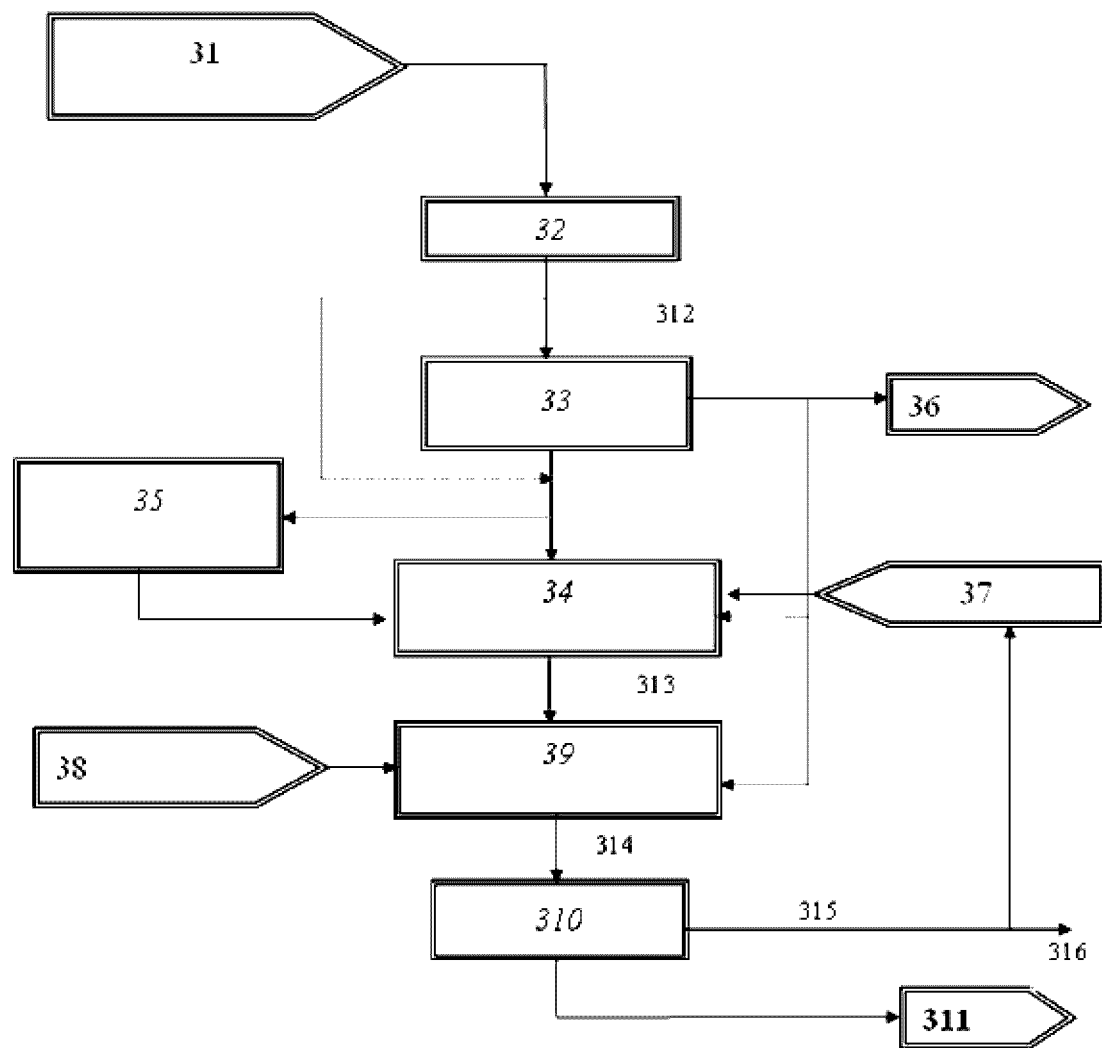


Figura 3

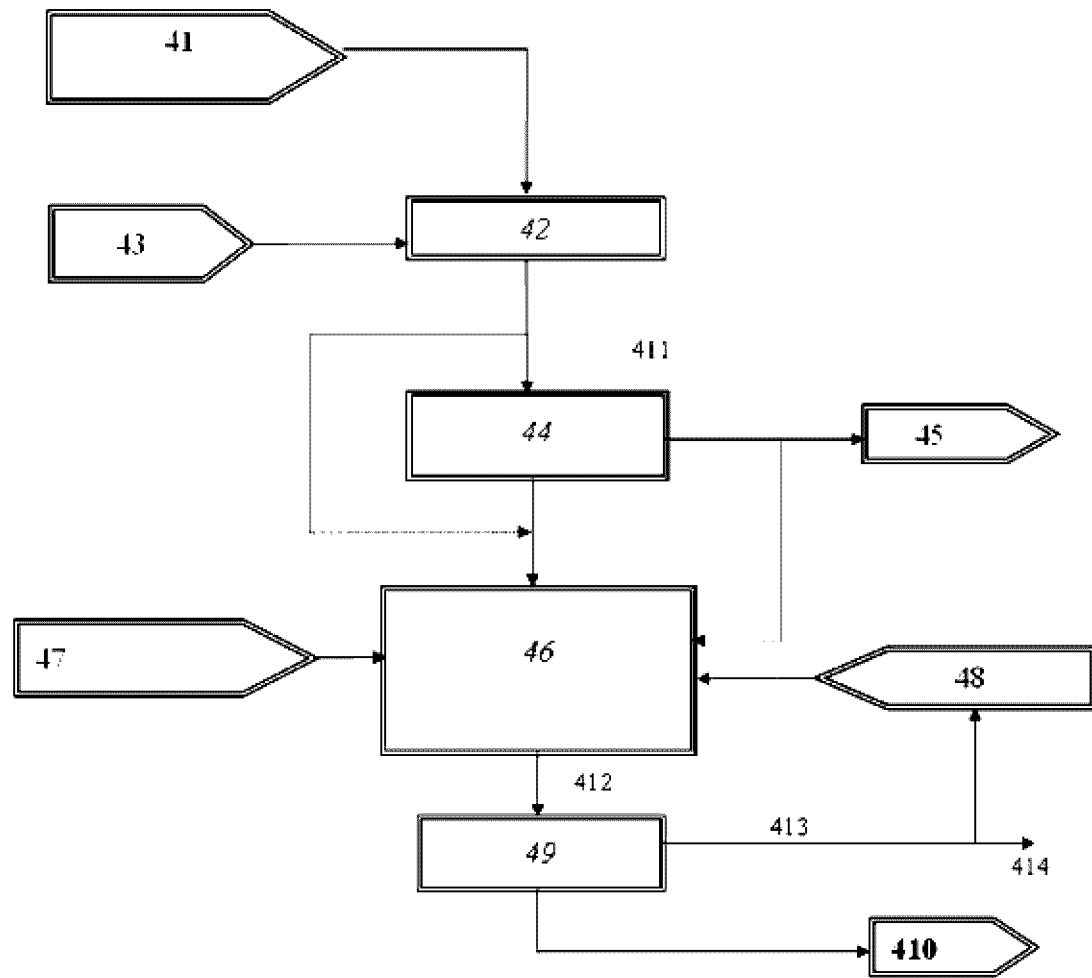


Figura 4

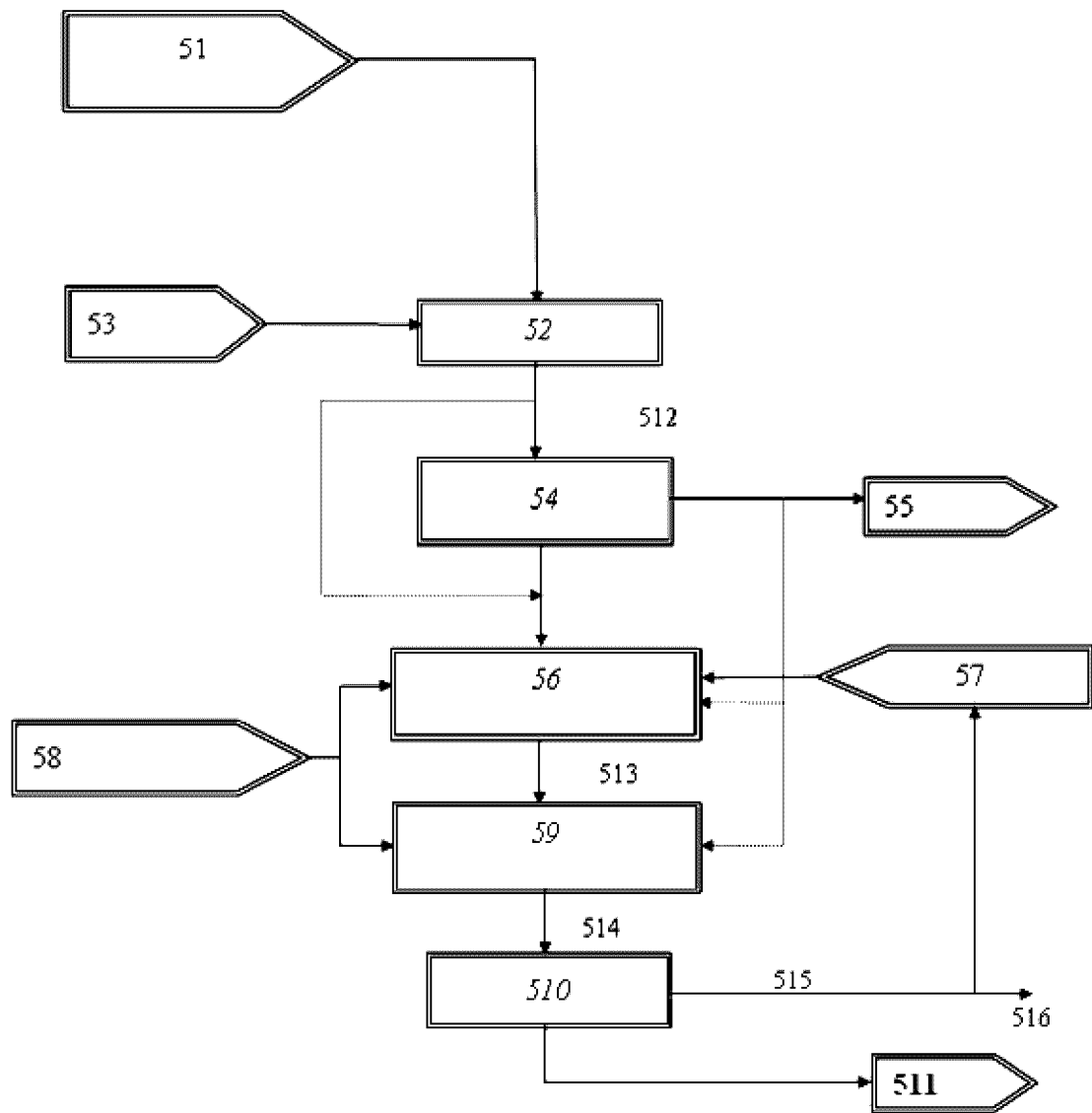


Figura 5

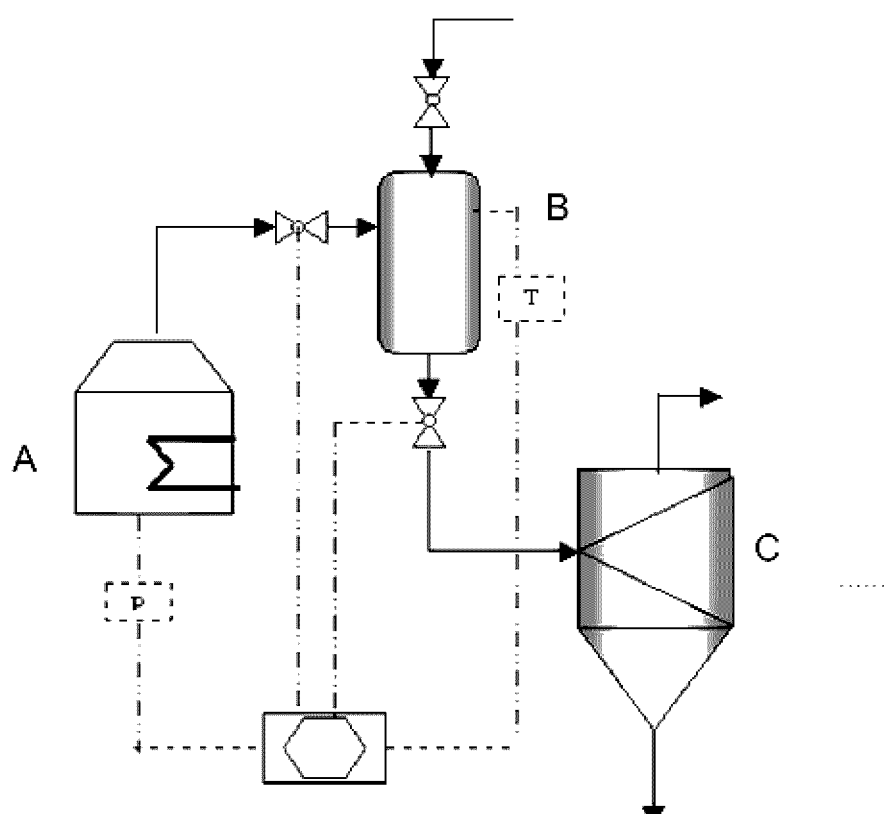


Figura 6

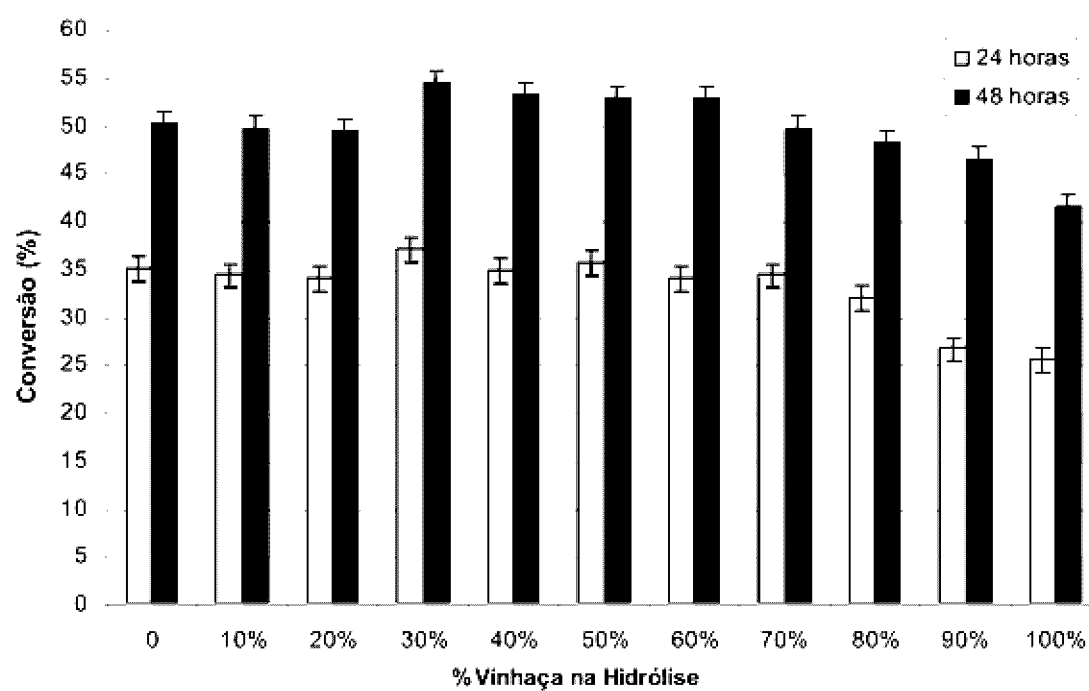


Figura 7